

**CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL DE PÉPTIDOS CON EFECTO
CARDIOVASCULAR EN BIOMODELOS MURINOS Y ACTIVIDAD
ECTROFISIOLÓGICA EN CANALES IÓNICOS Kv1.X y Kv11.1,
AISLADOS DEL VENENO DEL ESCORPIÓN *Centruroides
margaritatus* (Gervais,1841)**

José Toribio Beltrán Vidal

**UNIVERSIDAD DEL VALLE
FACULTAD DE SALUD
CENTRO DE POSGRADOS
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS
SANTIAGO DE CALI
2020**

**CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL DE PÉPTIDOS CON EFECTO
CARDIOVASCULAR EN BIOMODELOS MURINOS Y ACTIVIDAD
ECTROFISIOLÓGICA EN CANALES IÓNICOS Kv1.X y Kv11.1,
AISLADOS DEL VENENO DEL *ESCORPIÓN Centruroides
margaritatus* (Gervais,1841),**

**Tesis presentada como requisito parcial para optar al título de
Doctor en Ciencias Biomédicas**

AUTOR: José Toribio Beltrán Vidal

**Director: PhD. Jimmy Alexander Guerrero Vargas
Codirector: PhD. Santiago Castaño Valencia**

**UNIVERSIDAD DEL VALLE
FACULTAD DE SALUD
CENTRO DE POSGRADOS
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS
SANTIAGO DE CALI
2020**

Página de aceptación

Jurado 1

Jurado 2

Jurado 3

Santiago de Cali

Fecha de sustentación: 21 de febrero de 2020

Dedicatoria

A Dios fuente de sabiduría

A la memoria de mi madre Isabel Vidal, de mi padre Francisco Polidoro Beltrán y mi hermano Polidoro Beltrán Vidal

A mi esposa Miryam Carmona Naranjo, compañera incondicional, quien siempre me animó en este camino.

A mis hijos: Andrés Fernando, Mónica Isabel y Juan José Beltrán Vidal, quienes han sido mi mayor inspiración y motivación.

Agradecimientos

A Jimmy Alexander Guerrero Vargas (PhD), mi tutor y director de tesis, por sus valiosos aportes y orientaciones, su amistad y su apoyo incondicional en cada momento

A Santiago Castaño Valencia (PhD), codirector de tesis por su asesoría y valiosa colaboración en el trabajo realizado en el laboratorio de Fisiología para la realización del tercer capítulo de esta tesis

A Nilberto Nascimento (PhD), director del laboratorio de Fisiología de la Universidad Estadual del Ceará en Brasil, por permitir el desarrollo de buena parte del primer capítulo de esta tesis en su laboratorio.

A Lourival Possani (PhD) y su equipo de trabajo en el Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México, por permitir el desarrollo del segundo capítulo de esta tesis en su laboratorio

A Rita Restano Cassulini (PhD), orientadora en los procesos de electrofisiología en el IBT – UNAM, por su amistad y acogida fraterna.

A Franklin Moreno (PhD), compañero, gran colaborador y guía en los procesos de cromatografía.

A Melissa Mejía y Mauricio Arango, por su colaboración en laboratorio de Fisiología de la Facultad de salud, Universidad del Valle

A Mayra Alejandra Velasco (MgSc), por su apoyo y colaboración en el laboratorio de la Universidad Estadual del Ceará.

A la Universidad del Valle por ser el Centro de formación en este proceso doctoral.

A la Universidad del Cauca por facilitar las Comisiones de estudio y comisiones al exterior: Brasil y México.

A la Convocatoria CIAM, Vicerrectoría de Investigaciones, Universidad del Valle por su apoyo para la estancia en el IBT UNAM

Al Centro de Investigaciones Biomédicas de la Universidad del Cauca, por facilitar el procesamiento de veneno, y el mantenimiento de escorpiones.

Al laboratorio de Química Analítica del Departamento de Química de la Facultad de Ciencias Naturales y su director Dr. Germán Cuervo

TABLA DE CONTENIDO

	Página
ABSTRACT	xiii
RESUMEN	xiv
PALABRAS CLAVE	xiv
GLOSARIO	xv
1 INTRODUCCION	1
1.1 GENERALIDADES DE LOS ESCORPIONES	1
1.2 DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA DE LOS ESCORPIONES.	2
1.3 EL VENENO DE LOS ESCORPIONES	3
1.4 EL ESCORPIONISMO	4
1.5 EL ACCIDENTE ESCORPIÓNICO EN COLOMBIA	5
1.6 ESTADO DEL ARTE	5
1.7 ASPECTOS ÉTICO LEGALES	7
2 OBJETIVOS	8
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	8
3 MARCO TEORICO	9
3.1 PRINCIPIOS DE HEMODINÁMICA	9
3.1.1 Volumen sistólico o Fracción de Eyección (SV)	9
3.1.2 Gasto cardiaco (GC).	10
3.1.3 Presión Arterial Media (PAM)	10
3.4.4 Índice Doppler (dP/dt).	11
3.2 EL RITMO CARDIACO	11
3.3 HISTOLOGÍA CARDIACA	12
3.4 ISOENZIMAS CARDIACAS CK, CK-MB Y TROPONINAS CARDIACAS	13

3.5	LOS CANALES DE POTASIO DEPENDIENTES DEL VOLTAJE (K _v)	14
3.5.1	Diversidad de canales de potasio dependientes de voltaje (K _v)	15
3.5.2	Canales K _v presentes en células de MLV y cardiomiocitos	17
3.6	LAS ESCORPIOTOXINAS Y SU ACTIVIDAD EN CANALES DE IÓNICOS.	18
3.7	FISIOLOGÍA DE LA ACTIVIDAD VASOMOTORA	20
3.8	FÁRMACOS RELACIONADOS CON LA ACTIVIDAD VASOMOTORA EN CMLV	22
4	CAPITULO I	24
4.1	OBJETIVO	24
4.2	MATERIALES Y MÉTODOS.	24
4.2.1	Colecta y fraccionamiento del veneno.	24
4.2.2	Biomodelos experimentales	24
4.2.3	Obtención de registros hemodinámicos y cardiacos	25
4.2.4	Análisis histológico	25
4.2.5	Medición de Isoenzimas cardiacas	26
4.3	RESULTADOS	26
4.3.1	Fraccionamiento del veneno	26
4.3.2	Registros de las variables hemodinámicas	27
4.3.3	Registros electrocardiográficos	29
4.3.4	Histología cardiaca	29
4.3.5	Evaluación de Isoenzimas cardiacas	30
4.3.6	Creatina quinasa MB (CK-MB)	30
4.3.7	Troponina I (TI)	31
4.3.8	Letalidad y sintomatología	31
4.4	DISCUSIÓN	32
5	CAPITULO II	37
5.1	OBJETIVOS	37
5.2	MATERIALES Y METODOS	37
5.2.1	Obtención del veneno	37
5.2.2	Evaluación electrofisiológica del veneno completo	37
5.2.3	Cultivo de células para técnica electrofisiológica Patch clamp.	37
5.2.4	Evaluación por electrofisiología, Patch clamp	38
5.2.5	Fraccionamiento y caracterización química de los péptidos aislados	39

	Espectrometría de masas	
5.2.6	Secuenciación por Degradación de Edman	39
5.2.7	Análisis bioinformático	40
5.2.8	RESULTADOS	40
5.3	Efecto del veneno en los canales de sodio	40
5.3.1	Efecto del veneno en los canales de potasio	42
5.3.2	Aislamiento de péptidos con actividad en canales iónicos Kv	43
5.3.3	Caracterización química y electrofisiológica del péptido CmERG1	45
5.3.4	Caracterización química y fisiológica del péptido M = 3980,86 Da	46
5.3.5		49
	DISCUSIÓN	
5.4		49
	CAPITULO III.	
6		52
	OBJETIVO	
6.1		52
	METODOLOGÍA	
6.2	Determinación de los péptidos a evaluar	52
6.2.1	Determinación del tamaño de la muestra biológica	52
6.2.2	Montaje de los anillos aórticos en la cámara de órgano aislado.	52
6.2.3	Determinación del efecto vasomotor del veneno total	53
6.2.4	Determinación del efecto vasoconstrictor de los péptidos aislados	54
6.2.5	Determinación del efecto vasodilatador de los péptidos aislados	54
6.2.6	Recolección de la información y procesamiento de datos	55
6.2.7		55
	RESULTADOS Y ANALISIS	
6.3	Efecto vasomotor del veneno total	56
6.3.1	Prueba de efecto vasomotor de los péptidos aislados en anillos	56
6.3.2	aórticos	
	Efecto vasoconstrictor de los péptidos aislados en anillos íntegros	56
6.3.3	Efecto vasoconstrictor de los péptidos aislados en anillos aórticos	59
6.3.4	libres de endotelio	
	Pruebas del efecto vasodilatador de los péptidos aislados en	61
6.3.5	anillos íntegros	
	Pruebas Efecto vasodilatador de los péptidos aislados en anillos	62
6.3.6	sin endotelio	
		63
	DISCUSION	
6.4		64
	CONCLUSIONES	
7		67
	BIBLIOGRAFÍA	
		69

Índice de figuras

	Página
Figura 1	Morfología básica del escorpión. 1
Figura 2	Ejemplar de la especie <i>C. margaritatus</i> 2
Figura 3	Distribución geográfica y altitudinal de las especies de escorpiones venenosas en Colombia. 3
Figura 4	Esquema de la estructura y los dominios funcionales del extremo N-terminal de los canales KV. 14
Figura 5	Las cuatro clases principales de canales de potasio. 16
Figura 6	Representación de las relaciones de secuencia de aminoácidos de las regiones de poros de la superfamilia de canales iónicos activados por voltaje. 16
Figura 7	Ejemplos de estructuras terciarias de toxinas Kv. 19
Figura 8	Perfil cromatográfico del veneno de <i>C. margaritatus</i> 26
Figura 9	Registros control de las variables hemodinámicas PVE, PVC, VVE, EKG (DII), PAM, FC y dP/dt. 27
Figura 10	Análisis estadístico de comparaciones múltiples entre el control y las 4 dosis de las tres fracciones cromatográficas 28
Figura 11	Registros ECG de plano frontal, derivación bipolar II, en <i>R. norvegicus</i> . 29
Figura 12	Tejido cardíaco de <i>R. norvegicus</i> 30
Figura 13	Células de ovario de hámster chino (CHO) y células embrionarias de riñón humano (HEK) 38
Figura 14	Efecto del veneno sobre los canales de sodio 41
Figura 15	Efecto del veneno sobre los canales de potasio 42
Figura 16	Purificación de la toxina del canal de potasio del veneno de <i>Centruroides margaritatus</i> . 43
Figura 17	Separación por RP-HPLC de las subfracciones de la cromatografía de intercambio catiónico. 44
Figura 18	Alineación de CmERG1 con toxinas ERG similares caracterizadas previamente por su función 46
Figura 19	Caracterización de la toxina CmERG1. 47
Figura 20	Alineación del péptido de M= 3980 Da, con alpha Potasio Toxinas de <i>C. hentzi</i> y de escorpiones del género <i>Tityus</i> . 48
Figura 21	Caracterización del péptido M=3980,86 Da. 48

Figura 22	Modelo estructural del efecto de unión de la mutación en CmErg1 con respecto a CnErg1.	51
Figura 23	Estación del equipo de baño de órgano aislado.	53
Figura 24	Efecto del veneno total de <i>C. margaritatus</i> (VCCm)	56
Figura 25	Anova de una vía comparaciones múltiples, se presenta diferencia significativa ($p < 0,05$) entre el péptido PIII y los demás péptidos.	59
Figura 26	Curvas Dosis respuesta de vasoconstricción con valores de EC50 de los péptidos PI, PII, PIII y FII6-10 aislados del Veneno de <i>C. margaritatus</i> , en anillos íntegros de arteria aorta de rata.	59
Figura 27	Test t pareado entre la tensión de vasoconstricción pre y post incubación para los péptidos A: PI, B:PII, C:PIII, D:FII6-10 ($p < 0,05$)	60
Figura 28.	Curvas dosis respuesta de Fenilefrina en anillos aórticos íntegros de rata, pre incubación (línea negra) y post incubación (línea roja) con los péptidos: A: PI, B: PII, C: PIII, y D: FII6-10.	60
Figura 29.	Anova de una vía comparaciones múltiples, se presenta diferencia significativa ($p < 0,05$) entre el péptido PIII y los demás péptidos.	61
Figura 30	Curva Dosis respuesta de vasoconstricción de los péptidos PI, PII, PIII y FII6-10 en anillos con endotelio bloqueado de arteria aorta de rata.	61
Figura 31	Curvas Dosis Respuesta (DR) a partir del Porcentaje de vasodilatación producido en anillos aórticos íntegros por los péptidos PI, PII, PIII y FII6-10.	62
Figura 32	Anova de una vía comparaciones múltiples presenta diferencia significativa ($p < 0,05$) entre los péptidos PI y PIII, y no diferencia entre los péptidos PII y FII6-10.	63
Figura 33	Curvas Dosis Respuesta del efecto vasodilatador en porcentaje de tensión de los péptidos Pi, PII, PII y FII-10, aislados del veneno de <i>C. margaritatus</i>	63

Índice de Tablas

		Pagina
Tabla 1	Presencia de canales iónicos K_{vx} en miocitos cardiacos, endotelio y CMLV y su función o características cinéticas en células humanas (Xh) y en células de rata (Xr).	17
Tabla 2	Media y desviación estándar de los registros control en cada variable hemodinámica, obtenidos al inyectar sln salina 0,9% antes de aplicar las respectivas dosis de cada fracción de veneno y los obtenidos por otros investigadores en ratas normotensas.	27
Tabla 3	Valores de Creatina kinasa (CK) obtenido del suero de muestras de sangre de <i>R. norvegicus</i> , dos horas posteriores a la inoculación, vía IP, de tres dosis dela Fracción cromatográfica 2 del veneno de <i>C. margaritatus</i> y con solución salina 0.9% como control	30
Tabla 4	Valores de la fracción CK-MB obtenido del suero de muestras de sangre de <i>R. norvegicus</i> , dos horas posteriores a la inoculación, vía IP, de tres dosis dela Fracción cromatográfica 2 del veneno de <i>C. margaritatus</i> y con solución salina 0.9% como control.	31
Tabla 5	Índice relativo CK/CK - MB en porcentajes para los valores hallados obtenido del suero de muestras de sangre de <i>R. norvegicus</i> , dos horas posteriores a la inoculación, vía IP, de tres dosis dela Fracción cromatográfica 2 del veneno de <i>C. margaritatus</i>	31
Tabla 6	Registros de tensión en gramos (g) y en porcentaje (%) para cada uno de los efectos vasoconstrictor y vasodilatador como respuesta a las diferentes dosis del péptido PI (4177Da)	31
Tabla 7	Fracciones II-6 a II-10 obtenidas por HPLC, usando columnas de fase inversa C18 y análisis de espectrometría de masas, el tiempo de retención, la masa molecular y la característica electrofisiológica de cada una. En negrita y cursiva se indican las fracciones con actividad en canales hERG y K_v ($\times 1-4$), (NA) no actividad en hERG y K_v ($\times 1-4$), (NE) fracción no evaluada por estar fuera del intervalo de M para péptidos con actividad en canales de K^+	45
Tabla 8	Fracciones II 6-10 obtenidas por HPLC, usando una columna de fase reversa C18 y análisis por espectrometría de masas.	52
Tabla 9	Valores de contracción (% con KCl) de los anillos aórticos sanos, incubados con L-name + Indometacina y con lesión endotelial, tratados con veneno total.	56
Tabla 9.1	Registros de tensión en gramos (g) y en porcentaje (%) para cada uno de los efectos vasoconstrictor y vasodilatador como respuesta a las diferentes dosis del péptido PI (M=4177Da)	57
Tabla 9.2	Registros de tensión en gramos (g) y en porcentaje (%) para cada uno de los efectos vasoconstrictor y vasodilatador como respuesta a las diferentes dosis del péptido PII (M=M4792 Da)	57

Tabla 9.3	Registros de tensión en gramos (g) y en porcentaje (%) para cada uno de los efectos vasoconstrictor y vasodilatador como respuesta a las diferentes dosis del péptido PIII (M=3980 Da)	58
Tabla 9.4	Registros de tensión en gramos (g) y en porcentaje (%) para cada uno de los efectos vasoconstrictor y vasodilatador como respuesta a las diferentes dosis del péptido PI (4177Da)	58

ABSTRACT

Centruroides margaritatus is a scorpion species that causes moderate scorpionism in humans, the poisoning producing clinical symptoms that result in some cases in cardiovascular disorders. The Fraction II of the venom, corresponding to peptides with molecular masses between 2500 and 6000 Da, this produced hemodynamic alterations in experimental rats that modified the systemic mean arterial pressure, pressure and ventricular ejection volume, activity of the cardiac conduction system and inotropism evaluated by cardiac Doppler index. The venom of this scorpion produced a beta effect on the hNav1.1, hNav1.2, hNav1.3, and hNav1.6 channels, whereas producing a weak alpha effect on the hNav1.7 channel and alpha and beta effect in hNav1.4 channel, this venom blocks the hKv1.1 and Kv11.1 channels and reduces weakly the hKv1.4 currents. However, the venom does not modify the hEAG1 and hKv7.1 currents.

Two new toxins were isolated and identified from this venom: the first peptide named CmERG1, which acts on the hERG1 channels, this is a peptide of 42 amino acid residues with $M = 4792.88$ Da, four disulfide bonds, member number 10 of the γ -toxin family KT_x1 and this toxin blocks reversibly hERG1 currents, with IC₅₀ of 3.4 ± 0.2 nM. CmERG1 has an identity of 90.5% with the toxin γ -KT_x1.1 isolated from *C. noxi*us. The second toxin was named Cm2ERG1, this is a peptide with 37 amino acid residues and 3 disulfide bridges, this blocking activity below 50% on hERG1 channels in doses of 500 μ M, classified as an α -KT_x with 97.3% identity with a putative peptide obtained by transcriptomics of the venom gland in the *C. hentzi* scorpion.

The direct vasomotor effect of the toxins CmERG1, Cm2ERG1, MgTx, and a mixture of peptides from sub-fractions FII6-10 were determined in isolated aortic rings. CmERG1 and MgTx had vasoconstrictor effect on whole rings, MgTx had vasoconstrictor effect on endothelium-free rings, however, none of the toxins had vasodilator effect.

RESUMEN

Centruroides margaritatus es una especie de escorpión causante de escorpionismo moderado en humanos con síntomas clínicos de envenenamiento que resultan en algunos casos en trastornos cardiovasculares. La fracción cromatográfica II del veneno, correspondiente a péptidos con masas moleculares entre 2500 y 6000 Da, en un ensayo *in vivo* en ratas experimentales, causó alteraciones hemodinámicas en la presión arterial media sistémica, la presión y el volumen ventricular de eyección, la actividad del sistema de conducción cardíaco y el inotropismo. El veneno total de este escorpión ejerció un efecto beta en los canales hNav1.1, hNav1.2, hNav1.3, hNav1.5 y hNav1.6, un efecto alfa débil en los canales hNav1.7 y un efecto alfa y beta en el canal hNav1.4; bloqueó además los canales de potasio hKv1.1 y Kv11.1 y redujo débilmente las corrientes hKv1.4, pero no modificó las corrientes hEAG1 y hKv7.1.

Del veneno se aislaron e identificaron dos nuevas toxinas: la primera denominada CmERG1, es un péptido de 42 residuos de aminoácidos y masa molecular de 4792.88 Da, ocho cisteínas en su secuencia para cuatro enlaces disulfuro, miembro 10 de la familia de toxinas γ -KTx1, el cual bloqueó completamente las corrientes hERG1 de manera reversible, con IC₅₀ de 3.4 ± 0.2 nM, presentó una identidad de 90.5% con la toxina γ -KTx1.1 una hERGTX aislada del escorpión *Centruroides noxius*. La segunda toxina denominada Cm2ERG1, es un péptido con 37 residuos de aminoácidos masa molecular de 3980 Da, 6 cisteínas en su secuencia para tres puentes disulfuro, el cual bloqueó parcialmente las corrientes hERG de manera reversible en dosis de 500 μ M, se clasifica como un α -KTx con identidad del 97,3% con un péptido putativo obtenido por transcriptómica de la glándula de veneno del escorpión *C. hentzi*.

Se determinó además el efecto vasomotor de las toxinas CmERG1, Cm2ERG1, y de la toxina MgTx presente en el veneno de este escorpión así como de una mezcla de péptidos de las subfracciones FII6-10, en anillos aórticos de rata aislados en cámara de órganos. La toxina CmERG2 tuvo efecto vasoconstrictor en anillos íntegros y en anillos libres de endotelio, MgTx tuvo efecto vasoconstrictor en anillos libres de endotelio, CmERG1 y FII6-10 no tuvieron efecto vasoconstrictor, ninguna de las cuatro toxinas evaluadas presentó efecto vasodilatador.

Palabras clave:

Centruroides margaritatus, Canales de Potasio, canales HERG1, escorpiotoxinas, Cardiovascular

GLOSARIO

BLAST: Herramienta básica de búsqueda de alineación local

cGMP: Monofosfato de guanosina cíclica

CHO: Células de ovario de Hamster chino

CIBUC: Centro de Investigaciones Biomédicas de la Universidad del Cauca

CMLV: Células del musculo liso vascular

CPK: Fosfato de creatina cinasa

CPK-MB: Fracción MB del fosfato de creatina cinasa

dp/dt_{max} : Índice Doppler máximo

DR: Curva dosis respuesta

EDHF: Factor hiperpolarizante derivado de endotelio

EDRF: Factor de relajamiento derivado endotelial (Oxido Nítrico)

EGTA: Acido aminopolicarboxilico, agente quelante

GC: Gasto cardiaco

γ -KTx: Gamma potasio toxina

HEK: Células embrionarias de riñón humano

HEPES: acido 4-(2 hidroxietil)-1-piperazinetanosulfonico. Buffer

hERG 1: Canal ERG1 humano

IAM: Infarto agudo de miocardio

KCNQ2: Canal de potasio activado por voltaje, miembro 2 de la subfamilia Q

KH: Solución de Krebs Henseleit

KScTx: Escorpio potasio toxinas

MgTx: Margatoxina

minK: Canales de corriente selectiva de potasio

NC-IUPHARM: Comité de la Unión Internacional de farmacología básica y clínica

NO: Oxido Nítrico

PAM: Presión arterial media

PVE: Presión ventricular de eyección

rERG 1: Canal ERG1 rata

ROC: Canales operados por receptor

RVS: Resistencia vascular sistémica

SV: Volumen sistólico o Fracción de eyección

VCcM: Veneno completo o total del escorpión *Centruroides margaritatus*.

VEV: Volumen ventricular de eyección

α -KTx: Alfa potasio Toxina

1. INTRODUCCION

1.1 Generalidades de los escorpiones

Los escorpiones son arácnidos de amplia distribución geográfica, con alrededor de 2200 especies descritas en familias reconocidas en todo el mundo (1), aparecieron en el registro fósil hace casi 450 millones de años durante el período medio Silúrico. Los escorpiones son animales segmentados que muestran una morfología fundamental que incluye cabeza (prosoma), abdomen (mesosoma) y cola (metasoma). Los apéndices principales incluyen pedipalpos quelatos (pinzas), quelíceros (relacionadas morfológicamente con las mandíbulas), pectinas (quimiosensores de contacto), ocho patas (dispuestas en cuatro conjuntos de dos) y un telson (para el suministro de veneno en depredación y defensa) en el ápice de la cola. (figura 1)

Los escorpiones de la familia Buthidae tienen pinzas largas y delgadas en sus pedipalpos, un esternón de forma triangular y una espina característica que es contigua al aguijón. Generalmente su coloración es opaca, a diferencia de otras familias que son de colores brillantes con pinzas robustas y de tamaño moderado, tienen un esternón sub pentagonal y carecen de la espina debajo del aguijón. Los escorpiones del género *Centruroides* se caracterizan por tener cuerpos marrones delgados y patas de color marrón amarillento, presentan entre 8 y 9 filas oblicuas de denticulos en los bordes internos de los dedos y de las tenazas, a diferencia del genero *Tityus* que tienen entre 12 y 17 filas (2) (figura 2).

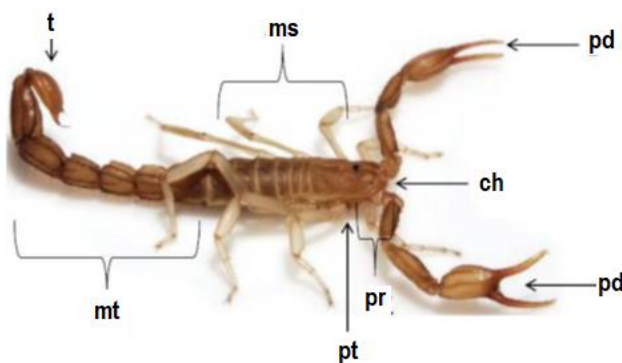


Figura 1. Morfología básica del escorpión. El cuerpo se divide en tres secciones principales, la cola o metasoma (mt); el abdomen o mesosoma (ms); y la región de la cabeza o prosoma (pr); Las estructuras distintivas también se destacan incluyendo pedipalpos (pd); mandíbulas o quelíceros (ch); quimiosensores de contacto (pectinas-pt) y el aparato venenoso o telson (t). Adaptado de Weber *et al*, 2012 (3).

1.2 DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA DE LOS ESCORPIONES.

Los escorpiones son arácnidos de amplia distribución geográfica, con alrededor de 2200 especies descritas en familias reconocidas mundialmente (1). La familia Buthidae tiene los venenos más estudiados debido a su gran toxicidad para humanos y mamíferos (4). Esta familia en Colombia está compuesta por cinco géneros: *Anantheris* (13 especies), *Centruroides* (4 especies), *Microtityus* (2 especies), *Rhopalurus* (1 especie) y *Tityus* (13 especies). Las cuatro especies del género *Centruroides* en Colombia son: *C. edwardsii*, *C. gracilis*, *C. marx* y *C. margaritatus* (5)(6). *Centruroides margaritatus* es una especie marcadamente sinantrópica, que habita ecosistemas áridos y áreas consideradas como bosque seco (7).



Figura 2. Ejemplar de la especie *C. margaritatus*

El género *Centruroides* en América es de los más diversos (alrededor de 40 especies), se distribuye desde el sur de América del Norte, América Central y el Caribe, y se extiende hasta Ecuador y norte de Perú (6). En Colombia *C. margaritatus* se distribuye en dos áreas geográficamente aisladas: la cuenca alta y media del río Cauca (Departamento del Valle del Cauca) y el valle del río Patía (Departamento del Cauca y Nariño) (8), de esta última zona geográfica fueron colectados los individuos objetos de este trabajo (figura 3).

La mayoría de casos de accidentes con escorpiones en el Valle del Patía son atribuidos a este especie, y a pesar de que su veneno es considerado de baja toxicidad (1) presenta una dosis letal 50 (DL₅₀) para ratón de 59.9 mg/kg (5), en humanos produce un cuadro clínico con inflamación y dolor intenso local, fiebre, parestesia lingual y en miembros superiores e inferiores, en algunos casos se reporta vértigo y náuseas asociados a alteraciones de la presión arterial (5)(9)(10).

1.3 EL VENENO DE LOS ESCORPIONES.

El veneno de los escorpiones es una mezcla de diversos componentes moleculares con función que han sido objeto de investigación y que en algunos casos aún son desconocidas (11) (14). Entre los principales componentes de estos venenos encontramos enzimas como la hialuronidasas, fosfolipasas, proteasas con efectos hidrolíticos, péptidos que bloquean o modulan canales iónicos (Na^+ , K^+ , Ca^{2+} o Cl^-), aminoácidos libres, aminas biogénicas, nucleótidos, carbohidratos, lípidos y muchos componentes de pequeño peso molecular de desconocidos (12).

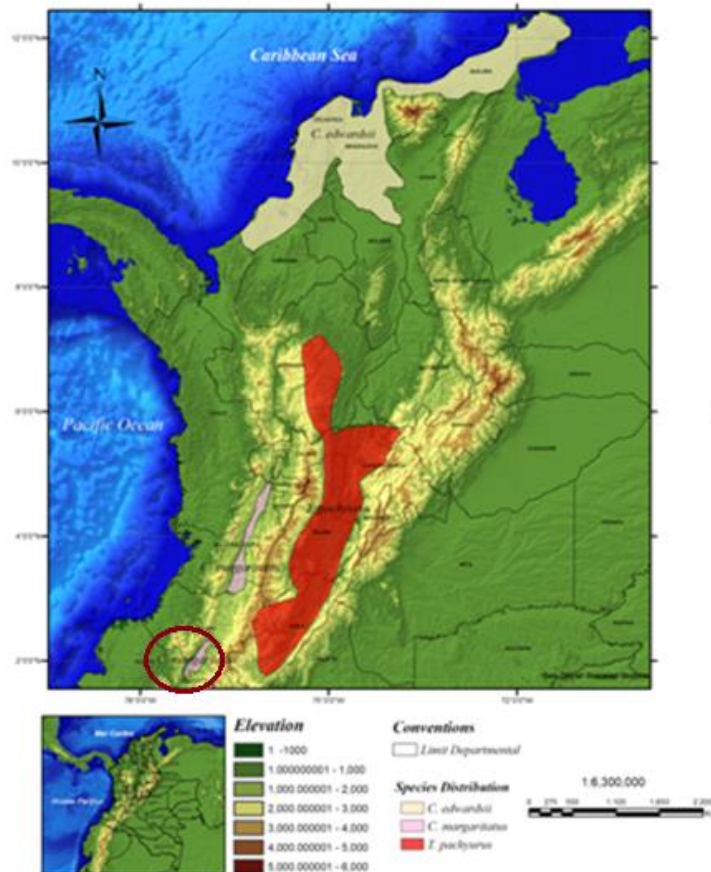


Figura 3. Distribución geográfica y altitudinal de las especies de escorpiones venenosas en Colombia. En círculo rojo zona de colecta de *C. margaritatus*. Tomado de Handbook of Toxinology: Scorpionism and Dangerous Species of Colombia, (Guerrero-Vargas, *et al* 2015)

Los escorpiones de la familia Buthidae producen un veneno compuesto por proteínas y péptidos, tóxicos para el humano, con efecto neurotóxico en membranas excitables y en terminaciones pos ganglionares simpáticas y parasimpáticas, causando alteraciones fisiológicas que pueden ser letales. Entre los péptidos se encuentran tres grandes familias: Los péptidos de cadena corta con 23 a 42 residuos de amino ácidos y con tres a cuatro puentes disulfuro (13), que tienen actividad bloqueadora en los canales de potasio de membranas excitables; los

péptidos de cadena mediana con 61-70 residuos de aminoácidos, con actividad de interferencia en el flujo de ion sodio a través de las membranas, estos se dividen en toxinas tipo α , que interfieren con el cierre del canal sodio y tipo β , que impiden el mecanismo de apertura de los canales de sodio; los polipéptidos de cadena larga con más de 130 residuos de aminoácidos, que actúan sobre la permeabilidad del Ca^{2+} en las membranas excitables sobre el comportamiento intracelular (14)(15). Las principales dianas moleculares de las neurotoxinas de los escorpiones son cerradas a los canales 9 y 10 de sodio (Na^+) y al canal de potasio dependiente de voltaje (Kv). Por lo tanto, las neurotoxinas escorpiónicas actúan principalmente en células excitables de nervios, músculos y glandulares (11)

1.4 EL ESCORPIONISMO

El cuadro clínico producido por la picadura de un escorpión en seres humanos, causado accidentalmente por la inoculación del veneno, con síntomas locales, generales y de pronóstico variable se denomina escorpionismo (16). Cuando se presentan sólo manifestaciones locales, tales como sensación de ardor, equimosis, eritema, comezón, necrosis, parestesia, dolor, hinchazón, hormigueo, se denomina escorpionismo clase I. Si hay manifestaciones locales que no amenazan la vida, como distensión abdominal, agitación, confusión, convulsiones, diarrea, encefalopatía, fasciculación, hematuria, hipertermia, hipotermia, midriasis entre otros, se denomina clase II. En la Clase III se presentan manifestaciones severas, incluyendo signos que amenazan la vida y síntomas representados por falla cardíaca, hipotensión, arritmia ventricular, bradicardia o colapso cardiovascular; falla respiratoria, cianosis, disnea, edema pulmonar y daños neurológicos (16). Puede haber alteraciones electrocardiográficas sugestivas de miocarditis y/o infarto de miocardio, acompañadas de aumento de la CPK-MB (9).

Sin embargo, teniendo en cuenta los cambios observados en diferentes estudios y considerando que algunos de los trastornos clínicos enumerados como clase II puede considerarse severos debido a su naturaleza potencialmente mortal (por ejemplo, convulsiones, encefalopatía, hipertensión arterial, distermias, ataxia, anisocoria o presentación de pancreatitis), se ha propuesto una clasificación para accidentes de picadura de escorpión en Colombia, con miras a aumentar precisión diagnóstica y facilitación de la toma de decisiones por parte de los equipos de salud en cuatro grados: Grado I con manifestaciones locales tales como parestesias, dolor localizado, transpiración, equimosis local, eritema, hiperestesia, sensación de ardor y raramente erupción cutánea. Grado II con manifestaciones sistémicas leves tales como dolor de cabeza, náusea, palidez, sialorrea, emesis aislada, rinorrea, transpiración, odinofagia, espasmos locales. Grado III, con manifestaciones sistémicas moderadas como confusión, agitación sicomotora, ataxia, diarrea, distonía, mioclono. Grado IV con manifestaciones sistémicas severas tales como arritmias ventriculares, hipotensión y bradicardia, colapso cardiovascular y edema pulmonar, compromisos neurológicos y status convulsivo (5).

1.5 EL ACCIDENTE ESCORPIÓNICO EN COLOMBIA

En Colombia, la picadura de un escorpión es un accidente que aún es subestimado por las entidades gubernamentales y por algunos profesionales de la salud; este hecho se refleja en la frecuencia de diagnósticos erróneos, en la administración de medidas terapéuticas inadecuadas, en la falta de programas destinados a prevenir, registrar y mejorar la atención médica de pacientes (5), los registros de estos accidentes no son de reporte obligatorio a la entidad de salud SIVIGILA y tampoco hay la producción de antivenenos específicos (17) a pesar de que en algunas regiones del país se registran niveles altos de incidencia de accidentes con escorpiones, particularmente en departamentos como Caldas, Antioquia, Tolima, Huila, Cundinamarca, Valle del Cauca, Cauca, Santanderes y San Andrés entre otros (6), siendo los niños menores de 15 años el sector más vulnerable de la población con un 32% de las víctimas fatales (18). Junto a ello, muchas de las víctimas utilizan tratamientos caseros y sólo recurren a los cuidados médicos cuando surgen complicaciones (19).

1.6 ESTADO DEL ARTE.

En países Latinoamericanos como Brasil, México, Venezuela y Colombia, así como en países europeos y del medio oriente tales como Arabia, Israel, África entre otros, se han venido realizando diferentes investigaciones relacionadas con venómica, proteómica y efectos fisiopatológicos del accidente producido por las especies escorpiónicas de mayor letalidad. En América Latina se han llevado a cabo estudios sobre efectos cardiovasculares del veneno escorpionico de diferentes especies en humanos y mamíferos, tales como los realizados con el veneno del escorpión brasileiro *Tityus serrulatus* donde se encontraron efectos relacionados con incremento de la presión arterial y de la resistencia vascular periférica con acción vasoconstrictora directa que afecta el flujo renal (20). Utilizando métodos de electrocardiografía, radiografía y eco electrocardiografía se han descrito efectos cardiorrespiratorios y alteraciones de la presión arterial en mamíferos (21). Los datos clínicos de laboratorio han demostrado que el veneno escorpionico genera un incremento en la excreción de catecolaminas, de metabolitos y renina plasmática, siendo además considerable los efectos estimulantes del veneno en el sistema nervioso autónomo (21). Como consecuencia de las picaduras, se han encontrado en pacientes y en animales experimentales alteraciones electrocardiográficas compatibles con miocarditis y alteraciones del sistema de conducción cardíaca, lesiones en miocardio e incrementos de los niveles séricos de CK y CK-MB (22).

Estudios en proteómica de venenos escorpiónicos han logrado determinar la existencia de péptidos que actúan como moduladores de canales iónicos de membrana a los cuales se atribuye la toxicidad del veneno. Estos péptidos se han clasificado según su actividad en: escorpio toxinas de sodio (NaScTx), con masas moleculares entre 6 a 8 KDa(23), escorpio toxinas de potasio (KScTx), con masas moleculares entre 3-5 KDa (24)(25) y péptidos que modulan específicamente los receptores de rianodina (26). En las últimas décadas, se han aclarado muchos

aspectos de la interacción toxina-canal y se han elaborado modelos de diferentes formas de unión de los péptidos del veneno a toxinas (27)(28)(29). Según sus características estructurales y funcionales, las escorpio potasio toxinas KScTx, se ha clasificado en siete subfamilias: α -Ktx, β -Ktx, γ -KTx, δ -KTx, ε -Ktx, κ -KTx y λ -KTx (base de datos de kalium) (30). La familia γ -KTx comprende toxinas que se unen selectivamente a los canales de potasio Kv 10.1 (EAG1), Kv 10.2 (EAG2) y Kv11.1(HERG). Estos canales se expresan en muchos tejidos, pero son especialmente importantes para la repolarización del potencial de acción cardíaca. Las mutaciones en el gen ERG1 son responsables del síndrome de QT largo congénito, un trastorno de la repolarización cardíaca, que se caracteriza por la prolongación del intervalo QT en el electrocardiograma de superficie, ondas T anormales y riesgo de muerte cardíaca repentina debido a arritmias ventriculares (31). El primer miembro de los γ -KTx se aisló del veneno del escorpión *Centruroides noxius* y se denominó CnERG1 (ErgTx1, γ -KTx1.1)(32). Posteriormente, muchas secuencias γ -KTx se identificaron a partir de escorpiones del género *Centruroides* y *Mesobuthus* y la interacción toxina-canal se caracterizó para algunos de estos péptidos (30)(33)(34). Una característica común de estas toxinas es que, a pesar de su concentración, el bloqueo del canal HERG siempre es incompleto (35) y que las γ -KTx aceleran la cinética de cierre debido a su preferencia por el estado cerrado del canal (36). Estos hechos se explican por la interacción de los canales γ -KTx-HERG del tipo "torreta" donde la zona del asa extracelular entre los segmentos transmembrana S5 y S6 del canal interactúa con las hélices alfa de la toxina (37)(38).

Entre los trabajos realizados sobre la composición del veneno de *C. margaritatus*, se ha descrito la margatoxina (MgTx1), un α -KTx de 39 residuos de aminoácidos con tres enlaces disulfuros, identificado como un potente inhibidor del canal Kv1.3 en linfocitos T periféricos humanos (39), posteriormente se descubrió que también es inhibidor de los canales Kv1.1 y Kv1.2 con afinidad similar a la que tiene con Kv 1.3 (40). En un estudio de proteómica del veneno de *C. margaritatus*, se aislaron y caracterizaron otros dos péptidos: un péptido con 24 aminoácidos y 3 puentes disulfuro (M = 2609,15 Da) y un péptido con 30 aminoácidos y 3 puentes disulfuro (M = 3376 Da), ambos clasificados como α KTx (41); sin embargo, no se probó ninguna función de estos péptidos en canales iónicos.

Los trabajos de investigación llevados a cabo en Colombia con la especie *C. margaritatus*, comprenden estudios toxicológicos y clínicos con escorpiones del occidente colombiano (8), tales como la determinación de la DL₅₀ del veneno total, el aislamiento, purificación y evaluación de neurotoxinas existentes en el veneno de la especie del Valle del Patía y la observación de efectos neurotóxicos (42).

El 54% de las toxinas halladas en el veneno de *C. margaritatus*, se encuentran en el intervalo de masas moleculares de 2,5 a 6,0 KDa, correspondiente a toxinas de cadena corta, bloqueadoras de canales de potasio; el 13% se encuentran en el intervalo de 6,5 hasta 8,0 KDa correspondiente a un grupo de toxinas modeladoras de canales para sodio dependientes de voltaje (Nav), el 33% de los componentes

son pequeños compuestos menores a 2,0 KDa que hacen parte de un grupo de moléculas raramente descritas en venenos de escorpiones (42).

A nivel cardiovascular se han realizado trabajos que ha determinado como efectos del veneno total de *C. margaritatus* alteraciones cardíacas provocadas por dosis subletales del veneno en ratas de la cepa Wistar (43), así como respuestas hemodinámicas a dosis subletales del veneno total con un notable efecto hipotensor (44).

1.7 ASPECTOS ÉTICO LEGALES

Esta investigación se llevó a cabo teniendo en cuenta las normas y procedimientos éticos establecidos internacionalmente para el manejo de animales experimentales (National Research Council Institute for Laboratory Animal, 1996). El proyecto de investigación contó con el aval del Comité de Ética en Investigaciones de la Universidad del Cauca, mediante el acta N° 9 del día 14/12/2016 con el código ID 4681. El uso de los individuos experimentales se realizó siguiendo las normas y requerimientos bioéticos del Ministerio de Salud Nacional como lo estipula la resolución 008430 de 1993. La colecta de escorpiones se llevó a cabo a partir del permiso de colecta Institucional No R. 0152 de 02/15/2015 de la Autoridad de Licencias Ambientales ANLA del Ministerio del Medio ambiente de Colombia, otorgado a la Universidad del Cauca.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GENERAL

Caracterizar funcionalmente péptidos bloqueadores de canales de potasio Kv1.X y Kv11.1 aislados del veneno del escorpión *Centruroides margaritatus* (Gervais, 1841) asociados con la actividad cardiovascular de biomodelos murinos.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

2.2.1 Determinar el efecto cardiovascular de tres fracciones cromatográficas del veneno de *C. margaritatus* en biomodelos murinos.

2.2.2 Caracterizar electrofisiológicamente en canales Kv1.X y KV11.1, péptidos de masa molecular entre 2,5 a 6 KDa aislados del veneno de *C. margaritatus*.

2.2.3 Caracterizar bioquímicamente los péptidos con actividad biológica en canales Kv1.X y Kv11.1

2.2.4 Evaluar el efecto vasomotor de los péptidos aislados con actividad en canales iónicos Kv1.X y Kv11.1, en musculo liso vascular de biomodelos murinos

3. MARCO TEÓRICO

3.1 PRINCIPIOS DE HEMODINÁMICA

El estudio del movimiento de la sangre a través de los vasos sanguíneos en sistemas circulatorios cerrados, que obedece a la fuerza impulsora, a la velocidad de circulación, a la resistencia que ofrecen las dimensiones de los vasos, y a las características fisicoquímicas de la sangre se denomina hemodinámica (45). En mamíferos el normal funcionamiento hemodinámico está determinado por las siguientes variables:

3.1.1 Volumen sistólico o Fracción de Eyección (SV)

Denominado también Índice Sistólico de Eyección (IS). Es una de las variables de gran importancia que corresponde al volumen de sangre eyectado con cada latido. En un corazón disfuncional, lo primero en disminuir es el volumen sistólico. Este índice está determinado por la precarga, la poscarga y la contractilidad. Cualquier factor que afecte el volumen sistólico modificará por lo tanto el débito Cardíaco (46). Los factores que afectan a esta propiedad se denominan factores inotrópicos, y al igual que en la frecuencia cardíaca (FC), se consideran positivos cuando aumentan la contractilidad y negativos cuando la disminuyen (47). El volumen sistólico dispone de dos mecanismos diferenciados por la regulación intrínseca del volumen sistólico o mecanismo de Frank-Starling con el cual se determinan:

a) La precarga. Definida como la tensión pasiva que determina en el músculo cardíaco la longitud inicial de las fibras antes de la contracción, es decir, la distensión de las fibras (o volumen diastólico final) que las coloca en su longitud inicial previa a la contracción. Dentro de ciertos límites, existe una relación proporcional entre el incremento de la precarga y la respuesta contráctil del músculo cardíaco, representada por la curva de Starling en la que se define que a mayor volumen diastólico final, mayor volumen sistólico, lo cual garantiza que una mayor afluencia o entrada de sangre al corazón se va a ver compensada por una contracción más enérgica y una salida proporcionalmente también mayor; es decir, el corazón bombea toda la sangre que recibe y ajusta el retorno venoso con el gasto cardíaco (la entrada y la salida dentro de un circuito cerrado). Este comportamiento se conoce como ley de Frank-Starling, la cual explica el equilibrio de gasto cardíaco de los ventrículos derecho e izquierdo (48).

b) La poscarga, es la carga frente a la cual deben acortarse las fibras miocárdicas durante la sístole, es decir, la tensión activa o la carga que debe desplazar el músculo después de iniciarse la contracción. Para el ventrículo izquierdo, la poscarga viene dada por la presión en la aorta (47).

3.1.2 Gasto cardiaco (GC).

Se define como la cantidad de sangre que bombea el corazón hacia la aorta en la unidad de tiempo. Está determinado por el retorno venoso o cantidad de flujo sanguíneo que vuelve desde las venas hacia la aurícula derecha en un minuto. El retorno venoso y el gasto cardiaco deben ser directamente proporcionales, es decir que el gasto cardiaco está determinado por el retorno venoso, sin embargo existen otros factores de la circulación periférica que afectan el flujo de sangre hacia el corazón (47). La Ley de Frank-Starling afirma que cuando aumenta la cantidad de flujo sanguíneo hacia el corazón, se produce un estiramiento de las paredes de las cámaras cardíacas, como consecuencia de ello el músculo cardiaco se contrae con una fuerza mayor (incremento del inotropismo), controlando el exceso de sangre ingresado, y estimulando el nodo sinusal que incrementa la frecuencia cardiaca (aumento del cronotropismo). El estiramiento de la aurícula derecha inicia, además, un estímulo nervioso conocido como reflejo *Brain-Bridge* hacia el centro vasomotor del cerebro retornando a través del sistema nervioso simpático y vago incrementando la frecuencia cardiaca (49). La regulación del gasto cardiaco es la suma de todos los mecanismos reguladores del flujo sanguíneo local, por lo tanto hay una relación inversa entre el gasto cardiaco y la resistencia periférica total, esta relación se entiende como una variante de la ley de Ohm: $GC=P/R$, donde (GC) gasto cardiaco, (P) presión arterial y (R) resistencia periférica total (46). Dos factores determinan que el corazón bombee sangre más de lo normal: La estimulación nerviosa y la hipertrofia del musculo cardiaco; la estimulación simpática y la inhibición parasimpática tiene dos efectos que aumentan la eficacia del bombeo del corazón: el incremento del cronotropismo y el incremento del inotropismo, conocido como aumento de la contractilidad (50). De igual manera, hay factores que disminuyen la capacidad de bombeo de sangre del corazón entre los cuales tenemos: Bloqueo de una o varias arterias coronarias o infarto agudo de miocardio (IAM), Inhibición de la excitación nerviosa del corazón, Incremento de la presión arterial, Miocarditis e Hipoxia cardiaca. Una pérdida súbita de la actividad del sistema nervioso simpático provoca una dilatación de los vasos periféricos de capacitancia, disminuyendo en consecuencia la presión de llenado en el aparato vascular.

3.1.3 Presión Arterial Media (PAM).

Se define como la presión "hidrostática" de la sangre en el interior de las arterias, y depende del bombeo del corazón fluctuando entre valores mínimos diastólicos y máximos sistólicos, se determina mediante el débito cardiaco y la resistencia de las paredes al flujo sanguíneo. La "presión sistólica" se produce cuando la sangre es expulsada del corazón, durante la sístole ventricular. Durante la diástole ventricular, la presión arterial decrece y representa la "presión arterial diastólica". La diferencia entre ambas recibe el nombre de presión diferencial o PAM (51).

La fuerza de eyección ventricular o presión sistólica, determina la presión con la cual la sangre fluirá por las arterias, se determina mediante el débito cardiaco

(potencia de bombeo) y la resistencia de las paredes al flujo sanguíneo. La “presión sistólica” se produce cuando la sangre es expulsada del corazón, durante la sístole ventricular. Durante la diástole ventricular (fase de relajación), la presión arterial decrece y representa la “presión arterial diastólica”. La diferencia entre ambas recibe el nombre de presión diferencial o presión arterial media, parámetro hemodinámico de gran importancia en la valoración de las alteraciones del sistema cardiovascular (52).

3.1.4 Índice Doppler (dP/dt).

Es un indicador hemodinámico de la función ventricular del periodo pre-eyectivo, diferente de la fracción de eyección o la fracción de acortamiento, que son índices del periodo eyectivo. Es la variación de la presión de eyección del ventrículo respecto al tiempo, clásicamente definido como dP/dt. Teóricamente la dP/dt ocurre en el intervalo de tiempo desde el cierre de la válvula mitral hasta la apertura de la válvula aórtica, en el periodo de tiempo denominado contracción isovolumétrica o isométrica (53). El valor del dP/dt máximo está influenciado por la pre y poscarga, sin embargo su utilización sigue siendo útil en la caracterización del nivel inotrópico cardíaco.

3.2 EL RITMO CARDIACO

El ritmo sinusal es el ritmo normal del corazón, producido por la estimulación desde el nodo sinusal de ambas aurículas hasta el nodo Auriculo-ventricular y posterior conducción a ventrículos por el Haz de His y ramas siguientes. Se caracteriza por presentar: Onda P positiva en derivaciones II, III y aVF y precordiales V2 a V6, negativa en aVR y con frecuencia isobifásica en V1; cada onda P va seguida de un intervalo QRS; en este ritmo el intervalo RR debe ser constante; el intervalo PR debe ser mayor a 0,12 segundos y la frecuencia cardíaca debe estar entre 60 y 100 latidos por minuto en humanos (54). Para el caso de modelos murinos experimentales estos valores son mayores y corresponden a frecuencias cardíacas de 300 ± 20 latidos por minuto (51)

Las arritmias cardíacas son debidas a anomalías en la formación del impulso o en su propagación dando lugar a un cambio del ritmo sinusal. Normalmente la actividad física intensa, el estrés, el aumento de la temperatura corporal, el hipertiroidismo, etc. ocasionan taquicardia sinusal; cuando la frecuencia cardíaca disminuye por debajo del límite normal sucede la bradicardia sinusal. En ambos casos el ritmo es regular. Cuando se forman impulsos ectópicos diferentes al nodo sinusal, en las aurículas o en el nodo aurículo ventricular o en el ventrículo, se forman arritmias debidas a extrasístoles (ES) auriculares, nodales, o ventriculares, respectivamente. En la ES auricular la onda P está deformada pero el complejo QRS es normal. En ES nodales la estimulación de las aurículas se realiza en forma retrógrada, en este caso, la onda P es negativa y queda enmascarada por el complejo QRS o aparece después del mismo. En la ES ventricular el intervalo entre

la onda R y la siguiente onda R normal se alarga el tiempo necesario para que el impulso se desplace desde el foco al nódulo sinusal (55) (56). Las arritmias son debidas también a alteraciones en la conducción del nódulo aurículo ventricular (bloqueo AV) o en las ramas del haz de His (bloqueo de rama derecho o izquierdo). En ocasiones, las alteraciones de la conducción Aurículo ventricular están causadas por un tono vagal excesivo y por alteraciones orgánicas del nódulo AV y/o del sistema de conducción ventricular. Se conocen tres formas de bloqueo: Bloqueo AV de 1° grado: Aparece cuando la conducción a través de nódulo AV anormalmente lenta con un intervalo PQ alargado. El Bloqueo AV de 2° grado, se caracteriza por una conducción AV intermitente, a algunas ondas P no les sigue un complejo QRS. En el bloqueo AV de 3° grado existe un bloqueo total que provoca una parada cardiaca temporal, en este caso suelen asumir el ritmo marcapasos ventriculares con una frecuencia más baja dando lugar a una disociación total o parcial del complejo QRS respecto a la onda T (54)(57).

Las variaciones en las concentraciones de K^+ y Ca^{2+} en el suero, pueden dar lugar a alteraciones en la excitación del miocardio y por tanto alteraciones en el ECG. Cuando la concentración de K^+ se eleva por encima de 6,5 mmol/l, la onda T es más alta y puntiaguda, y la propagación de la excitación se torna defectuosa manifestada en un PQ amplio y un QRS más ancho. En casos extremos se puede producir un paro cardiaco. Con una concentración de K^+ por debajo de 2,5 mmol/l, el segmento ST se halla deprimido y la onda T aparece bifásica con la aparición de una onda U positiva adicional. Una elevación en la concentración de Ca^{2+} por encima de 2,75 mmol/l, ocasiona que la duración del intervalo QT se reduzca, y una concentración de Ca^{2+} por debajo de 2,25 mol/l la duración del segmento QT aumenta(58)

3.3 HISTOLOGÍA CARDIACA

La organización estructural de la pared del corazón es continua en las aurículas y los ventrículos. La pared cardiaca está compuesta por 3 capas que de afuera hacia adentro son: Epicardio, capa de células mesoteliales en la superficie externa del corazón y su tejido conjuntivo subyacente, los vasos sanguíneos y los nervios que irrigan e inervan el corazón transcurren en el epicardio y están rodeados por tejido adiposo que ejerce una acción amortiguadora para el órgano en la cavidad pericárdica. El Miocardio, formado por musculo cardiaco, el componente principal del corazón, es sustancialmente más grueso que el de las aurículas a causa de la gran cantidad de musculo cardiaco presente en las paredes de las dos cavidades bombeadoras. El Endocardio, consta de una capa interna de endotelio y tejido conjuntivo subendotelial, una capa media de tejido conjuntivo y células musculares lisas, y una capa externa de tejido conjuntivo, también llamada capa subendocárdica que es continua con el tejido conjuntivo del miocardio; el sistema conductor de impulsos del corazón está ubicado en la capa subendocárdica del endocardio. (47).

El miocito se define como una célula del tejido muscular que constituye el elemento contráctil básico del músculo gracias a la abundancia en su citoplasma de miofibrillas con capacidad contráctil. Los miocitos cardíacos poseen un núcleo

grande y oval situado en la parte central y se caracterizan por la presencia de uniones altamente especializadas denominadas discos intercalares, los cuales se tiñen intensamente con la hematoxilina férrica. La membrana de los miocitos se denomina sarcolema y el citoplasma se llama sarcoplasma. Los miocitos contienen las organelas típicas de una célula, destacándose la presencia de un sistema de retículo sarcoplasmático liso muy desarrollado y en su interior se acumula gran cantidad de calcio unido a proteínas llamadas calsecuestrina y calreticulina. Las estructuras formadas por el túbulo T y la cisterna que está a su lado se llaman díadas, siendo una de las principales características de estas células la presencia de bandas, algunas oscuras Banda A y otras claras Bandas I, que se repiten continuamente a lo largo de la miofibrilla y cuya unidad funcional es la sarcómera.

Una sarcómera está compuesta por diferentes tipos de filamentos: Los gruesos o miosina, proteína formada por 6 cadenas polipeptídicas: 2 cadenas ligeras esenciales, 2 cadenas ligeras reguladoras y 2 cadenas pesadas, cuyos dominios amino-terminales forman una estructura globular, llamada cabeza de la miosina, donde se van a unir las 4 cadenas ligeras. Los filamentos delgados: compuestos por 3 tipos de proteínas: la actina, que forma una doble hélice a partir de la actina G; la tropomiosina que también tiene forma de hebra y se asocia a cada uno de los monómeros de la actina y la troponina, que está constituida por tres subunidades distintas: la troponina T (TnT) que se une a la molécula de tropomiosina; la troponina I (TnI) que está unida a la actina, en una posición que bloquea los centros de unión que existen en la actina para la miosina y la troponina C (TnC), la cual tiene dos dominios: uno de ellos, sería el correspondiente a la terminal amino y el otro a la terminal carboxilo. En cada uno de los dominios existen dos centros de unión al Ca^{+2} , más tres filamentos intermedios como la titina, la desmina y la vimentina. La titina es una proteína fibrosa, una de las más largas que se conoce. Actúa como un muelle y tiene una secuencia de aminoácidos que permite que se produzcan las contracciones y se relaja en cuanto finaliza la contracción muscular (47), (59).

3.4 ISOENZIMAS CARDIACAS CK, CK-MB Y TROPONINAS CARDIACAS

La Creatina fosfoquinasa (CPK) es una enzima dimérica con un peso molecular de 86.000 Da, presente en músculo cardíaco y estriado. Debido a su tamaño es transportada por los linfáticos cardíacos al plasma, generando un retraso entre la lesión y el aumento de la concentración que ocurre entre 3 a 8 horas, con un pico máximo a las 12-24 horas y retorno al nivel normal entre 3-4 días. CPK ha sido el marcador más utilizado en el diagnóstico de las alteraciones miocárdicas y del musculo esquelético, es una enzima localizada en el citoplasma de la musculatura estriada donde cataliza la fosforilación de la creatina a creatina fosfato. Ante un proceso de necrosis miocárdica, la creatincinasa se detecta por encima de su valor superior de referencia a partir de las 4-6 horas de inicio de los síntomas isquémicos. La creatincinasa total no es cardio específica y sus intervalos de referencia son variables. Posee 3 subunidades que en forma dimérica constituyen la enzima funcional, una de ella es la subunidad MB. Entre un 20% y 30% de la creatincinasa total corresponde a la musculatura cardiaca y está determinada por la CK-MB, por

lo que la determinación de esta fracción mejora notablemente la cardiospecificidad y ha representado el método de referencia del diagnóstico biológico de la necrosis. La CK-MB empieza a detectarse en el plasma a partir de las 4 horas de inicio de los síntomas y permanece elevada durante 24-36 h. Debido a esta rápida elevación y caída puede utilizarse para detectar un pre infarto posterior días (60).

La Troponina es una proteína que colabora en el acoplamiento actina-miosina que se produce durante la contracción muscular. Comprende tres subunidades denominadas troponina T, troponina I y troponina C. Las troponinas I y T presentes en el músculo cardíaco, presentan unas características peculiares, y se han desarrollado técnicas de inmuno análisis específicas para su detección que no presentan reactividad cruzada alguna con las formas de troponina T y troponina I existentes en el músculo esquelético (61). La troponina I (TnIc) es una proteína de masa molecular de 21.000 Da y, al igual que la TnTc está localizada en las miofibrillas del músculo cardíaco; produce la contracción miocárdica por unión con la actina en ausencia de calcio. A pesar de que el 6% se encuentra libre en el citosol, luego de un evento coronario agudo se eleva a las 4-6 horas, hace su pico a las 12-18 horas y continúa elevada hasta durante 6 días (62)

3.5 CANALES DE POTASIO DEPENDIENTES DEL VOLTAJE (K_v)

Los canales K_v pueden considerarse como los más grandes y diversos grupos de canales iónicos. Se distribuyen en el sistema nervioso y otros tejidos, especialmente en células excitables como neuronas, cardiomiocitos y músculos constituyendo una familia diversa que se agrupa en 12 subfamilias, representados por unos 70 loci en el genoma de mamíferos (40 genes humanos codifican canales de potasio) (63).

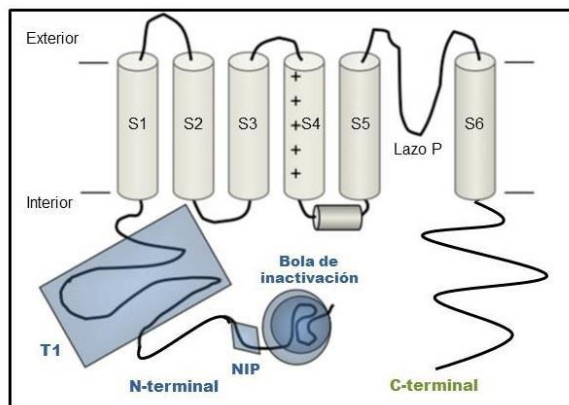


Figura 4. Esquema de la estructura y los dominios funcionales del extremo N-terminal de los canales K_v . Se muestran los seis segmentos transmembrana (S1-S6) con sus extremos N y C-terminal localizados hacia el citoplasma. Los segmentos S5 y S6 están unidos por el lazo P. El segmento S4 contiene cargas positivas. En el extremo amino terminal se incluye: la “bola de inactivación” responsable de la inactivación de tipo N, el dominio NIP que evita esta inactivación rápida y el dominio T1 de tetramerización con otras subunidades α . Modificado de Barros *et al*, 2012.

Los canales Kv tienen una amplia gama cinética, estructural, farmacología y propiedades de regulación. Selectivamente transportan iones K^+ a través de la membrana celular, donde juegan un papel clave en una amplia variedad de procesos fisiológicos que regulan la excitabilidad y fisiología celular no excitable, como regulación del latido cardíaco, contracción muscular, liberación de neurotransmisores, secreción hormonal, transducción de señales y proliferación celular (64).

Estructuralmente estas proteínas transmembrana, están formadas por cuatro subunidades α similares o idénticas, aunque también pueden contener subunidades β auxiliares que determinan la función del canal y/o la localización. Cada subunidad que forma los poros de los canales Kv contiene seis segmentos transmembrana (S1-S6), los primeros cuatro (S1-S4) constituyen el sensor de voltaje y los otros dos (S5-P-S6) forman el dominio de poro (figura 4) (65). Su activación permite que la célula se repolarice después del disparo del potencial de acción reduciendo la excitabilidad, mientras que la inhibición del canal aumenta la excitabilidad (66).

3.5.1 Diversidad de canales de potasio dependientes de voltaje (Kv)

Los canales iónicos de K^+ se han clasificado partiendo de su estructura molecular así: La clase 2TM-1P, denominada así por tener dos segmentos transmembrana (TM) unidos por un lazo P, está representada por los canales de potasio que presentan rectificación interna (Kir). La clase 6TM-1P, es la más numerosa y sus canales están formados por seis segmentos transmembrana (S1-S6) y un lazo P que une los segmentos S5 y S6, en esta clase se incluyen los canales de potasio (Kv). La clase 8TM-2P que es un híbrido entre las dos anteriores y la clase 4TM-2P, también conocidos como canales de fuga, que son diana de diversos anestésicos (figura 5)(67)

El genoma humano contiene aproximadamente 80 genes de canales de potasio de los cuales 40 genes codifican subunidades formadoras de poros del canal de potasio que se dividen en 12 subfamilias (figura 6). La familia 6TM de canales K^+ comprende las subfamilias Kv reguladas por voltaje, la subfamilia EAG (que incluye canales hERG), la subfamilia Slo activada por Ca^{2+} (con 7TM, denominada BK) y la subfamilia SK activada por Ca^{2+} y Na^+ (Nomenclatura NC-IUPHAR). Estos canales poseen una subunidad α formadora de poros que comprende tetrámeros de subunidades idénticas (homoméricas) o de subunidades diferentes (heteroméricas). Los canales heteroméricos solo se pueden formar dentro de las subfamilias, por ejemplo: Kv1.1 con Kv1.2; Kv7.2 con Kv7.3 y KCNQ2 con KCNQ3.

Las subfamilias Kv1.x, Kv2.x, Kv3.x y Kv4.x se encuentran en vertebrados y son homólogos de los canales codificados por Shaker, Shal, Shab y Shaw, respectivamente. La familia Kv1.x constituye el principal objetivo de toxinas de origen animal, en particular toxinas de escorpión. En tanto en las células excitables como las no excitables, los canales Kv también juegan un papel importante en la señalización de Ca^{2+} , regulación de volumen, secreción, proliferación, migración y constituyen posibles objetivos de drogas para el tratamiento de diversos procesos

de enfermedades que van desde el cáncer hasta enfermedades autoinmunes a metabólicas, neurológicas y trastornos cardiovasculares (65)

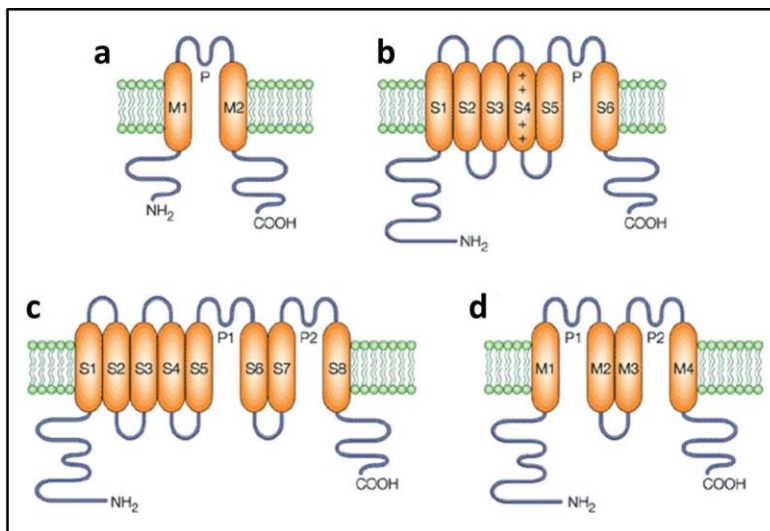


Figura 5. Las cuatro clases principales de canales de potasio. **a.** 2TM-1P (contienen 2 segmentos transmembrana (TM) unidos por un lazo P), corresponden a los canales Kir y a los bacterianos como el KcsA. **b.** 6TM-1P, se corresponden con la mayoría de canales regulados por voltaje. **c.** 8TM-2P, son híbridos de los dos anteriores. **d.** 4TM-2P, consisten en dos repeticiones de canales 2TM-1P, 8TM-2P y 4TM-2P que probablemente se ensamblan como dímeros para formar el canal. Tomado de Choe, 2002 (67)

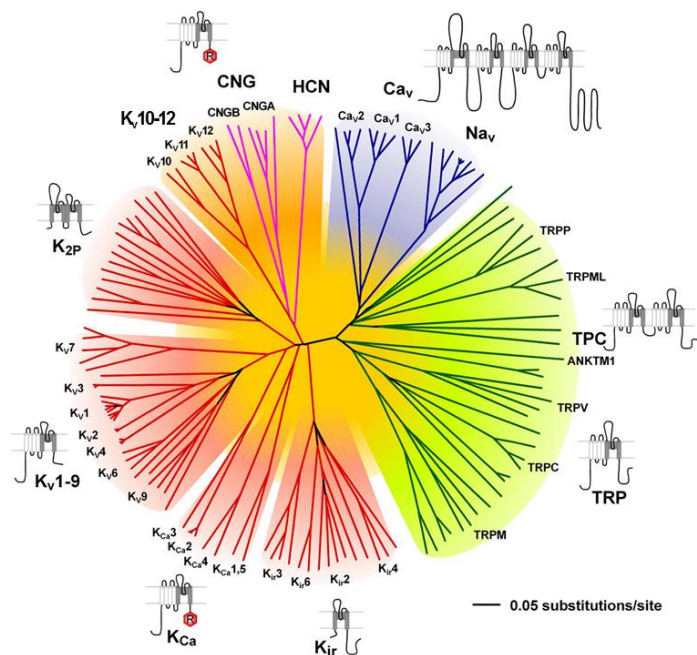


Figura 6. Representación de las relaciones de secuencia de aminoácidos de las regiones de poros de la superfamilia de canales iónicos activados por voltaje. (Science's STKE, 2004)

3.5.2 Canales K_v en células de musculo liso vascular y cardiomiocitos

La regulación de la contractilidad de las células del musculo liso vascular (CMLV) y de los cardiomiocitos, está determinada fundamentalmente por el suministro de Ca²⁺ desde el retículo sarcoplasmático (RS) de las células y del fluido extracelular, para permitir la formación de puentes cruzados, en CMLV mediante acoplamiento mecánico o farmaomecánico que incluyen una serie de mecanismos de señalización y en cardiomiocitos mediante potenciales de membrana.

Tabla 1. Presencia de canales iónicos K_vx en miocitos cardiacos, endotelio y CMLV y su función o características cinéticas en células humanas (Xh) y en células de rata (Xr).

TIPO DE CANAL		Miocitos	Endotelio	CMLV	Función o característica cinética
Kv 1x	1.1	Xr		Xr	Mantenimiento del Vm
	1.2	Xr			Mantenimiento del Vm
	1.4	Xh, Xr		Xr	Hiperpolarización tardía o repolarización temprana
	1.5	Xh, Xr			Activación ultrarrápida I _{Kur} de corrientes en el corazón
	1.6			Xr	Regulador del potencial de membrana
	1.7	Xr			Propiedades similares a activación ultrarrápida I _{Kur} de corrientes en el corazón
Kv2x	1.8	Xh		Xh	No definido
	2.1	Xr		Xr	No definido
	2.2			Xr	No definido
Kv 3x	3.2			Xr	No definido
	3.3	Xh			No definido
Kv 4x	4.1	Xh, Xr			No definido
	4.3	Xh, Xr			Repolarización del PA cardiaco
Kv 5x	5.1	Xh, Xr			Modificación de las propiedades gating de los canales Kv2.1 y Kv2.2
Kv6x	6.1	Xh			No actúa solo, suprime corrientes de Kv2.1
	6.2	Xh		Xh	Coensamble con Kv 2.1
	6.3			Xh	Coensamble con Kv 2.1
Kv7x	7.1	Xh, Xr		Xr	Repolarización del PA cardiaco
	7.5			Xr	KCNQ5 está expresado en células del músculo liso vascular
Kv9x	9.3	Xr		Xr	No definido
Kv10x	10.1	Xh			No definido
	10.2	Xh			No definido
Kv 11x	11.1	Xh			Repolarización del PA cardiaco y contractilidad del músculo liso
		(hERG)			

En estos procesos fisiológicos de la regulación vasomotora y de contractilidad cardiaca, de los canales K_v va a depender el potencial de membrana (Vm) celular, el cual constituye una propiedad bioeléctrica importante en el proceso. Los valores de voltaje de membrana (Vm) de reposo en las CMLV y en los cardiomiocitos son

una consecuencia de los flujos de cargas positivas o negativas a través de canales iónicos de la membrana plasmática en función del gradiente electroquímico y de la permeabilidad de la membrana para cada ion. Existen diferentes tipos de canales Kv en la regulación y mantenimiento del Vm en estas células. La activación de estos canales produce hiperpolarización de la membrana celular (y relajación vascular), mientras que su inhibición despolariza la misma, desencadenando la contracción vascular. En la tabla 1 se describe brevemente la función fisiológica o la característica cinética de los canales Kv encontrados en CMLV y en cardiomiocitos, a partir de los cuales se llevó a cabo esta investigación.

3.6 LAS ESCORPIOTOXINAS Y SU ACTIVIDAD EN CANALES IÓNICOS.

Las toxinas escorpiónicas han revelado mucho sobre la estructura del canal de Potasio y la correlación entre las mutaciones, la regulación alterada y un número de patologías humanas. Estudios sobre isoformas de toxinas con biomarcadores han contribuido a estudios de localización de subtipos de canales en células de expresión, y se han usado además en ensayos de desplazamiento competitivo para la identificación de nuevos ligandos para investigación en medicina. Las toxinas quiméricas han sido diseñadas a partir de múltiples andamios peptídicos para investigar la especificidad de la isoforma del canal, mientras que la quimerización avanzada del epítipo ha ayudado en el desarrollo de terapéuticas moleculares novedosas (3).

Los escorpiones de la familia Buthidae producen un veneno compuesto por proteínas y péptidos tóxicos para el humano, con efecto neurotóxico en membranas excitables y en terminaciones pos ganglionares simpáticas y parasimpáticas, causando alteraciones fisiológicas que pueden ser letales. Entre los péptidos se encuentran tres grandes familias: Los péptidos de cadena corta, 23 a 42 residuos de amino ácidos con tres a cuatro puentes disulfuro(13), que tienen actividad bloqueadora en los canales de potasio de membranas excitables; los polipéptidos de cadena mediana (con 61-70 residuos de aminoácidos), con actividad de interferencia en el flujo de ion sodio a través de las membranas, estos se dividen en toxinas tipo α , que interfieren con el cierre del canal sodio y tipo β , que impiden el mecanismo de apertura de los canales de sodio; Los polipéptidos de cadena larga con más de 130 residuos de aminoácidos, actúan sobre la permeabilidad del Ca^{2+} en las membranas excitables sobre el compartimento intracelular(14)(13)(29). También se han encontrado péptidos que modulan específicamente canales de Ca^{2+} sensibles a rianodina (68).

En un trabajo reciente se encontró que el veneno de la especie *C. tecomanus* contiene 4 diferentes péptidos compuestos por 32 a 39 residuos de aminoácidos, con 3 puentes disulfuro, que alteran la función normal de los canales iónicos Kv1.2, Kv1.1, Kv1.3, Shaker y Kca3.1, en concentraciones nM. Estos pertenecen a la conocida familia de α -KTx de péptidos escorpiónicos y un péptido con 42 residuos de aminoácidos con 4 puentes disulfuro perteneciente a la familia γ -KTx bloqueador del canal ERG, el cual juega un rol clave en el potencial de acción cardiaco (69)

(figura 7). Existen también investigaciones en la especie *Tityus serrulatus*, responsable de muchos accidentes de relevancia médica en Brasil en el estudio de KTx en interacción directa con la Kv1.3, y 125I-KTx en sinaptosomas de cerebro de rata.

Las escorpiotoxinas representan un numero amplio de péptidos de importancia farmacológica las cuales han sido investigadas por su acción directa en canales iónicos de sodio (Na^+), potasio (K^+), cloruro (Cl^-) y calcio (Ca^{2+}) y sus patologías asociadas. Entre ellas las toxinas para canales de potasio tienen un amplio potencial terapéutico para el tratamiento de diferentes enfermedades como asma, diabetes, angina, isquemia cardiaca e hipertensión, inflamaciones crónicas daños autoinmunes y cáncer (3). Las neurotoxinas del veneno escorpiónico están conformadas por péptidos de cadena larga que afectan los canales de Na^+ y péptidos de cadena corta que afectan canales de K^+ y de Cl^- en células de membranas excitables y no excitables (70).

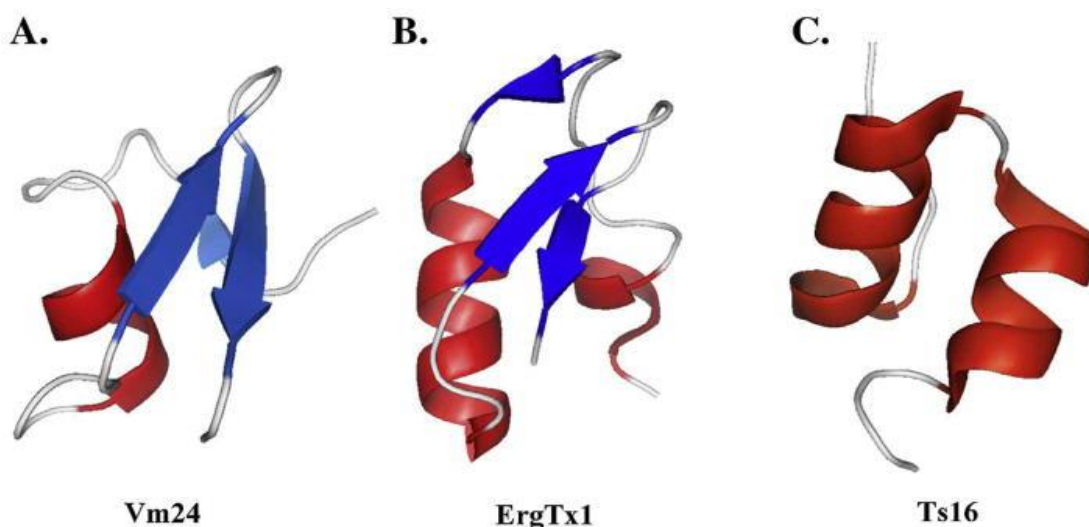


Figura 7. Ejemplos de estructuras terciarias de toxinas Kv: (A) subfamilia α -KTx23 (Vm24; pdb 2K9O), (B) subfamilia γ -KTx1 (ErgTx1; pdb 1PX9) y (C) subfamilia α -KTx20 (Ts16 ; pdb 2LO7). La última toxina tiene un motivo CS $\alpha\alpha$, típico de los κ -KTx, sin embargo, se clasificó por su secuencia primaria dentro de la familia α -KTx. Las estructuras se exhibieron con Pymol (www.pymol.org) y se mostraron en rojo la hélice α y en azul las hojas β .

Estas toxinas están conformadas estructuralmente por una alfa hélice conectada a una doble o triple hoja beta estabilizada por puentes disulfuro. Las potasio escorpio toxinas (KScTx) son péptidos de cadena corta que comprenden 23-42 residuos de aminoácidos con 3-4 puentes disulfuro (71). Estas se clasifican como toxinas α -KTx, la mayoría de las cuales bloquean el cierre de los canales de potasio activados por voltaje (kv) mediante una interacción directa con el poro del canal (72). Sin embargo, hay informes de algunas toxinas que carecen de la diada, pero mantienen una unión de alta afinidad con los canales kv (73).

Otro grupo de toxinas relacionadas con los canales de potasio son las denominadas β -KTx, con 61-75 residuos de aminoácidos. Estas toxinas comprenden péptidos de las familias escorpiónicas Buthidae y Caraboctonidae (71) y se pueden subdividir en tres clases (74): los péptidos relacionados con TsTXKb (TstbKTx), caracterizados como bloqueadores del canal kv; los péptidos relacionados con BmTXKb, un bloqueador transitorio de la corriente externa de K^+ en miocitos auriculares de conejo y los péptidos relacionados con las escorpinas, un grupo de defensinas antimicrobianas (75). Estos péptidos contienen seis cisteínas que forman tres puentes disulfuro, y presentan dos dominios estructurales: un supuesto N terminal helicoidal y un C terminal rico en Cys, que participa en el efecto de bloqueo del canal de potasio (76).

3.7 FISIOLÓGÍA DE LA ACTIVIDAD VASOMOTORA

Los procesos vasomotores de las CMLV, se inician a partir de las modificaciones de concentración del Ca^{2+} libre intracelular que se encuentra desde 10^{-7} M cuando el músculo está relajado hasta 10^{-6} M en la contracción máxima. Estos procesos se resumen en los siguientes pasos (47)

- 1) Incremento del Ca^{2+} intracelular desde el Retículo Sarcoplasmático (RS) o desde el exterior celular, el cual forma un complejo con la proteína calmodulina.
- 2) El complejo calmodulina- Ca^{2+} activa la enzima miosina de cadena ligera de cinasa.
- 3) Esta enzima causa fosforilación por el trifosfato de adenosina (ATP) de la proteína de cadena ligera en la miosina.
- 4) Esta fosforilación permite la formación de un puente cruzado y de la tensión y acortamiento del músculo utilizando energía celular ATP.

El potencial de membrana en reposo del músculo liso se encuentra entre -40 a -65 mV, valor que está relacionado con la permeabilidad celular al potasio, a través de los canales de membrana para este ión. Un tipo de canal es el rectificador interno de K^+ que permite que los iones de K^+ se desplacen más fácil y rápidamente hacia el interior celular de lo que se mueven hacia afuera. Existen canales de K^+ dependientes de ATP que permanecen cerrados cuando las cifras de ATP celular son normales, pero se abren cuando estas cifras bajan. Un potencial de acción en el músculo liso se inicia en la corriente interior del Ca^{2+} que es despolarizante y que fluye a través de un canal de calcio operado por voltaje (VOC). La fase de repolarización del potencial de acción ocurre por un flujo hacia fuera de los iones de potasio y a través de los dos canales: de K^+ retrasados y canales de K^+ activados por calcio(46).

El acoplamiento electromecánico del músculo liso se produce debido a que la membrana en la superficie del músculo liso contiene canales que operan por voltaje

para el calcio (los mismos VOC que están implicados en la generación del potencial de acción). La despolarización de la membrana aumenta la probabilidad de estado abierto de estos canales y, de este modo, surge la contracción celular del músculo liso y la constricción de los vasos. Por el contrario, la hiperpolarización de la membrana conduce a la relajación del músculo liso y a la dilatación de los vasos. Debido a que los VOC para Ca^{2+} se activan de manera parcial por el bajo potencial de membrana en reposo del músculo liso vascular, los cambios en el potencial en reposo pueden alterar la velocidad de afluencia del calcio en reposo y, por tanto, el estado contráctil basal. (50)

Con el acoplamiento farmacomecánico, neurotransmisores, fármacos o sustancias bioquímicas pueden inducir la contracción del músculo liso sin la necesidad de un cambio en el potencial de membrana. La combinación de un agonista vasoconstrictor por ejemplo con un receptor de membrana adrenérgico inicia eventos que causan que los niveles de Ca^{2+} libre intracelular aumente por dos razones. La primera, el receptor activado puede abrir los canales operados por receptor (ROC) de la membrana para el Ca^{2+} , permitiendo la salida de Ca^{2+} del líquido extracelular. La segunda, el receptor activado puede inducir la formación de un “segundo mensajero” como el trifosfato de inositol (IP3), que abre los canales específicos que liberan Ca^{2+} de los almacenes de RS intracelular. En ambos procesos, el receptor activado estimula primero las proteínas específicas de unión del trifosfato de guanosina o “proteínas G” que representan un primer paso general a través del cual la mayor parte de los receptores de membrana operan para iniciar su cascada particular de eventos que al final ocasionan respuestas celulares específicas. Casi todos los fármacos vasoactivos causan cambios en el potencial de membrana porque sus receptores se pueden vincular, por las proteínas G o por otros medios, a muchos canales iónicos (46).

La hiperpolarización de la membrana celular es un mecanismo que existe para la relajación del músculo liso y la dilatación de los vasos. Sin embargo, hay otros mecanismos farmacomecánicos por los que algunos vasodilatadores pueden causar la relajación del músculo liso. Existen otros receptores específicos que se vinculan por otras proteínas G específicas a otras enzimas que producen segundos mensajeros diferentes de IP3, por ejemplo, el receptor adrenérgico β_2 presente en las arteriolas del músculo esquelético y el hígado. Los receptores β_2 no están innervados, pero algunas veces se activan por las cifras anormalmente elevadas de adrenalina circulante. El receptor β_2 se vincula al adenilato de ciclase (Gs), una proteína G particular que cataliza la conversión de ATP a monofosfatasa de adenosina cíclica (cAMP).

El aumento de cifras intercelulares de cAMP causa activación de la proteincinasa A, una enzima fosforilante que, a su vez, causa fosforilación de las proteínas en muchos lugares. El resultado total es la estimulación de la salida de Ca^{2+} , la hiperpolarización de la membrana y la disminución de la sensibilidad de la maquinaria contráctil a Ca^{2+} lo cual produce de manera sinérgica vasodilatación. Además de la adrenalina, la histamina y el péptido intestinal vasoactivo son sustancias vasodilatadoras que actúan a través de la vía de cAMP. Además, el

monofosfato de guanosina cíclica (cGMP) representa un importante segundo mensajero intracelular que causa relajación del músculo liso vascular por mecanismos que aún no están claros. El óxido nítrico (NO) es una sustancia vasodilatadora importante que opera a través de la vía de cGMP, pueden producirlo las células endoteliales y también los nitratos, una clase clínicamente importante de medicamentos vasodilatadores. El NO es gaseoso y se difunde con facilidad en las células del músculo liso, activando la enzima guanililciclase, que, a su vez, causa la formación de cGMP desde GTP (47)(46).

Las células endoteliales tapizan toda la superficie interna del sistema cardiovascular, ocasionando que los vasos sanguíneos respondan de manera muy diferente a algunas influencias vasculares cuando falta el endotelio, por ejemplo, la acetilcolina produce vasodilatación en los vasos íntegros y vasoconstricción en los vasos sin endotelio. Las células endoteliales responden a varios estímulos y producen un factor local que disminuye el tono del recubrimiento de las capas del músculo liso. El NO originalmente llamado factor de relajamiento derivado endotelial (EDRF), se produce en las células endoteliales a partir del aminoácido L-arginina y por la acción de la enzima, la sintasa del óxido nítrico. Enzima que es activada cuando hay una elevación en el nivel intracelular de Ca^{2+} . El NO, es una molécula lípido-soluble que, una vez formada, se difunde con facilidad en las células del músculo liso adyacente causando relajación y estimulando la producción de cGMP. Agentes como la acetilcolina, la bradisinina, el péptido intestinal vasoactivo y la sustancia P, estimulan la producción de NO de las células endoteliales, porque sus receptores en estas células se vinculan a los canales de Ca^{2+} operados por receptor. Los agentes que bloquean la producción de NO por medio de la inhibición de la sintasa del óxido nítrico causan aumentos significativos en las resistencias vasculares de casi todos los órganos en reposo. Por esta razón, se cree que las células endoteliales producen siempre, por lo general, algo de NO que está implicado de manera muy importante, junto con otros factores, en la reducción del tono neto normal en descanso de las arteriolas en todo el cuerpo (46)(77).

3.8 FÁRMACOS RELACIONADOS CON LA ACTIVIDAD VASOMOTORA EN CMLV.

Las células endoteliales producen otros agentes vasoactivos que actúan de manera local, tales como el “factor hiperpolarizante derivado de endotelio” (EDHF), la prostaciclina (PGI_2), y la endotelina A. Las prostaglandinas y el tromboxano son un grupo de productos químicos que se relacionan con la ruta de la ciclooxigenasa del metabolismo del ácido araquidónico. Algunas prostaglandinas son potentes vasodilatadores que se involucran en las respuestas inflamatorias. Los metabolitos del ácido araquidónico producidos vía el sistema de lipoxigenasa (p. ej., los leucotrienos) también tienen propiedades vasoactivas, y pueden influir en el flujo sanguíneo y la permeabilidad vascular durante el proceso inflamatorio.

Histamina se sintetiza y almacena en concentraciones elevadas en los gránulos secretorios de las células cebadas del tejido y los basófilos circulantes, cuando es

liberada, produce vasodilatación arteriolar (a través de la vía de cAMP), lo que crea separaciones en las uniones entre las células endoteliales que bordean el sistema vascular y aumenta la permeabilidad vascular, formando edema del tejido local (78).

Bradicinina es un polipéptido que tiene cerca de 10 veces la potencia vasodilatadora de la histamina en una base molar, actúa para incrementar la permeabilidad abriendo las uniones entre las células epiteliales, se forma con ciertos sustratos de globulina plasmática por la acción de la enzima calicreína, y es de manera subsecuente degradada muy rápido en fragmentos inactivos por varias cinasas tisulares, además está implicada en las respuestas vasculares relacionadas con lesión del tejido y reacciones inmunitarias (79).

Fenilefrina, es un agente simpático mimético o agonista α -1 selectivo que actúa sobre los receptores alfa adrenérgicos con una mínima acción beta. Esto produce una intensa vasoconstricción, aumenta la presión arterial sistólica y diastólica pudiendo producir como efecto reflejo una bradicardia que disminuya el gasto cardíaco (80).

Indometacina: Es un antiinflamatorio no esteroide derivado del ácido indolacético. Inhibe la actividad de la enzima ciclooxigenasa disminuyendo la síntesis de prostaglandinas y tromboxano a partir del ácido araquidónico. mediadores en varios procesos, entre ellos la inflamación, la agregación plaquetaria, la vasoconstricción y vasodilatación (81).

Acetilcolina (AC). Primer neurotransmisor caracterizado tanto en el sistema nervioso periférico (SNP) como en el sistema nervioso central (SNC) de mamíferos, se sintetiza a partir de la colina y del acetil CoA, en una reacción catalizada por la colina acetiltransferasa (CAT) y existen mecanismos que regulan de manera precisa su síntesis y liberación. Las técnicas de clonación molecular han permitido la identificación de dos tipos de receptores: inotrópicos (nicotínicos) y metabotrópicos (muscarínicos) todos ellos acoplados a proteínas G. Los receptores M1, M2 y M3 están acoplados a la activación de proteínas Gs, con la consecuente producción del segundo mensajero AMPc. Los receptores M2 y M4 inhiben la formación de AMPc, activan canales de K⁺ y reducen la entrada de iones de Ca⁺⁺ a través de canales dependientes del voltaje, efectos mediados por proteínas G(46).

L-NAME o éster metílico de N (gamma) -nitro-L-arginina. Tiene un papel como inhibidor EC 1.14.13.39 (óxido nítrico sintasa). Los análogos de L-arginina son inhibidores de la actividad del óxido nítrico sintasa (NOS) tanto in vitro como in vivo(82).

4. CAPITULO I

4.1 OBJETIVO

4.1.1 Determinar el efecto cardiovascular de tres fracciones cromatográficas del veneno de *C. margaritatus* en biomodelos murinos.

4.2. MATERIALES Y MÉTODOS.

4.2.1 Colecta y fraccionamiento del veneno.

La colecta de especímenes se llevó a cabo en la vereda Potrerillos, municipio de Balboa, Departamento del Cauca, Colombia (coordenadas 2°01'21''N, 77°10'43''O, 800 msnm). Se colectaron un total de 50 escorpiones macho de la especie *C. margaritatus* (con permiso de colecta: R. 0152 de 02/15/2015 de la Autoridad Nacional de Licencias Ambientales (ANLA) Colombia, otorgado a la Universidad del Cauca). El veneno se extrajo por estimulación eléctrica del telson, se diluyó en agua estéril desionizada (veneno de 10 individuos en 1 ml de agua), la mezcla se llevó a centrifugación por 15 minutos a 25.000 rpm a 4°C. Se recuperó el sobrenadante, se hizo cuantificación de proteínas mediante NanoDrop 2000 UV-Vis spectrophotometersy posteriormente fue liofilizado y conservado a -20°C, obteniéndose un total de 20 mg de proteína.

Para aislar las fracciones, se utilizó un equipo de cromatografía RPHPLC, diluyendo los 20 mg de veneno en 5 ml de agua mili-Q y sometiéndolo a centrifugación a 15000 rpm y 8°C durante 15 minutos. El sobrenadante se aplicó a una columna CNW de fase reversa C18, (45 mm x 250mm), previamente equilibrada en solución A (0,12% (v/v) de ácido trifluoroacético (TFA) y agua (grado Mili-Q). La fase móvil se aplicó mediante un gradiente lineal de la solución A, hasta 60% de la solución B (0,10% de TFA en Acetonitrilo), con un flujo de 1 ml/min durante 60 minutos y a una detección de 230 nm. Las tres fracciones cromatográficas (FI, FII y FIII) se colectaron individualmente y de forma manual, con tiempos de elusión de 20 minutos cada una, se liofilizaron y se conservaron a -40°C hasta su uso.

4.2.2 Biomodelos experimentales

Se utilizaron 15 ratas *R. norvegicus albinus*, machos, criadas en condiciones óptimas de temperatura $22 \pm 2^\circ\text{C}$, ciclos de luz de 12 horas, alimento y agua *ad libitum*, de peso 300 ± 20 g y edad de 5 meses, con características normotensas, procedentes del laboratorio sectorial del Departamento de Fisiología y Farmacología de la Universidad Federal de Ceará (Brasil), bajo la aprobación del comité de ética (CEPA/UFC), las cuales fueron distribuidas al azar en tres grupos (n=5), cada grupo para análisis de una fracción del veneno, con 5 repeticiones.

4.2.3 Obtención de registros hemodinámicos y cardiacos

A cada rata se inyectó vía IP una dosis de 60mg/kg de pentobarbital sódico y comprobada la sedación, se procedió a realizar cateterización vascular de la vena yugular para inserción de catéter de registro de Presión Venosa Central (PVC), de la arteria femoral para inserción de catéter de medición de Presión Arterial Media (PAM) y de la arteria carótida para inserción de un micro-catéter con microsonda transductora (SPR-847, Millar instruments, Houston, TX, EE.UU), para medir Volumen de Eyección Ventricular (VEV), Presión Ventricular de Eyección (PVE) e índice Doppler (dp/dt_{max}). Todos los catéteres se acoplaron a un polígrafo con bioamplificador Power lab 16/35 de AD Instruments para lectura de registros utilizando el software Lab chart 7.1.

Para registro electrocardiográfico (EKG) y medición de la Frecuencia Cardiaca (FC) se colocaron electrodos de punción en derivación bipolar II de plano frontal, acoplados al polígrafo. Se dejó transcurrir un tiempo de 15 minutos para estabilización hemodinámica y luego se procedió a inyectar vía IV 0,1 ml de solución salina (0,9%), a partir de este momento los registros obtenidos se grabaron como registros control durante 15 minutos, posteriormente cada 5 minutos se aplicó vía IV 0.1 ml de la fracción del veneno diluido en solución salina 0,9%, en dosis equivalentes a 1 μ g/kg, dosis 1 (d1), 10 μ g/Kg, dosis 2 (d2), 100 μ g/Kg, dosis 3 (d3) y 1000 μ g/kg, dosis 4 (d4); se tomaron registros continuos posteriores a la inoculación de cada dosis, posterior a d4 los registros se observaron durante 10 minutos, 5 minutos iniciales (d4t1) y 5 finales (d4t2)). El Gasto Cardiaco (GC) se obtuvo del producto entre VEV y FC; mientras que la Resistencia Vascular Sistémica (RVS) se calculó multiplicando PAM por PVC y dividiendo este producto entre el GC. Con los datos numéricos de los registros control y dosis de cada fracción, se hizo el análisis estadístico en cada variable hemodinámica mediante la prueba de normalidad de Kolmogorov Smirnov, comparaciones múltiples entre fracciones I, II y III por control y dosis mediante Anova de dos vías y post hoc Tukey Bonferroni ($\alpha \leq 0.05$).

4.2.4 Análisis histológico

Diez minutos después de la aplicación de la última dosis, las ratas fueron eutanasiadas por hipovolemia, y se hizo disección del corazón para análisis histopatológico, colocándolo en una solución de Glutaraldehído buferado al 2,5% durante 12 horas, seguido de inclusión en parafina. Se realizaron cortes sagitales con micrótopo, los cuales fueron montados en placas histológicas para tinción con hematoxilina-eosina. La lectura de placas se hizo mediante microscopía óptica utilizando objetivos 10X y 40X.

4.2.5 Medición de Isoenzimas cardiacas

Las muestras de sangre fueron obtenidas vía endovenosa diez minutos después de la aplicación de la última dosis de las fracciones del veneno y antes de la eutanasia por hipovolemia. La cuantificación de la creatinina fosfoquinasa (CK) y de la fracción CKMB, se llevó a cabo a partir del suero obtenido de las muestras de sangre de cada animal, por centrifugación a 5000 rpm y mediante el método del slide VITROS CKMB, utilizando los slides VITROS CKMB y el VITROS Chemistry Products Calibrator, elemento analítico multicapa, incorporado a un soporte de poliéster y mediante un espectrofotómetro a 339 nm. La determinación cuantitativa de Troponinas I, se hizo a partir del suero obtenido por centrifugación y conservado a -20oC, se utilizó una prueba inmunoenzimática in vitro utilizando el método Enzymun Test de Boehringer-Mannheim. La TNT se cuantifica espectrofotométricamente a 405 nm con un sustrato de peroxidasa.

4.3 RESULTADOS

4.3.1. Fraccionamiento del veneno

Se utilizaron 30 mg de veneno crudo de *C. margaritatus*. El perfil cromatografico obtenido por HPLC muestra los tiempos de retención cada 20 minutos para la obtención de las tres fracciones (figura 8).

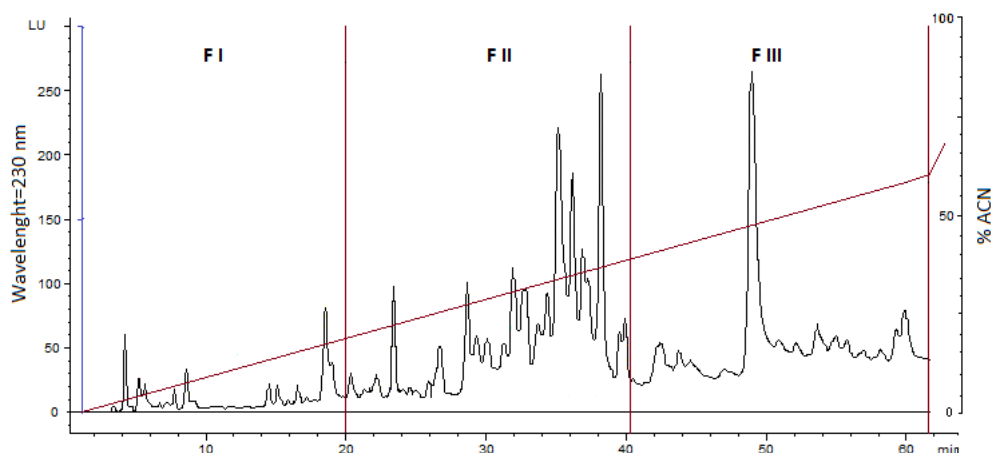


Figura 8. Perfil cromatográfico de las fracciones FI, FII y FIII del veneno de *C. margaritatus* obtenidas por RPHPLC, utilizando una columna C-18 de fase reversa, con un gradiente lineal de agua + TFA (1%) / acetonitrilo + TFA (1%) al 60%, flujo de 1 ml/min durante 60 minutos, y detección a $\lambda=230$ nm.

La fracción I (FI), obtenida en los primeros 20 minutos de retención presentó una serie de picos de abundancia relativa media que corresponden al 33% del veneno fraccionado. La fracción II (FII), obtenida entre los 20 a 40 minutos de retención, presentó una serie de picos con abundancia relativamente alta que corresponden al 54% del veneno fraccionado y la fracción III (FIII), obtenida entre 40 a 60 minutos

de retención, presentó escasos picos con abundancia relativa baja (13% del veneno fraccionado).

4.3.2. Registros de las variables hemodinámicas

Los registros de cada variable hemodinámica fueron obtenidos y grabados simultáneamente en 7 canales los cuales se muestran en la pantalla del monitor en orden descendente: PVE en mmHg, PVC en mmHg, VVE en micro litros, EKG en bpm, PAM en mmHg, FC en ciclos por minuto y dP/dt en mmHg/s (figura 9).

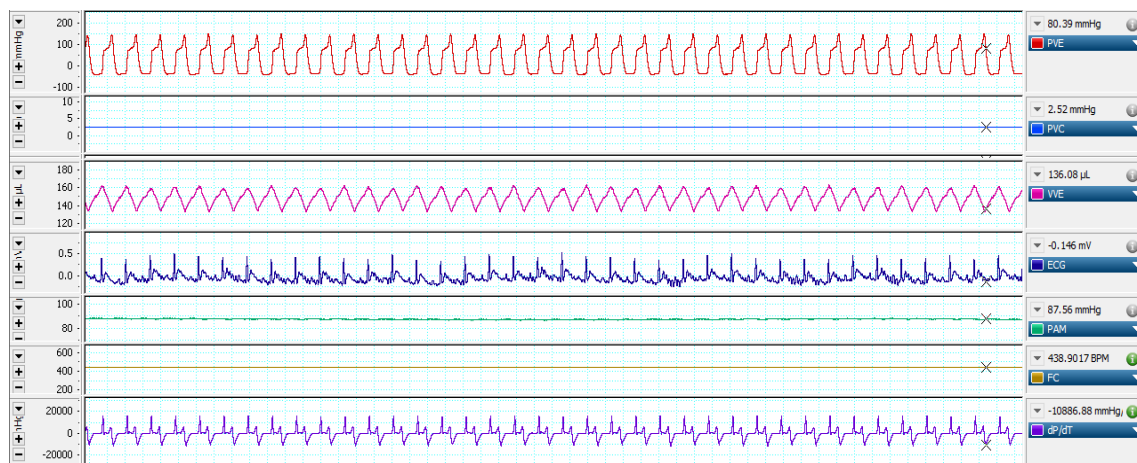


Figura 9. Registros control de las variables hemodinámicas PVE, PVC, VVE, EKG (DII), PAM, FC y dP/dt, obtenidos en ratas normotensas en condiciones experimentales utilizando el Software Chart 7.

En los registros control, se calculó la media y desviación estándar de los valores de cada variable hemodinámica, con el fin de establecer una comparación con los obtenidos por otros autores para ratas normotensas (tabla 2)

Tabla 2. Media y desviación estándar de los registros control (sin salina 0,9%) en cada variable hemodinámica y los obtenidos por otros investigadores en ratas normotensas.

Estadísticos	Variables hemodinámicas							
	VVE µL	FC bpm	GC ml/min	PAM mmHg	RVS dinas*s/cm ⁵	PVE mmHg	PVC mmHg	dP/dt mmHg/s
$\bar{X}$ de controles	155,8	417,0	64,07	105,2	128,3	135,8	0,16	6204
S	19,1	43,7	7,31	15,3	21,6	34,0	0,07	1776
$\bar{X}$ (otros autores)	140	402,9	66,36	105,89	128,7	132,5	0,676	9000
S	10	9,62	3,41	14,45	18,45	13,5	0,45	1100

Los análisis estadísticos de Anova y comparaciones múltiples poshoc de Bonferroni, establecidos para los valores obtenidos en cada variable hemodinámica por fracción y dosis, no muestran diferencias significativas entre los registros control y los de las 4 dosis de FI y FIII, pero si entre los de dosis 4 (d4) de la FII con las demás dosis de las FI y FIII y los controles, tal como se puede observar en la figura 10.

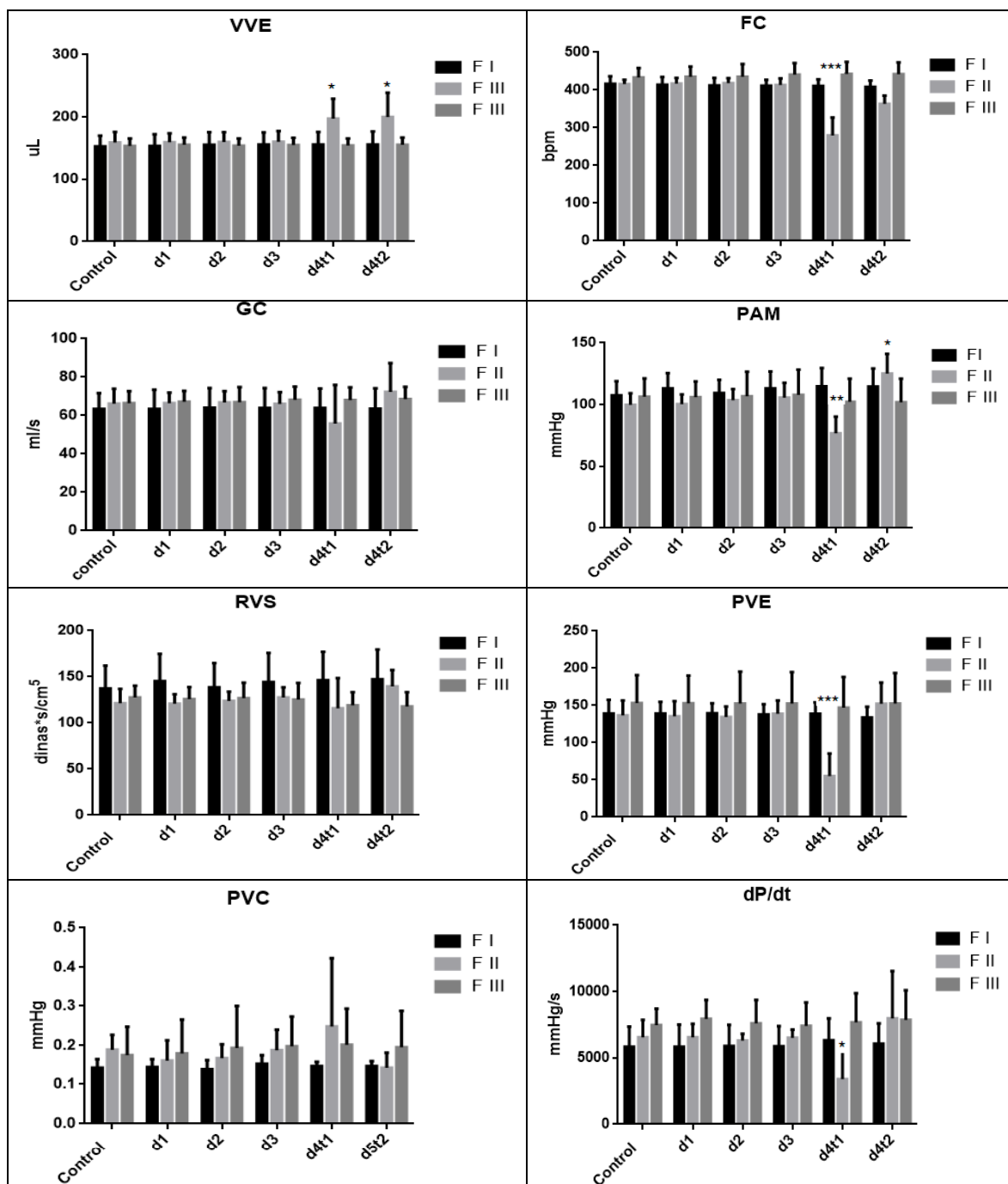


Figura 10. Análisis estadístico de comparaciones múltiples entre el control y las 4 dosis de las tres fracciones cromatográficas por medio de Anova de dos vías y test post hoc de Tukey para las variables hemodinámicas: (A) VVE, (B) FC, (C) GC, (D) PAM, (E) SVR, (F) PVE, (G) PVC, (H) dP/dt(max)

Esas variaciones fueron: Incremento significativo del VVE, durante el tiempo 1 de la dosis 4 (d4t1), manteniéndose así durante el tiempo 2 de la dosis 4 (d4t2) (Figura 10A). Disminución significativa de la FC en d4t1, seguida de una pronta recuperación en d4t2 (figura 10 B). Disminución significativa de la PAM en d4t1

seguida de un aumento significativo en d4t2. (Figura 10D). Disminución significativa de la PVE en d4t1, normalizándose en d4t2 (figura 10F). La PVC se incrementó significativamente en d4t1, seguida de un descenso a valores normales en d4t2. (Figura 10 G). Finalmente, los valores de dP/dt(max) muestran una disminución significativa en d4t1 seguida de un incremento hasta estabilizarse en d4t2 (figura 10 H). El GC y la RVS no presentaron cambios estadísticamente significativos respecto a los controles y a las dosis de las fracciones.

4.3.3. Registros electrocardiográficos

Los registros electrocardiográficos obtenidos fueron interpretados de manera cualitativa, encontrándose ritmos sinusuales en los animales que fueron inoculadas con las cuatro dosis de las fracciones I y III (Fig.11); en ratas inoculadas con la d4 de la FII, se observaron registros con arritmia por bloqueo AV y onda QRS con bajo voltaje (Fig.11B), elevación de la onda T (Fig. 11C), onda T picuda (Fig. 11D), elevación del segmento ST, arritmia por bloqueo AV y bajo voltaje QRS, (Fig.11E) y arritmia por extrasístole ventricular (Fig. 11F).

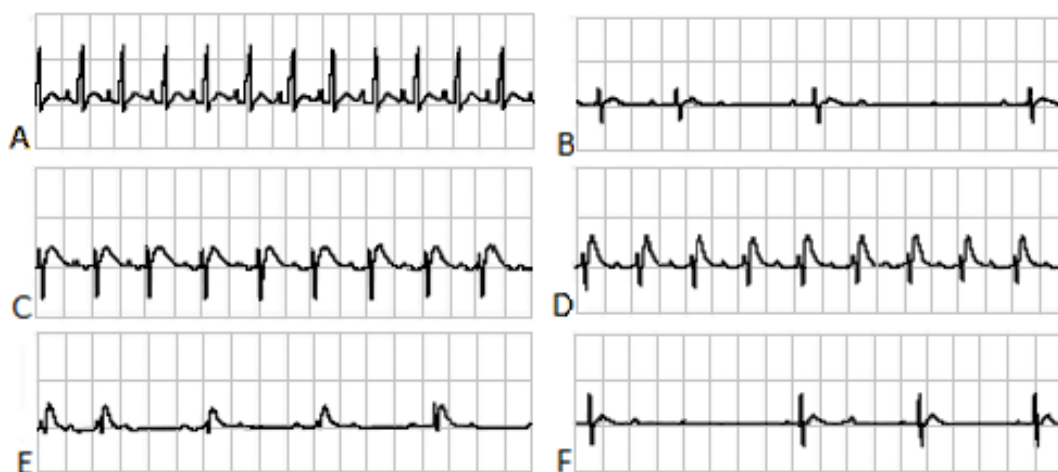


Figura 11. Registros ECG de plano frontal, derivación bipolar II, en *R. norvegicus*. A Ritmo sinusual en control y d1a d4 de FI y FIII. B, fibrilación auricular en d4 FII, C elevación de la onda T en d4FII. D onda T picuda en d4FII. E fibrilación auricular y onda T elevada en d4FII. F Arritmia por fibrilación ventricular en d4FII.

4.3.4 Histología cardíaca

El análisis histológico de cortes sagitales de corazón, se hizo en todas las placas obtenidas de animales tratados con las tres fracciones, identificando en ellas epicardio, miocardio, endocardio, coronarias, grasa epicárdica valvar y músculos papilares.

En las ratas tratadas con las fracciones FI y FIII, se observaron bandas de contracción con cardio citólisis leve, sin embargo, en las tratadas con la d4 de la fracción FII se observó, además, edema y hemorragia interfibrilar de moderada a extensa en todos los individuos. (Figura 12).

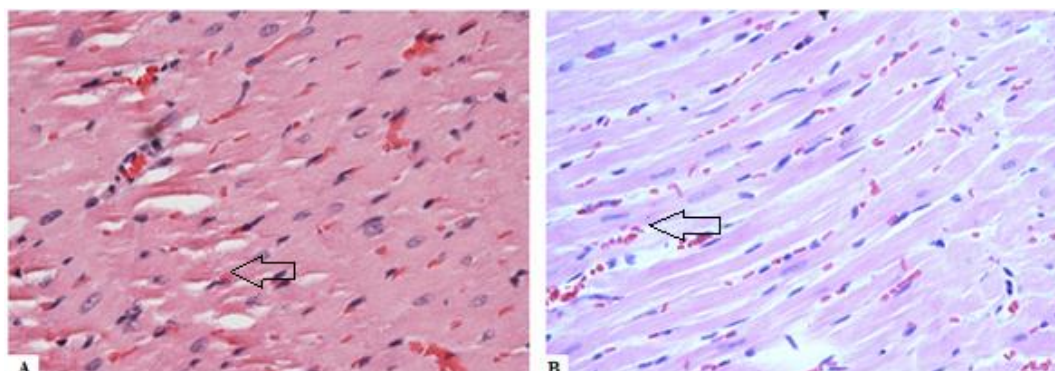


Figura 12. Tejido cardíaco de *R. norvegicus*, posterior al tratamiento con cuatro dosis de la fracción FII del veneno de *C. margaritatus*, A. Edema interfibrilar, B hemorragia interfibrilar. Tinción hematoxilina eosina, 40X

4.3.5. Evaluación de Isoenzimas cardíacas

En la tabla 3 se muestran los valores de Creatina kinasa (CK) en μL , obtenidos dos horas posteriores a la inoculación vía IP, de tres dosis de la Fracción cromatográfica II del veneno de *C. margaritatus*, teniendo solución salina 0.9% como control y mediante el método del SLIDE VITROS CKMB.

4.3.6 Creatina quinasa MB (CK-MB)

En la tabla 4 se muestran los valores de CK-MB en μL obtenidos del suero de muestras de sangre de los animales experimentales, estos valores son llevados, a partir de los valores de CK al índice relativo de CK/CK-MB dado en porcentaje (tabla 3).

Tabla 3. Valores de Creatina kinasa (CK) en μL , obtenido del suero de muestras de sangre de *R. norvegicus*, dos horas posteriores a la inoculación, vía IP, de tres dosis de la Fracción cromatográfica 2 del veneno de *C. margaritatus* y con solución salina 0.9% como control.

CK (μL)	Control	Dosis1	Dosis 2	Dosis 3
B1	2350	2815	2687	4782
B2	1787	4851	5176	3407
B3	2450	3483	3931	3320
B4	2665	3718	2856	3052

Tabla 4. Valores de la fracción CK-MB obtenido del suero de muestras de sangre de *R. norvegicus*, dos horas posteriores a la inoculación, vía IP, de tres dosis de la Fracción cromatográfica 2 del veneno de *C. margaritatus* y con solución salina 0.9% como control.

Bloques	Control (μ /L)	Dosis1 (μ /L)	Dosis 2 (μ /L)	Dosis 3 (μ /L)
B1	1310	1221	906	1441
B2	1575	1045	1357	778
B3	1730	1425	1689	769
B4	988	1230	1050	1480

Tabla 5. Índice relativo CK/CK - MB en porcentajes para los valores hallados obtenido del suero de muestras de sangre de *R. norvegicus*, dos horas posteriores a la inoculación, vía IP, de tres dosis de la Fracción cromatográfica 2 del veneno de *C. margaritatus*

Bloques	Control %	Dosis1 %	Dosis 2 %	Dosis 3 %
B1	55.74	43.37	33.72	30.13
B2	88.14	21.54	26.22	22.84
B3	70.61	40.91	42.97	23.16
B4	37.07	33.08	36.76	48.49

4.3.7. Troponina I (TI)

La tabla 6 muestra los valores de la Troponina I en ng/ml, obtenido del suero de muestras de sangre de *R. norvegicus*, dos horas posteriores a la inoculación, vía IP, de tres dosis de la Fracción cromatográfica 2 del veneno de *C. margaritatus* y con solución salina 0.9% como control.

Tabla 6. Valores de Troponina I en ng/ml para cada una de las dosis y grupo control

Troponina I ng/ml	Control	Dosis1	Dosis2	Dosis 3
B1	<0,05	<0,05	0,06	<0,05
B2	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05
B3	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05
B4	<0,05	<0,05	<0,05	0,07

4.3.8. Letalidad y sintomatología.

En individuos experimentales tratados con la dosis d4 de FII se observó en d4t1, un cuadro clínico externo consistente en tremor, piloerección, sialorrea y abundante secreción acuosa por vía nasal, característica del envenenamiento escorpionico, presentándose letalidad de un 40% en d4t2, antes de finalizar los 10 minutos de observación. En ratas tratadas con las dosis de las fracciones FI y FIII no se observaron signos externos de envenenamiento, salvo en algunos casos donde se observó piloerección.

4.4 DISCUSIÓN

Los valores promedio de cada variable hemodinámica hallados como registro control antes de la inoculación de la fracción del veneno, presentan similaridad a los hallados por otros autores en ratas normotensas de la misma especie, que no estaban bajo los efectos de sedantes ni de intervenciones quirúrgicas invasivas como en nuestro caso (Tabla 2): VVE y RVS (83); FC, GC y PAM (84); PVE y dP/dt(max) (85). Únicamente los valores de PVC se encontraron en este estudio cerca al límite inferior de los valores obtenidos por Chaple et al (86).

El efecto disfuncional hemodinámico de las tres fracciones cromatográficas estudiadas, fue analizado para cada variable por dosis y fracción, teniendo en cuenta la interrelación entre los efectos de cada fracción con el control y entre ellas. Inicialmente se observa un incremento significativo en el VVE o índice sistólico, en d4t1, que se mantiene elevado durante d4t2; lo cual implica un incremento en la contractilidad cardíaca (21), regulación extrínseca que está dada por el sistema nervioso autónomo, regulador principal de la contractilidad de las fibras miocárdicas junto a factores como la concentración de los iones K^+ y Ca^{2+} (49). Por otra parte el aumento significativo de la PVC observado en d4t1, puede considerarse como causa del incremento del VVE, dado que la regulación intrínseca de este volumen está determinada conforme a la Ley de Starling, de tal manera que el volumen ventricular diastólico (precarga), determina directamente la contracción sistólica (poscarga) y por tanto el volumen de eyección (50); Así, la PVC está relacionada con el volumen sanguíneo y la distensibilidad cardíaca, de tal manera que un descenso en la distensibilidad aumenta la presión venosa (48) y un incremento de la poscarga, favorece la evolución a un Infarto Agudo de Miocardio (IAM) severo con insuficiencia ventricular izquierda (patrón miocárdico) (9).

Otros cambios observados están relacionados con las variables PVE, PAM, FC y dP/dt, las cuales presentan un descenso estadísticamente significativo en los primeros 5 minutos d4t1, estabilizándose inmediatamente en los minutos siguientes d4t2, a excepción de la PAM que se incrementa de manera significativa. Estos cambios no afectan el GC ni la RVS los cuales se mantienen estables durante el tiempo de análisis. Esta primera respuesta hemodinámica que genera la FII en d4t1, es indicativo de una acción directa del veneno sobre las paredes del miocardio

afectando directamente la relajación auricular y ventricular y alterando los demás valores hemodinámicos.

La respuesta hipotensiva sistólica inicial en d4t1, indica una alteración en la contractilidad del ventrículo izquierdo (87), hecho que se asocia con lo expuesto por Karnad DR, quien identifica los efectos cardíacos con resistencia vascular sistémica normal, específicamente una disfunción miocárdica que termina en insuficiencia ventricular izquierda, como patrón de respuesta hemodinámica que pertenece al emponzoñamiento severo (88).

La dP/dt_{max} máxima o máxima velocidad instantánea de ascenso de la presión intraventricular izquierda, es un índice que, aun siendo sensible a las variaciones de la carga, expresa mejor que la Fracción de Eyección Ventricular el estado de la contractilidad del miocardio (89). Una disminución inicial en la contractilidad ventricular, se manifiesta como un descenso de dP/dt_{max} durante la contracción isovolumétrica, no obstante, el índice dP/dt_{max} también está influenciado por la precarga, la poscarga, el ritmo cardíaco, y la hipertrofia miocárdica (85).

La caída inmediata de la FC, puede ser consecuencia de la estimulación parasimpática o vagal, seguida de un incremento inmediato del tono simpático, que genera liberación de adrenalina por la médula suprarrenal y de noradrenalina por las neuronas adrenérgicas (49), ocasionando la recuperación de la FC.

Otro factor a considerar en los cambios observados, es su relación con el incremento de catecolaminas exógenas (90), varios autores han demostrado en sus estudios que el veneno escorpionico, tiene un efecto a nivel del SNA, que desencadena una “tormenta autonómica” (91), generando cambios bruscos de la presión arterial sistólica y de la PAM, desencadenando alteraciones en la PVE, VVE y DP/dt_{max} , como los aquí observados en d4t1. En investigaciones con el veneno de la especie *Mesobuthus talamulus*, se hallaron polipéptidos que afectan las membranas celulares que conducen la afluencia de Na^+ y Ca^{+2} , estimulando estructuras como el hipotálamo que conduce a flujo masivo de catecolaminas principales con efecto en SN simpático y parasimpático, ocasionando vaso espasmos que llevan a la hipertensión arterial y a hipo perfusión sistémica, produciéndose miocarditis con arritmia ventricular transitoria (92).

En d4t2, la PAM se incrementa hasta hipertensión, probablemente como consecuencia de la adrenalina circulante aumentada por el veneno, la cual es captada por receptores β_2 de la membrana neuronal presináptica, lo que estimula una nueva oleada de liberación de noradrenalina de las vesículas de almacenamiento originando una vasoconstricción prolongada. Así, niveles plasmáticos elevados de catecolaminas originarían un estado de hipertensión y de remodelado vascular (93). La hipertensión arterial junto con el incremento de la PVE, puede causar insuficiencia cardíaca por disfunción diastólica ventricular izquierda (DVSI), La mayor parte de los casos de DVSI asociados a hipertensión, se deben al desarrollo de un IAM (94). El momento de la contracción auricular es importante para alcanzar la máxima eficiencia en el llenado ventricular, por lo tanto

intervalos PR muy prolongados o muy cortos afectan el grado de contribución auricular al llenado ventricular (95). Un incremento de la presión sistólica ventricular izquierda está relacionado con una dilatación ventricular como consecuencia del daño miocárdico producido por la sobrecarga crónica de presión (96). Ese daño miocárdico se puede observar inicialmente a partir de la fibrilación auricular y la elevación del segmento ST observado en los registros EKG obtenidos en animales tratados con la d4 de la FII del veneno de *C. margaritatus*. En nuestro caso los estudios histológicos mostraron edema y hemorragia interfibrilar, mucho más densa en los animales tratados con la dosis d4FII del veneno de *C. margaritatus*, la cual pudo ser causada por el efecto agonista α adrenérgico de las catecolaminas adrenalina y noradrenalina, lo cual implicaría un incremento de la RPT, del GC y de la FC.

En los análisis histológicos, este daño en miocardio puede ser consecuencia de una hipertrofia cardíaca que se presenta como respuesta adaptativa que normaliza el estrés de la pared y compensa el aumento de la carga de trabajo. La presencia de bandas de contracción con miocitolisis, puede estar ocasionada por el efecto inotrópico de la d4FII del veneno, discutido anteriormente. Esta forma de necrosis afecta a células individuales o a pequeños grupos celulares, rodeados de miocitos de apariencia normal, las bandas Z que enlazan los miocitos se rompen, las miofibrillas sarcoméricas se fragmentan y adquieren un tono basófilo granular, ya que se mineralizan debido a la deposición intracelular de Calcio (97). Estas alteraciones de proteínas sarcoméricas entre ellas la titina, contribuyen a la rigidez del miocardio (98) y a la alteración del dP/dt_{max} .

La fibrilación auricular con RR variable sin la presencia de onda P, con bloqueo AV y QRS ancho unido a bradicardia y QRS con voltaje disminuido es atribuible a una pericarditis con derrame el cual se confirma con las placas histológicas que presentan edema y hemorragia interfibrilar. La elevación del segmento ST y onda T hiperaguda (picuda), puede ser atribuible a desbalances electrolíticos, a sobrecarga ventricular o a fenómenos vago tónicos (99). Es, además, un indicador de Isquemia Aguda del Miocardio (IAM) consistente en reducción del aporte de oxígeno con daño reversible cuando es menor a 20 minutos, o irreversible en gran parte si es mayor a ese tiempo. El momento de la contracción auricular también es importante para alcanzar la máxima eficiencia en llenado ventricular. Intervalos PR muy prolongados o muy cortos afectan el grado de contribución auricular al llenado ventricular. Varios factores que afectan a la contractilidad ventricular, como la sobrecarga crónica de volumen y presión, pueden igualmente afectar a la contractilidad auricular (95). Algunos investigadores han evaluado la acción del veneno de escorpión en sistemas cardiovasculares de los perros, en un intento de elucidar su patogénesis, y han observado bradiarritmias y taquiarritmias, así como aumento de la presión arterial sistémica y de la presión diastólica final del ventrículo izquierdo (21).

En un análisis proteómico del veneno de *C. margaritatus*, se demostró que los péptidos bloqueadores de canales para potasio y péptidos moduladores de canales para sodio se encuentran en tamaños moleculares comprendidos entre 2500 a 8000 Da y son responsables de envenenamiento severo, de la misma forma como sucede

con los péptidos presentes en el veneno del escorpión colombiano *Tityus pachyurus* (14)(100). Los péptidos que presentan un tamaño molecular entre 2,5 a 6 KDa han sido denominados potasio escorpio toxinas (KScTx) por su actividad bloqueadora de canales Kv, y los de cadena larga con 58 a 76 residuos de aminoácidos, fuertemente unidos por 4 puentes bisulfuro (101), han sido identificados como sodio escorpio toxinas (NaScTx), las cuales a su vez se dividen en sodio escorpio toxinas tipo alfa (α -NaScTx) y tipo sodio escorpio toxinas tipo β (β -NaScTx), que alteran el mecanismo de apertura de los canales de K⁺ especialmente en mamíferos, causando despolarizaciones anómalas en células excitables como nervios y músculos (41).

Hasta el momento se conocen cerca de 300 de estos péptidos presentes en venenos escorpiónicos con dos tipos principales de efectos fisiológicos como son la prolongación del potencial de acción y la disminución del voltaje de apertura de canales de sodio y potasio (102). Estos efectos son probablemente los responsables del cuadro clínico de intoxicación aquí descrito. Las principales dianas moleculares de las neurotoxinas de los escorpiones son cerradas a los canales 9 y 10 de sodio y al canal de potasio dependiente de voltaje (11). En este intervalo de masas moleculares correspondiente a la FII, se han descrito también en este género, péptidos bloqueadores de canales de K⁺ dependientes de voltaje, como los hallados en *Centruroides tecomanus*, compuestos por 32 a 39 residuos de aminoácidos, con 3 puentes disulfuro pertenecientes a la familia de α -KScTx, que alteran la función normal de los canales iónicos Kv1.2, Kv1.1, Kv1.3, Shaker y K_{Ca}3.1 en concentraciones nM, así como péptidos con 42 residuos de aminoácidos y 4 puentes disulfuro pertenecientes a la familia γ -KScTx bloqueadores del canal ERG (12).

Los resultados obtenidos para CK total (tabla 10), muestran valores supremamente altos, incluyendo al grupo control, en comparación a los valores control hallados por Noriega que alcanzan un límite superior de 250 U/L (Noriega, y otros, 2009). Lo anterior puede estar relacionado con el método de obtención de la muestra y posible hemólisis de la misma que eleva los valores séricos de CK. No obstante lo anterior, se han obtenido resultados similares en trabajos realizados en ratones con veneno de serpientes venenosas, donde la CK-total aumenta por inyección de la fracción miotóxica alcanzando un valor de 4090 U/L luego de 4h, (Noriega, y otros, 2009). La CK total está compuesta por dos subunidades: la B (con predominio en tejido cerebral) y la M (muscular). Tres isoformas surgen de la combinación de ambas: CK-MB, CK-MM y CK-BB. Si bien sólo entre el 15% y el 20% de la CPK del tejido cardíaco es CK-MB (el 80%-85% restante es de tipo MM), el miocardio es el principal origen de la isoforma MB, por lo cual su presencia es altamente sugestiva de daño cardíaco. Sin embargo hay otras causas de aumento de la CK-MB que incluyen traumas, distrofias musculares, miocitosis, rabdomiólisis y ejercicio muscular vigoroso (60). Se considera anormal un valor superior al límite de referencia y mayor del 5% de la CPK total. El odds ratio para el diagnóstico de infarto agudo de miocardio (IAM) de una muestra aislada de CKMB varía desde 7,2 a 25, según la prevalencia de infarto (60).

Dado estos aumentos significativos de la CK total, es importante determinar el índice de CK-MB (relación CK-MB/CPK) que en condiciones normales debe ser inferior a 3%-5% en presencia de daño muscular no cardíaco. La CK-MB aparece en sangre luego de 4-6 horas del inicio de un IAM, alcanza el pico a las 12-24 horas y se normaliza en 2-3 días (103). El porcentaje normal de CK-MB se encuentra entre el 6-20% del valor de CK total. Si el porcentaje es menor al 6% es probable que haya daño del músculo esquelético. Si el porcentaje supera el 20% del valor total de CK se puede sospechar de la presencia de una forma macro de CK (CK atípica) que no es inhibida por los anticuerpos anti CK-M (60). Por lo anterior los valores del índice relativo CK/CK-MB, en los controles superan el valor normal de 20 % total de CK, sospechándose por lo tanto de la presencia de una forma macro de CK (CK atípica) que no es inhibida por los anticuerpos anti CK-M, perdiendo confiabilidad como indicadores de IAM que implica daño a nivel ventricular.

Troponina I es una de las pruebas más confiables para la determinación de de IAM o de lesión isquémica. En humanos, la sensibilidad de la Tn I es del 50% dentro de las 4 horas del inicio del dolor precordial, 75% a las 6 horas y 100% a las 12 horas, el ascenso de TnI se relaciona más que con la necrosis miocárdica con la presencia de daño miocárdico isquémico. Se consideraron como patológicas cifras de troponina I cardíaca mayores a 0,5 ng/ml (104). Los datos obtenidos en este estudio muestran en su mayoría valores inferiores al valor de referencia en humanos <0,05 ng/L. Solo en las dosis más altas se presentan dos casos con valores superiores a 0,05 ng/ml, indicadoras de posible daño isquémico.

5. CAPITULO II

5.1 OBJETIVOS:

5.1.1 Caracterizar electrofisiológicamente en canales Nav y Kv1x, péptidos de masa molecular entre 2,5 a 6 KDa aislados de la fracción II del veneno de *C. margaritatus*.

5.1.2 Caracterizar bioquímicamente los péptidos con actividad biológica en canales Kv1.x y Kv11.1

5.2. MATERIALES Y METODOS

5.2.1 Obtención del veneno.

Se colectaron 50 individuos machos de la especie *C. margaritatus* en la vereda Potrerillo, municipio de el Bordo (Patía), departamento del Cauca, Colombia, bajo permiso oficial ANLA, R. 0152 del 15/02/2015, a los cuales se les hizo una primera extracción del veneno y posteriormente se mantuvieron en terrarios con agua y nutrición *ad libitum*, en un ambiente adecuado de humedad el Centro de Investigaciones Biomédicas de la Universidad del Cauca (CIBUC) con el fin de llevar a cabo dos nuevas extracciones.

El veneno se obtuvo por estimulación eléctrica del telson, y lo obtenido por cada 10 escorpiones, fue colectado en viales de 2 ml disolviéndolo en 1,5 ml de agua MiliQ. Una vez disuelto se sometieron los viales a centrifugación refrigerada a 4°C y 1500 rpm durante 15 minutos, el sobrenadante fue cuantificado mediante equipo Nano Drop Spectrophotometer ND 1000 y posteriormente liofilizado en equipo Thermo Scientific Savant SpeedVac conservándose a -20°C hasta su uso. En todos los procedimientos se utilizó agua Mili Q y reactivos grado analítico

5.2.2 Evaluación electrofisiológica del veneno completo.

El veneno completo de *C. margaritatus*, fue evaluado por la técnica electrofisiológica de Patch clamp (descrita más adelante), en canales Nav1.1, Nav1.2, Nav1.3, Nav1.4, Nav1.5, Nav1.6, y Nav1.7, con el fin de evaluar la potencialidad del veneno en este tipo de canales, y en Kv1.1, hKv1.4, hKv7.1+MINK, hEAG1, HERG1, canales presentes en CMLV y en cardiomiocitos.

5.2.3 Cultivo de células para técnica electrofisiológica Patch clamp.

Para evaluar los canales Nav, se cultivaron células embrionarias de riñón humano (HEK) que expresan los canales hNav. Para evaluar canales Kv, se utilizaron células

de ovario de hámster chino (CHO), que expresan los diferentes canales de K⁺ evaluados y los canales Kv11.1 (hErg). Estas células se cultivaron en medio Eagle modificado de Dulbeco (DMEM) (SIGMA), con alto contenido de glucosa, suplementado con suero fetal bovino al 10% (Biotecfron, México) y, cuando fue necesario se añadieron, 500 ug/ml del antibiótico geneticina. Las células se mantuvieron a 37 ° C con 5% de CO₂ en atmósfera humidificada.

Los canales de potasio hKv 1.1, hKv 1.4, subunidad hKv 7.1 + MINK y hEAG1 se expresaron transitoriamente en células CHO utilizando el reactivo Lipofectamine® 3000 (Thermofisher), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las células de ovario de hámster chino (CHO) y células embrionarias de riñón humano (HEK) que expresan canales de sodio y HERG1 fueron crecidas en el medio DMEN (Dubelco's Modified Eagle Medium, SIGMA) (figura 13). Suplementado con 10% de suero fetal bovino (Biotecfron) y cuando se requirió, se agregaron 500 ug/ml de geneticina G418. Las células fueron mantenidas a 37 oC con 5% de CO₂ en atmosfera húmeda. Los canales de potasio hKv 1.1, hKv 1.4, hKv7,1 + subunidad MINK y Human Ether à Go-Go 1 (hEAG1) fueron transfectados usando el reactivo Lipofectamine 3000 (Thermofischer)

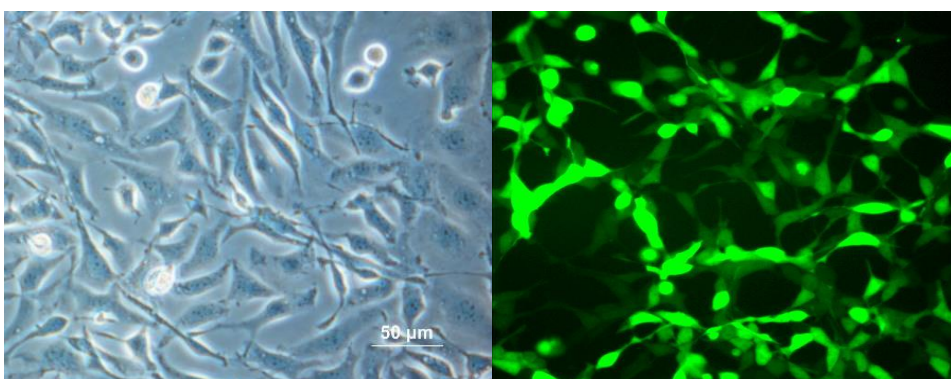


Figura 13. Células de ovario de hámster chino (CHO) y células embrionarias de riñón humano (HEK) que expresan canales de sodio y HERG1 con lipofectamine 3000

5.2.4 Evaluación por electrofisiología, Patch clamp

Para las corrientes de sodio, se utilizó una solución extracelular con concentraciones mM: 130 NaCl, 5 KCl, 2 CaCl₂, 2 MgCl₂, 10 HEPES, 5 glucosa, pH 7.3 ajustado con NaOH. La solución intracelular contenida en concentraciones mM: 105 CsF, 27 CsCl, 5 NaCl, 2 MgCl₂, 10 EGTA, 10 HEPES, pH 7.3 ajustado con CsOH. La solución intracelular para corrientes de potasio contenía en concentraciones mM: 130 K-Aspartato, 10 NaCl, 2 MgCl₂, 10 HEPES, 10 EGTA, pH 7.3 ajustado con NaOH. Para las corrientes de potasio de los canales ERG, la solución extracelular contenía en concentraciones mM: 95 NaCl, 40 KCl, 2 CaCl₂, 2 MgCl₂, 10 HEPES, 5 glucosa, pH 7.3 ajustado con NaOH. Los plásmidos para los canales de potasio fueron donados por el laboratorio Enzo Wanke de la Universidad de Milano-Bicocca, Italia. Las corrientes se adquirieron usando el amplificador

MultiClamp 700A y DigiData 1440a (Molecular Devices, CA, EE. UU.). El análisis y los gráficos fuera de línea se realizaron utilizando Clampfit 10 (Molecular Devices) y Origin 8 (OriginLab, MA, EE. UU.).

5.2.5 Fraccionamiento y caracterización química de los péptidos aislados

El veneno soluble (20 mg) se separó por cromatografía de filtración en gel en una columna Sephadex G-50 (60 cm x 26 mm, L x ID) en tampón de acetato de amonio 20 mM, pH 4,7 a un flujo de 2 ml/min., que dio como resultado tres fracciones definidas FI, FII y FIII (Fig. 16A). La fracción tóxica II se purificó por intercambio iónico en una columna de carboximetilcelulosa (CMC) (5 cm x 15 mm, L x ID), equilibrada con el mismo tampón. La cromatografía se realizó a una velocidad de flujo de 2 ml con un gradiente lineal (0-100%; en 200 minutos) de tampón de acetato de amonio 500 mM, pH 7,4. Se obtuvieron diez fracciones cromatográficas y se secaron por liofilización, usando una secadora Savant SC210A Speed Vac Concentrator, Mca Thermo electro Corporation.

Todas las fracciones de la cromatografía CMC se separaron adicionalmente por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), usando un equipo marca Bio Rad, modelo NGC, Chromatography System, con un software Chrom lab Model, y colector automático de fracciones Bio Fracc. una columna analítica de fase inversa C18 (Vydac, Hysperia, CA). Los péptidos puros se obtuvieron mediante un gradiente lineal desde el 100% de la solución A (0,12 (v / v) de ácido trifluoroacético (TFA) en agua) hasta el 60% de la solución B (0,10 (v / v) TFA en acetonitrilo) en 60 minutos a una velocidad de flujo de 1 ml / min. La detección se controló por absorbancia a $\lambda=230$ nm, los componentes se recogieron manualmente y se liofilizaron usando un secador Savant Speed Vac y se usaron para caracterización química y funcional. Se hizo colecta manual de cada uno de los picos del cromatograma, cada pico o fracción obtenida fue sometida a cuantificación de proteínas mediante equipo Nano Drop Spectrophotometer ND 1000.

5.2.6 Espectrometría de masas

Los picos individuales de HPLC se analizaron por espectrometría de masas (MS) con un equipo LCQ FLEET de Thermo Fisher Scientific Inc. (San José, CA, EE. UU.). La secuenciación automática de aminoácidos del péptido PI, se determinó mediante la degradación de Edman utilizando un equipo de secuenciador de proteínas Biotech PPSQ-31A de Shimadzu Scientific Instruments, Inc. (Columbia, Maryland, EE. UU.). Una muestra de péptido nativo se cargó directamente para la secuencia y una muestra reducida y alquilada del mismo péptido se secuenciaron adicionalmente para la identificación de los residuos de cisteína.

5.2.7 Secuenciación por Degradación de Edman

Para la reducción, el péptido puro se disolvió en tampón TRIS-HCl 200 mM, pH 8,6 que contiene 1 mg / ml de EDTA y cloruro de guanidinio 6 M con 2 mg de ditioneitol (DDT). Se burbujeó nitrógeno a la solución durante 5 minutos y se incubó 45 minutos a 55 ° C. Inmediatamente después de agregar 2,5 mg de yodoacetamida al vial de reacción, se colocó en la oscuridad a temperatura ambiente durante 30 minutos. Se recuperó un péptido alquilado reducido por RP-HPLC. El péptido reducido y alquilado se aplicó a una columna de fase inversa C18 para la eliminación de reactivos (condiciones similares a las descritas anteriormente). Cuando el procedimiento de secuenciación mostró que la secuencia no fue completa, los péptidos se trataron con bromuro de cianógeno y se escindieron con proteasa V8 de *Staphylococcus aureus*.

Para la digestión enzimática, la muestra reducida y alquilada (generalmente 50 µg) se disolvió en tampón de bicarbonato de amonio 100 mM, pH 7.8 y se agregaron 2 µg de proteasa v8 (Mannheim, Alemania) y se incubó a 37 ° C durante la noche. La muestra digerida se separó por RPHPLC usando las mismas condiciones para la purificación de péptidos y los productos identificados en el secuenciador. Alternativamente, los péptidos puros reducidos y alquilados se clivaron químicamente con bromuro de cianógeno; a 50 µg de péptido disuelto en 100 µL de ácido fórmico al 70% se le añadieron 5 mg de bromuro de cianógeno (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE. UU.) Una vez disuelto completamente se selló y cubrió de la luz dejando reposar durante 4h a temperatura ambiente. Inmediatamente después, se agregaron 50 µL de octanol y la solución se evaporó con una corriente de nitrógeno.

5.2.8 Análisis bioinformático

Los péptidos secuenciados fueron alineados en base de datos utilizando la herramienta de búsqueda de alineación local básica (BLAST) del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI) para generar la alineación de la secuencia de proteínas. Los péptidos que presentaron actividad electrofisiológica positiva fueron informados en la Base de datos de UniProt.

5.3 RESULTADOS

5.3.1 Efecto del veneno en los canales de sodio

Para comprender mejor la base molecular del envenenamiento ocasionado por *C. margaritatus* y teniendo en cuenta estudios realizados en otras especies escorpiónicas en las que se encontraron péptidos con efecto en canales de Na⁺ (44), se aplicó veneno total soluble a una concentración de 167 µg/ml en células CHO que expresan canales de sodio activados por voltaje del tipo hNav 1.1 a hNav 1.7. Las corrientes fueron obtenidas con el protocolo de estimulación representado en la figura 14H. En estas condiciones, el veneno total de *C margaritatus*, promueve

el cambio en los procesos de activación de casi todos los tipos de hNav analizados. Las modificaciones de las corrientes iónicas inducidas por el veneno, comprenden el cambio a un potencial más negativo del proceso de activación, combinado con la reducción de la corriente máxima (efecto beta) y la desaceleración del proceso de inactivación (efecto alfa) (Fig.14 A-G).

En los canales hNav 1.1, hNav 1.2, hNav 1.3 hNav 1.4 y hNav 1.6, el efecto beta es predominante con una fuerte reducción de la corriente máxima para hNav 1.1. En hNav1.5, el veneno causó una reducción parcial de la corriente máxima sin cambio del proceso de activación que representa el efecto beta que generalmente se observa en este tipo de canales, junto con una ligera desaceleración de la cinética de inactivación.

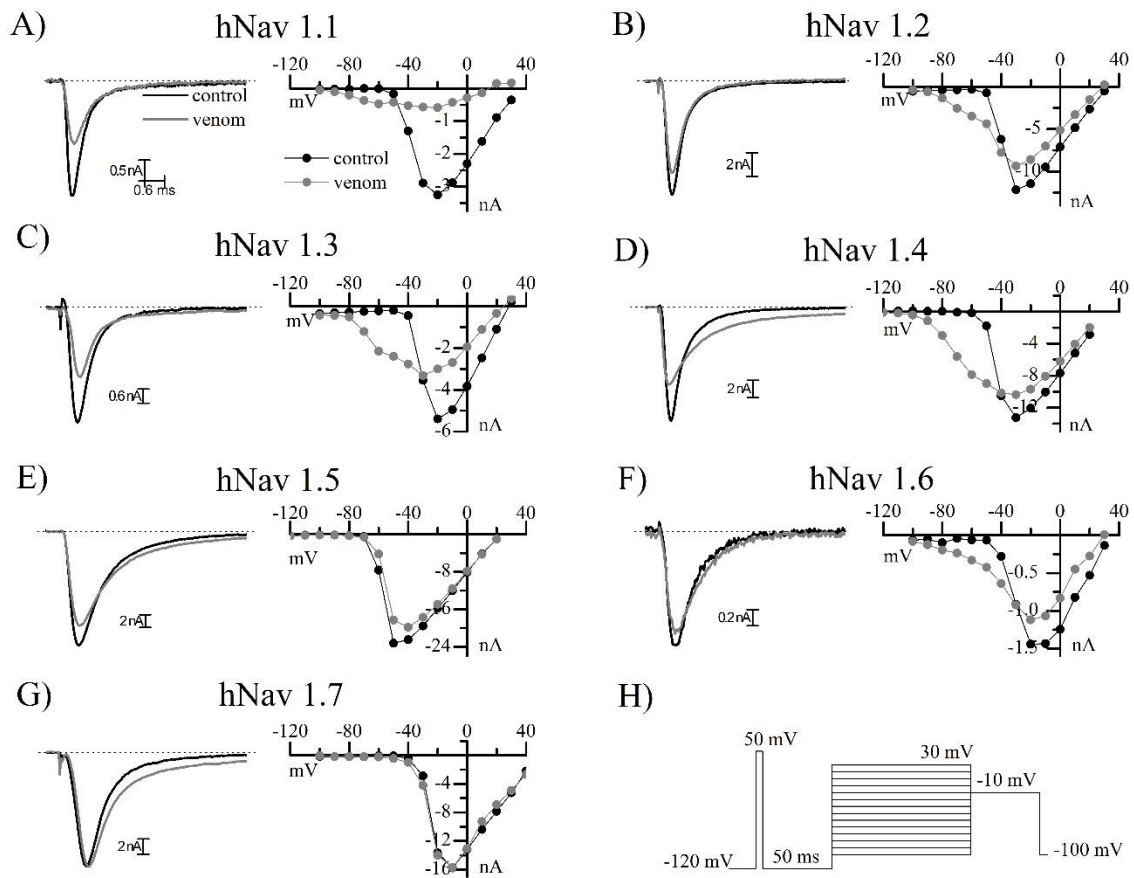


Figura 14. Efecto del veneno sobre los canales de sodio. A-G: en el lado derecho de cada panel se muestran las relaciones de corriente/voltaje en el control (puntos negros) y después de la exposición al veneno (puntos grises). En el lado izquierdo de cada panel se muestran corrientes totales representativas producidas a -10 mV (o -30 mV para los canales hNav 1.4 y hNav 1.5), en control (trazas negras) y después de la aplicación de veneno (trazas grises). Las corrientes se obtuvieron mediante el protocolo que se muestra en el panel H (observe que para los canales hNav 1.4 y hNav 1.5, la despolarización por pasos comienza desde -120 mV). Los escaladores del eje X para los paneles B-G son los mismos que en el panel A. En A-G, las líneas punteadas indican una línea de corriente cero.

Como se mencionó anteriormente, en hNav 1.4 el veneno soluble produce un marcado efecto beta además de ralentizar la cinética de inactivación (efecto alfa). Finalmente, el veneno también indujo un débil efecto alfa en hNav 1.7.

5.3.2. Efecto del veneno en los canales de potasio

El efecto del veneno a 200 $\mu\text{g/ml}$ se evaluó en diferentes tipos de canales de potasio (Fig. 15). A esta concentración, el veneno bloquea completamente los canales hKv1.1 y hERG1 (Fig. 15A y 15E, respectivamente) mientras que la corriente de hKv1.4 se reduce aproximadamente un 20% (Fig. 15B). No se observaron cambios en las corrientes hEAG1 y hKv7.1 + MINK (Fig. 15C y 15D, respectivamente). Una comparación de la corriente residual observada después de la aplicación de veneno se presenta en la figura 15F.

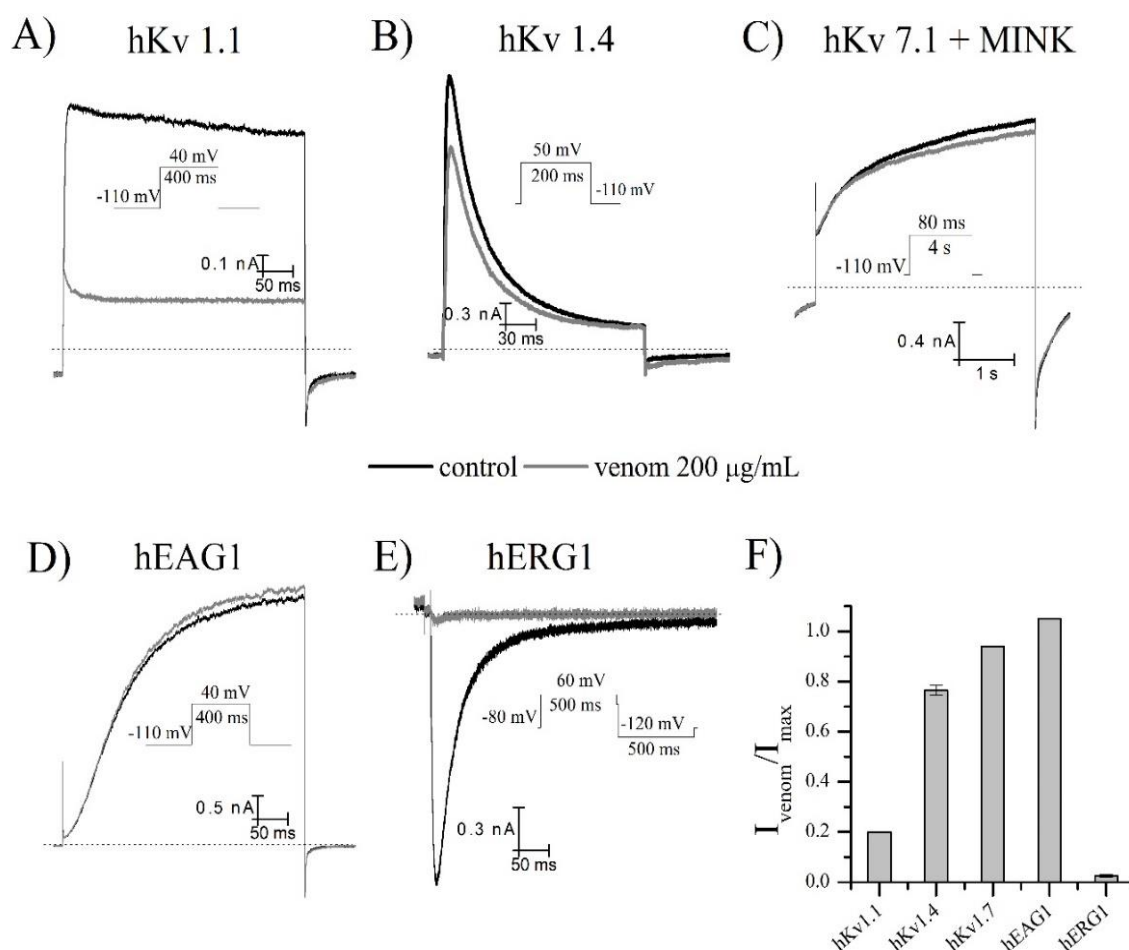


Figura 15. Efecto del veneno sobre los canales de potasio. A-E: corrientes representativas de cada tipo de canales de potasio, en control (trazas negras) y después de la aplicación de veneno (trazas grises). F: Comparación de corrientes residuales normalizadas, después de la aplicación de veneno. Las corrientes fueron provocadas por el protocolo representado en cada panel. En A-E, las líneas punteadas indican cero líneas actuales.

5.3.3 Aislamiento de péptidos con actividad en canales iónicos Kv11.1

Dado que el veneno completo induce bloqueo en los canales hERG1, se realizaron una serie de cromatografías y re fraccionamientos para encontrar componentes que interactúen con los canales de potasio, especialmente los del subtipo hERG1. El aislamiento de los péptidos se llevó a cabo mediante tres pasos. El primer paso fue la cromatografía de filtración en gel en una columna Sephadex G-50 que dio como resultado tres fracciones definidas FI, FII y FIII (Fig. 16A).

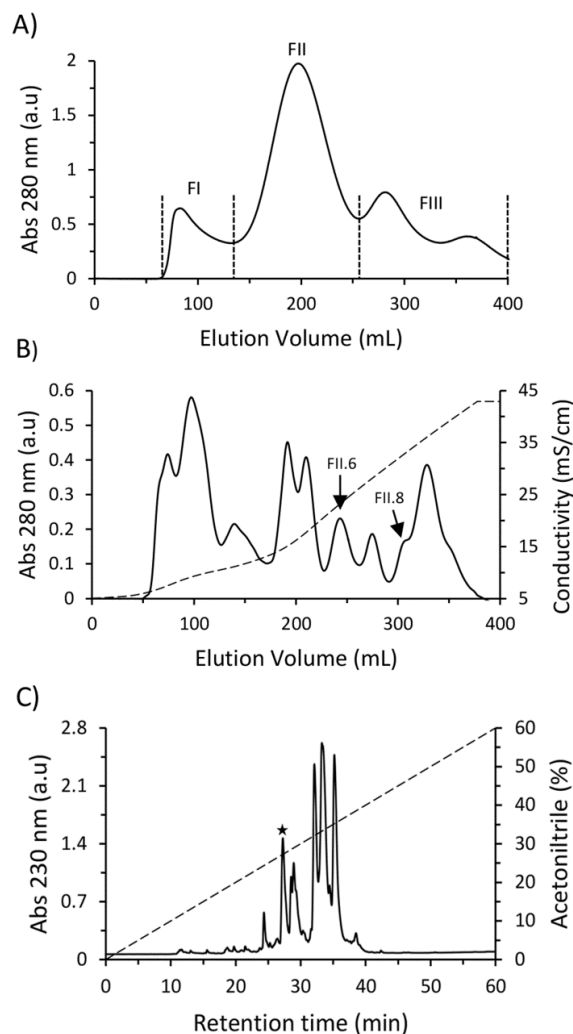


Figura 16. Purificación de la toxina del canal de potasio del veneno de *C. margaritatus*. El aislamiento del péptido activo se logró por medio del protocolo de tres pasos. Primero, la filtración en gel conduce a tres fracciones principales FI, FII y FIII (A). A partir de esto, la fracción FII se separó adicionalmente por cromatografía de intercambio catiónico en 10 subfracciones (B). Las toxinas CmErg1 se aislaron por RP-HPLC de las fracciones FII.6 con un tiempo de retención de 27,4 min (indicado con una estrella) (C).

De acuerdo con separaciones previas de otros venenos de escorpiones del genero *Centruroides*, la fracción FII contiene los componentes tóxicos que actúan sobre canales iónicos, por lo tanto, FII se separó adicionalmente mediante cromatografía

de intercambio catiónico usando una columna CMC que dio como resultado 10 subfracciones diferentes (Fig. 16B).

Todas las subfracciones se separaron por RP-HPLC (Fig. 16C y Fig. 17) que muestran la composición de la fracción FII con toxinas de Masas moleculares mayores a 6500 Da, con probable actividad en el canal de sodio (componentes con tiempos de retención entre 30-40 min) y toxinas del canal de potasio con Masas moleculares entre 3.000 - 6500Da (componentes con tiempos de retención entre 15-30 min).

Se sabe que las toxinas que actúan sobre los canales de potasio son péptidos básicos, que eluyen con una fuerza iónica alta. Por esta razón, ESI-MS evaluó solo los picos principales de la sub-fracción FII.6 a FII.10, buscando péptidos de masas moleculares alrededor de 3500 y 4500 Da (los resultados se resumen en la Tabla 7. Solo las subfracciones FII.6 estaban activas en el canal de potasio hERG1 y la separación adicional de FII.6 por RP-HPLC condujo al aislamiento de dos péptidos activos uno de M 4792.88 Da que se llamó CmErg1.y el otro de M 3980 Da, denominado Cm2Erg1.

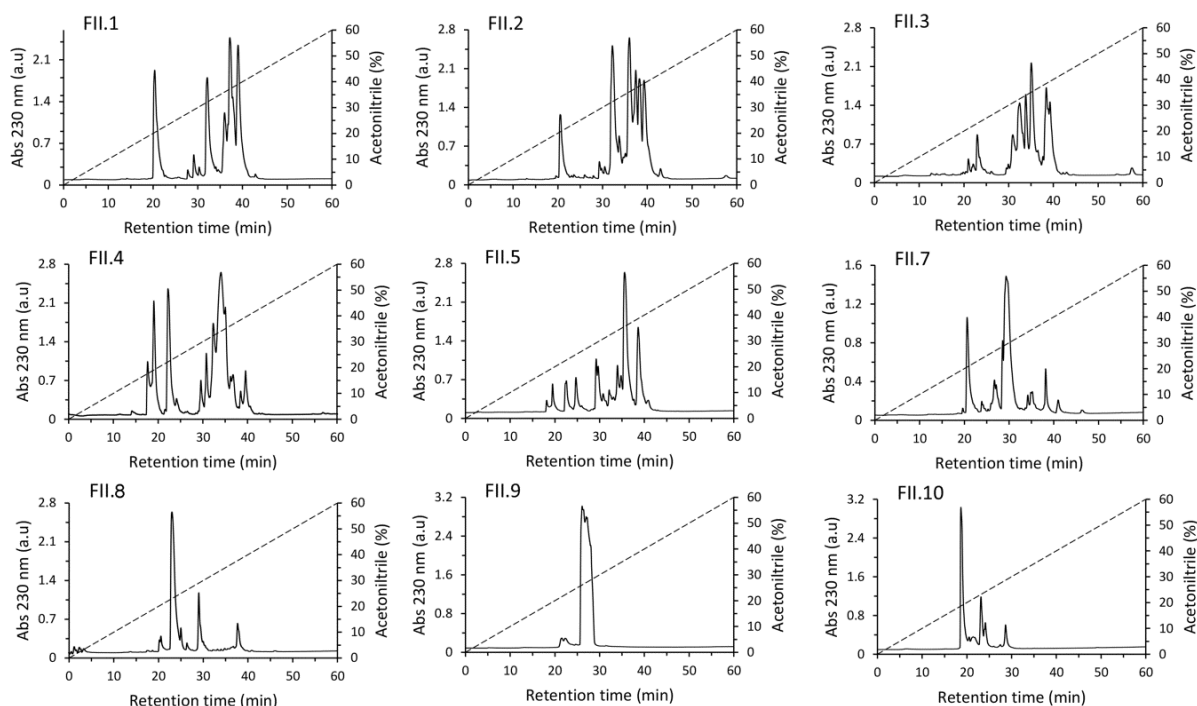


Figura 17. Separación por RP-HPLC de las subfracciones de la cromatografía de intercambio catiónico. Se muestran los cromatogramas de las subfracciones no activas contra el canal de potasio hERG1. La separación se realizó usando un gradiente lineal de 100% de ácido trifluoroacético (TFA) 0,12 (v / v) en agua a 60% de TFA 0,10 (v / v) en acetonitrilo.

La secuencia completa de los péptidos CmErg1 y Cm2Erg1, se obtuvo por degradación automática de Edman. En las fracciones I19,6-7 se encontró un péptido

de M 4179 Da, el cual por su masa molecular se identificó como Margatoxina (MgTx) siendo la responsable de la actividad del veneno en hKv1.1. MgTx es un péptido, previamente aislado del veneno de *C. margaritatus*. bloqueador de alta afinidad de Kv1.3, que también inhibe Kv1.2 y Kv1.1 (39).

Tabla 7. Fracciones II-6 a II-10 obtenidas por HPLC, usando columnas de fase inversa C18 y análisis de espectrometría de masas, el tiempo de retención, la masa molecular y la característica electrofisiológica de cada una. En negrita y cursiva se indican las fracciones con actividad en canales hERG y Kv ($\times 1-4$), (NA) no actividad en hERG y Kv ($\times 1-4$), (NE) fracción no evaluada por estar fuera del intervalo de M para péptidos con actividad en canales de K+

Fracción	Tiempo de retención (min)	Masa Molecular (Da)	Características electrofisiológicas
II-6, 7	24,5	2820,5	NA
II-6, 12	27,4	4792,88	Bloqueo 100% hERG
II-6, 13	28,7	4045,79	NA
II-6, 14	29,1	4309,51 – 3994	NA
II-6, 17	32,3	6992	NE
II-6, 18,19	33,4 a – 33,4 b	4177 – 6470	Recromatografía con FII.9,6
II-6, 20	34,6	6613,5 – 6868,1	NE
II-6, 21,22	35,4 a – 35,4 b	6724	NE
II-7, 2	20.66	3229	NA
II-7, 11	28,4	4045,6	NA
II-7, 13	29,2	6838,87	NE
II-8, 8	25,2	3980,2	Bloqueo hERG 40 %
II-8, 10	29,2	8475,1 – 4133,5	NE
II-8, 14	37,9	7547,6 – 7998,1	NE
II-9, 1	21,6	3704,2 – 3815,1	NA
II-9, 6	26,1	4178,41	Actividad en Kv 1,1, Kv 1,2, Kv 1,3 (MgTx)
II-9, 7	26,4	8475,8 – 4178	Recromatografía con FII.9,6
II-9, 8	27	7498,07 – 7620,7	NE
II-9, 9	27,2	7497,46 – 7618	NE
II-10, 1	18,7	3703,7 – 3718,2	NA
II-10, 5	23,2	8441- 5027,8 – 4915	NA
II-10, 9	28,6	7497, 7620	NE

5.3.4 Caracterización química y electrofisiológica del péptido CmERG1

La secuencia del péptido CmErg1 se determinó mediante el método degradación de Edman obteniéndose una toxina 42 residuos de aminoácidos, con ocho cisteínas y cuatro supuestos puentes disulfuro (figura 18). La secuencia CmERG1 se comparó mediante Blast con la primera toxina Erg aislada de *C. noxius*, la CnErg1, un gamma potasio toxina (γ KTx1.1) junto a otras cuatro γ KTxs: CeERG4, CeERG5, CtERG1 y BeKm1. CmERG1 difiere de CnERG1 por tres sustituciones no conservadas en la región del farmacóforo, de acuerdo con los experimentos de ciclos de mutantes

dobles realizados con el canal BeKm1 y ERG1, informados por Tseng *et al*, 2007 (36) (figura 18), residuos resaltados en amarillo.

	10	20	30	40	Identity (%)
COHLM3 γKTx1.10 CmErg1	DRDSCVDKSRCAKYGYFQECTDCCCKKYGHN-GGTCMFFKCKCA				
Q86Qt3 γKTx1.1 CnErg1	Y..Q...NA.....				90.5 [ref]
P0C892 γKTx1.7 CeErg4	S....Y...Q....A...-				90.5 [ref]
P0C893 γKTx1.8 CeErg5	I....S....Y...Q....A...-				88.1 [ref]
C0HJW3 γKTx1.9 CtErg1	I....S....Y...Q....A...-R.....				85.7 [ref]
Q9BKB7 γKTx2.1 BeKm1	---RPT.I-K.---SES	YQ.FPV..SR	FGKTN.R.VNGF.D.F		

Figura 18. Alineación de CmERG1 con toxinas ERG similares caracterizadas previamente por su función. Las cisteínas se resaltan en gris y los residuos que son importantes para la interacción toxina-canal se resaltan en amarillo (25) (26) (8). Las posiciones idénticas, a CmERG1, se indican con puntos. Los espacios se indican con guiones. La secuencia de la toxina estructuralmente no homóloga BeKm1 se alinea de acuerdo con los elementos secundarios funcionales y las cisteínas.

La toxina CmERG1 se evaluó en las corrientes hERG1 mediante experimentos de electrofisiología. Similar a la acción de CnERG1 sobre hERG1, CmERG1 bloquea los canales de manera rápida y reversible (Fig. 19C). La curva de respuesta a la dosis se calculó mediante la aplicación de la concentración de toxina de 1 nM a 1 μM. Los datos se ajustaron con una ecuación de Hill que resultó en una CI50 de 3.4 ± 0.2 nM de pendiente de 1.1 ± 0.05 (fig. 19A). Sorprendentemente, a las concentraciones más altas (1 μM), CmERG1 pudo bloquear completamente los canales (100%), a diferencia de CnERG1 y otros γ-KTxs similares que permitieron aproximadamente un 10% de corriente, aunque a una concentración saturante. Además, la toxina CmERG1 no aceleró la cinética del proceso de cierre (fig. 19B). Estas diferencias en las características de la toxina CmERG1 sugieren que esta toxina puede interactuar con los canales ERG1 por una forma de "bloqueo de poros" en lugar de una forma de "bloqueo de torreta" como se informó anteriormente para las γ-KTxs. Este péptido aislado del veneno total de *C. margaritatus*, fue informado a la base de datos United Prot quedando reportado con el número de acceso COHLM3.

5.3.5 Caracterización química y electrofisiológica del péptido Cm2ERG1

La secuencia del péptido de M=3980,8 Da, se determinó mediante degradación de Edman obteniendo una toxina de 37 residuos de aminoácidos con seis cisteínas y tres puentes de disulfuro (figura 4). Presenta una identidad del 97,3% con un péptido putativo de 37 residuos de aminoácidos, obtenido por transcriptómica de la glándula de veneno del escorpión *Centruroides hentzi*. (Ward M, J., et al, 2018) y clasificada

como una alfa Potasio toxina (α -KTx) (código A=A2I9LNP3. La toxina M=3980,8 difiere de ChxKTx en una sustitución del aminoácido D por N (figura 20).

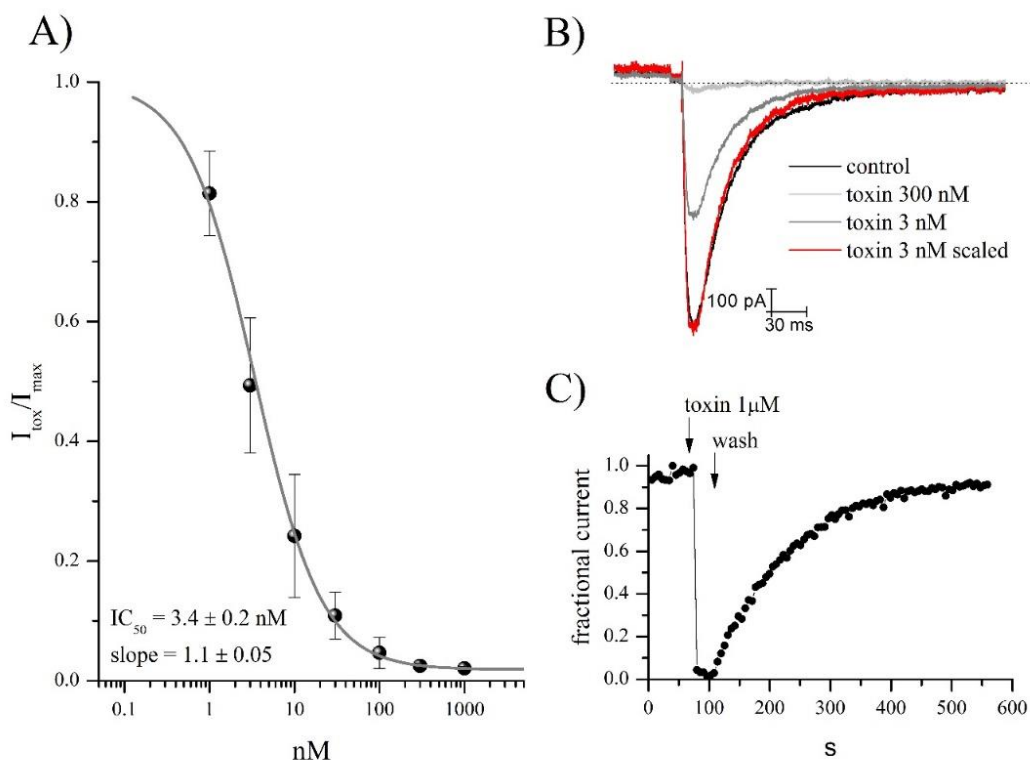


Figura 19. Caracterización de la toxina CmERG1. A) Curva dosis-respuesta. Las corrientes fraccionales se trazaron contra el logaritmo de la concentración de toxina. Los datos se ajustaron por medio de la ecuación de Hill (línea gris) que proporciona una CI_{50} y una pendiente de 3.4 ± 0.2 nM y 1.1 ± 0.05 respectivamente. B) Una corriente hERG1 representativa en control (línea negra) y después de la aplicación de la toxina CmERG1 a 300 nM (trazo gris claro) y 3 nM (trazo gris y trazo rojo para corriente escalada). C) Curso temporal del bloqueo durante la aplicación de toxina a 1 μ M y durante el lavado.

En alineamiento con otras toxinas, Cm2ERG1 tiene identidad del 71,4% con una α -KTx 4.4, aislada del escorpión *Tityus obscurus* (escorpión del Amazonas) (*Tityus cambridgei*) bloqueadora reversible de canales de Potasio Shaker B (con alta afinidad), y de canales de potasio humano Kv1.3/KCNA3.

Tiene afinidad del 68,6 % con una α -KTxs, del escorpión *Tityus discrepans* (escorpión venezolano), con bloqueo reversible de canales de potasio Shaker B.

Tiene afinidad del 68,6% con una α -KTx 4.1, aislada del veneno del escorpión *Tityus serrulatus* (escorpión brasileiro), potente bloqueador de los canales

Kv1.1/KCNA1 (85%), Kv1.2/KCNA2 (91%), Kv1.3/KCNA3 (89%), Kv1.6/KCNA6 (94%), y Shaker (97%).

De igual manera presenta afinidad del 68,6 % con una alpha-KTx 4.7, de *Tityus stigmurus* (escorpión brasileiro), que bloquea los canales Kv1.1/KCNA1 (85%), Kv1.2/KCNA2 (91%), Kv1.3/KCNA3 (89%), Kv1.6/KCNA6 (94%), y Shaker (97%). (figura 20)

(Cm)	TFIN ^N HKCKSS	SECLPACKAA	IGRASGKCIN	STCKCYY	37aa	3980,8 Da
Identidad	TFI+HKCKSS	SECLPACKAA	IGRASGKCIN	STCKCYY		
(<i>C. hentzi</i>)	TFID ^D HKCKSS	SECLPACKAA	IGRASGKCIN	STCKCYY	59aa	6535 Da
B201910295C475328CEF7	TFINHKCKSS	SECLPACKAA	IGRASGKCIN	STCKCYY	37	
P60210 KAX44_TITOB	VFINVKCRGSKE	CLPAKAAV	GKAAGK	MNGKCKCYP	37	71,4 %
P59925 KAX43_TITDI	VFINVKCTGSKQ	CLPAKAAV	GKAAGK	MNGKCKCYP	37	68,6%
P46114 KAX41_TITSE	VFINAKCRGSPE	CLPKCKEAI	GKAAGK	MNGKCKCYP	37	68,6%
P0DPT4 KAX47_TITST	VFINAKCRGSPE	CLPKCKEAI	GKAAGK	MNGKCKCYP	37	68,6%
P0CB56 KAX46_TITST	VFINAKCRGSPE	CLPKCKQAI	GKAAGK	MNGKCKCYP	37	68,6%

Figura 20. Alineación del péptido de M= 3980 Da, con alpha Potasio Toxinas de *C. hentzi* y de escorpiones del género *Tityus*. Las cisteínas se resaltan en verde.

Cm2ERG1, se evaluó en las corrientes hERG1 mediante experimentos de electrofisiología. Este péptido bloquea parcialmente los canales hERG1 de manera rápida y reversible (Fig. 21). Dado que el bloqueo del canal estuvo por debajo del 50% y que la dosis utilizada del péptido fue de 500 μ M, se considera que este efecto no es significativo en comparación a la concentración de 30 nM con efecto de bloqueo del 100% de la toxina CmERG1.

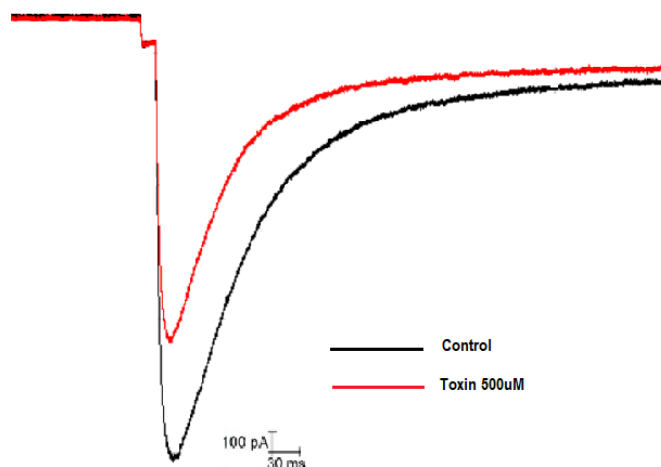


Figura 21. Caracterización electrofisiológica del péptido M=3980,86 Da. Una corriente hERG1 representativa en control (línea negra) y después de la aplicación de la toxina M=3980,86 Da a 500 μ M (trazo rojo para corriente escalada).

5.4 DISCUSIÓN

El veneno de los escorpiones de la familia Buthidae contienen las neurotoxinas que actúan en los canales de sodio dependientes de voltaje responsables de la sintomatología clínica similar a la hiperactividad autonómica (taquicardia, hipertensión, arritmias, midriasis, salivación excesiva y lagrimeo, bradicardia, hipotensión, etc.) (105)(11). La muerte es consecuencia de defectos cardiovasculares atribuidos a la liberación masiva de catecolaminas desde las glándulas suprarrenales y los terminales nerviosos noradrenérgicos, junto con complicaciones asociadas con edema pulmonar e insuficiencia respiratoria en mamíferos (106)(107).

El veneno de *C. margaritatus* ha sido considerado de baja toxicidad (1). En Colombia, dos poblaciones de esta especie se diferencian según la distribución geográfica: la primera en el Valle de Patía con un LD₅₀ = 42.83 mg / Kg para ratones (41) y la segunda en el Valle del Cauca con un LD₅₀ = 59.9 mg / kg para ratones (8), la diferencia poblacional en cuanto la toxicidad del veneno, motivo la realización del presente trabajo.

A la fecha los estudios que incluyen caracterizaciones electrofisiológicas y funcionales del veneno de *C. margaritatus* son escasas, teniendo solamente el reporte de la toxina Margatoxina, aislada de este veneno, primero identificada como bloqueador potente y específico de Kv1.3 (39) y luego caracterizada como bloqueador de los canales Kv1.1 y Kv 1.2 (12).

En este trabajo se presenta el primer análisis electrofisiológico del veneno total de *C. margaritatus* en los canales heterólogos de Na⁺ y K⁺ expresados en células HEK y CHO. Se descubrió que el veneno modifica las propiedades cinéticas de los canales hNav, ocasionadas por la presencia de componentes moleculares capaces de interactuar con estos receptores (34).

El veneno de *C. margaritatus* también bloquea los canales de potasio hKv 1.1 lo cual se atribuye a la presencia en el veneno de margatoxina. Durante la separación de la fracción II, se encontró un péptido de masa molecular de 4179 Da el cual corresponde a la masa molecular experimental de Margatoxina. Dado que ya se ha realizado una caracterización extensa de este péptido, se decidió no investigar más a fondo el bloqueo del canal de potasio Kv1.1. En cambio, se profundizó en la fracción donde se encontraba el péptido con actividad bloqueadora del canal hERG1. Este es un péptido de 42 aminoácidos con cuatro puentes disulfuro, que recibió el nombre trivial de CmErg1, y de acuerdo con la clasificación internacional de UniProt corresponde al código sistemático de γ-KTx 1.10, el cual fue reportado en la base UniProt bajo el "número de concesión C0HLM3".

Se cree que el mecanismo de acción de las γ-KTxs es a través de interacciones con el canal "torret", donde el bucle de poro S5 hace contacto con la alfa hélice de la toxina. Se propusieron dos modelos para explicar el comportamiento poco común de las γKTxs que comprende un bloqueo de corriente parcial, a pesar de la

concentración de saturación y la aceleración del proceso de cierre debido a la preferencia de la toxina por el estado cerrado del canal.

En el modelo cinético propuesto por Hill y sus colaboradores (35), la primera toxina se une al canal en un sitio que se encuentra en el complejo que permite el flujo de iones (TC *) y luego pasa al complejo de canal de toxina bloqueado (TC). El bloqueo incompleto se explica por la tasa relativamente rápida de disociación del complejo (TC) en comparación con la tasa de conversión del complejo de reunión del canal de toxina (TC *) (32)(38)(37). Además, el grupo de Tseng propuso para BeKm-1 (Toxina del escorpión *Buthus eupeus*, inhibidor de hERG), una interacción canal-toxina "dependiente del estado", en la que la toxina se une preferentemente a los canales cerrados mientras que la inactivación promueve la unión de la toxina (36)(105). Esto explica la aceleración del proceso de desactivación inducida por la toxina. Estos dos modelos no son mutuamente excluyentes y, en conjunto, explican las características principales de las toxinas ERG que son el bloqueo incompleto y la aceleración del proceso de desactivación (105).

A diferencia de los otros γ KTxs, la nueva toxina CmErg1 tiene la capacidad de bloquear el 100% de los canales hKv11.1. Se desconoce la naturaleza de la actividad de bloqueo completo de CmErg1, pero ciertamente reside en su secuencia. Los estudios sobre el BeKm-1 de *Mesobuthus eupeus* (76), mostraron que el farmacóforo está conformado principalmente por tres residuos (Y11, F14 y R20) que se unen a la superficie del canal hERG1 en la región de la "torreta" (el conector S5-P) e incluye el K18 como aminoácido importante. Entonces, podemos suponer que el farmacóforo CnErg1 comprende los residuos Q18, Q21 y A27 ya que CnErg1 y BeKm-1 comparten la topología de la estructura secundaria, con poca diferencia en la longitud de los bucles, pero con orientación conservada del probable bloqueador de Lisina (K25) (Fig. 22).

La alineación en la figura 18 resalta los cambios de los residuos CmERG1 que están altamente conservados en los otros γ -KTxs. El G21T y el A27Y pueden ser particularmente relevantes ya que presumiblemente involucran al farmacóforo. Se demostró para BeKm-1 que la mutación del Arg20 para una Alanina disminuye dramáticamente la afinidad con el canal ERG ya que se pierde cierta interacción (es decir, con los residuos Gln592, Asn629, Ser631 y Asn633) (36)(105). En el contexto de CnERG1, el aa Ala27 (equivalente al aa Arg20 en BeKm-1) no tiene contacto con el enlazador S5-P (Figura 22B).

En CmERG1, el aa Tyr en esa posición aparentemente interactúa con el aa Arg582 del conector S5-P (Figura 22C) mejorando la afinidad con el canal hERG1 y tal vez estabilizando el complejo de canal de toxina bloqueado (TC), de acuerdo con el mecanismo sugerido por Hill (35). Esto podría dar lugar a la reducción de corriente completa observada para CmERG1, así como explicar por qué CmERG1 no acelera la cinética de desactivación. Además, se describió que la posición Phe14 de BeKm-1 (Gln21 en el caso de CnERG1) está rodeada de residuos del conector S5-P e interactúa directamente con la porción aromática del Tyr597 (36). Aparentemente, en CnERG1, la interacción con el Tyr597 se conserva a través del Gln21 que puede

establecer enlaces de hidrógeno (Figura 22D). En CmERG1, esta posición está ocupada por un Thr que aún podría interactuar con el Tyr597 (Figura 22E), lo que sugiere un efecto mínimo de esta mutación en la interacción del canal CmERG1-hERG1.

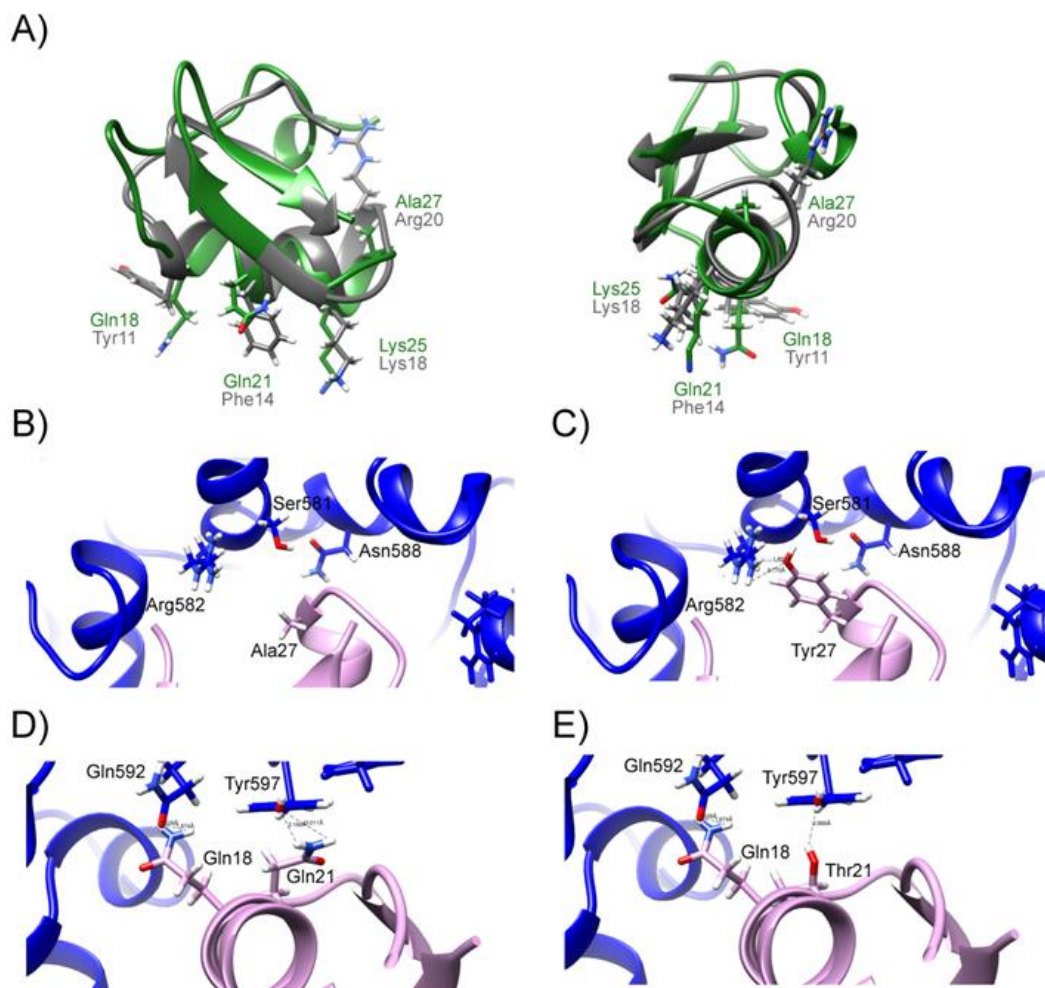


Figura 22. Modelo estructural del efecto de unión de la mutación en CmErg1 con respecto a CnErg1. Primero, la estructura CnErg1 (verde) (PDB: 1px9) se superpuso en la estructura BeKm-1 (gris) (PDB: 1j5j) por la herramienta MatchMaker del software UCSF Chimera utilizada por defecto (A). La estructura secundaria del CnErg1 coincide con el BeKm-1 con prácticamente la misma orientación de los residuos que supuestamente forman el farmacóforo (cadena lateral expuesta). El modelo de la interacción de CnErg1 con el canal hERG1 se creó tomando como plantilla el acoplamiento de BeKm-1 en la boca externa de hErg realizado y amablemente compartido por el Dr. Tseng (Tseng et al., 2007). El efecto de los cambios Q21T y A27Y en CmErg1 se evaluó individualmente mutando el residuo mediante el rotador más probable (Dunbrack, 2002) de Thr y Tyr, respectivamente. Las posibles interacciones se establecieron por la proximidad de la cadena lateral que toma un radio límite de 3Å. A partir de esto, el cambio de Ala27 (B) para Tirosina (C) es el que más impacta al formar nuevos contactos con el conector S5-P (Arg582). Aparentemente, el cambio de Gln21 (D) a Treonina (E) no afectó significativamente la interacción con la superficie del canal (Tyr597).

6. CAPITULO III.

6.1 OBJETIVO

6.1.1 Evaluar el efecto vasomotor de los péptidos aislados con actividad en canales iónicos Kv1.x y Kv 11.1 en musculo liso vascular de biomodelos murinos

6.2 METODOLOGÍA

6.2.1 Determinación de los péptidos a evaluar.

Los péptidos aislados, purificados, secuenciados y caracterizados anteriormente fueron seleccionados para determinar su actividad vasomotora. Se incluyó además una fracción que contenía los demás péptidos de la fracción II (6-10). De esta manera los péptidos a evaluar son: Péptido de M= 4178 Da, correspondiente a Margatoxina (MgTx) denominado para este estudio como péptido I (PI); Péptido de M= 4792,88 Da, correspondiente a la nueva toxina CmHERG1, caracterizada en este estudio y denominada como péptido II (PII); Péptido de M=3980,86 Da, correspondiente a una α -KTx, denominada como péptido III (PIII); los demás péptidos que se encontraron en las subfracciones 6-10 de la fracción II, denominados como (FII 6-10) (tabla 8)

Tabla 8. Fracciones II 6-10 obtenidas por HPLC, usando una columna de fase reversa C18 y análisis por espectrometría de masas.

Fracción	Tiempo retención(s)	Masa Molecular (Da)
II-6, 7	24,5	2820,5
II-6, 13	28,7	4045,79
II-6, 14	29,1	4309,51 – 3994
II-7, 2	20.66	3229
II-7, 11	28,4	4045,6
II-9, 1	21,6	3704,2 – 3815,1
II-10, 1	18,7	3703,7 – 3718,2

6.2.2 Determinación del tamaño de la muestra biológica.

La muestra biológica estuvo constituida por 80 anillos aórticos procedentes de 20 ratas macho, de la especie *Rattus norvegicus*, cepa Wistar, de cuatro meses de edad, con un peso de 300 ± 20 g, criadas en el Bioterio de la Facultad de Salud de la Universidad del Valle. Las ratas fueron sedadas con Pentobarbital sódico vía intraperitoneal (IP) en dosis de 60 mg/kg, posteriormente se les practicó dislocación cervical seguida de una incisión pre esternal, abordando su cavidad torácica para la disección de la arteria aorta descendente. De cada aorta se obtuvieron 5 anillos funcionales. Los 50 anillos aórticos aislados fueron separados en 5 grupos

independientes por factor (veneno total y cuatro péptidos aislados), cada uno con un diseño completamente aleatorizado con 5 repeticiones, cada repetición se hizo en un anillo aórtico diferente. En cada experimento se hizo 5 tratamientos con dosis acumulativas de la fracción molecular del veneno.

Para establecer los patrones de vasoconstricción y vasodilatación se tuvo como referente el método descrito por Furchgott y col (108), modificado en este experimento y consistente en 2 experimentos: uno para determinar el efecto vasoconstrictor de cada uno de los péptidos aislados, utilizando como control positivo el fármaco Fenilefrina y el segundo para determinar el efecto vasodilatador de los péptidos utilizando como control positivo el fármaco Bradicinina. Estos dos experimentos se llevaron a cabo en anillos íntegros (sin lesión endotelial) y en anillos libres de endotelio (incubados con los fármacos L-Name + Indometacina). Cada experimento se llevó a cabo con 5 repeticiones por cada uno de los 4 péptidos evaluados para un total de 80 anillos aórticos.

6.2.3 Montaje de los anillos aórticos en la cámara de órgano aislado.

Una vez extraída la aorta torácica se eliminó de ella la capa adventicia y el tejido conectivo periaórtico, colocando el anillo en una caja de Petri con solución fisiológica Krebs Henseleit (KH), compuesta por NaCl (119 mM), KCl (4,7 mM), KH₂PO₄ (1,2 mM), SO₄Mg (1,2 mM), CaCl₂ (2,5 mM), NaHCO₃ (25 mM) y glucosa (5,6 mM). Cada aorta fue seccionada en 5 anillos de 5 mm de longitud y cada anillo se insertó por la luz del vaso en dos ganchos de forma triangular, uno se sujetó a la base de la cámara de órgano aislado (con capacidad para 20 ml) y el otro al transductor de fuerza [Tissue Bath Station, BIOPAC TM] y la superior a la galga extensiométrica transductora de 50 g [TSD125, BIOPACTM] conectada a un equipo de adquisición de datos [MP-100, BIOPACTM] y de este a un computador para observación en tiempo real y almacenamiento para análisis de los registros mediante el software Acknowledge v 3.07 para Windows XP®. (figura 23).

Inicialmente cada anillo en la cámara con 10 ml de solución KH, recibió una tensión basal de 2 g para efectos de calibración de la curva basal (Figura 1B). En cada cámara se colocó 10 ml de solución KH y se mantuvo con burbujeo continuo de una mezcla carbógena de gases (95% de O₂ y 5% de CO₂) a una temperatura estable de 37,0 ± 0,5°C. Para efectos de calibración y estabilización, se le aplicó al anillo una tensión de 2 g (equivalente a 120 mmHg) por 60 minutos con recambio de la solución KH cada 10 minutos. Para comprobar el estado funcional de cada anillo se agregó a la cámara una solución de KCl 40 mM para evaluar la respuesta de vasoconstricción y posteriormente se adicionó clorhidrato de acetilcolina (ACh) 10 µM para evaluar la respuesta de vasodilatación. Si hay respuesta a la AcCh, el anillo se encuentra íntegro con endotelio. Los anillos con respuesta de vasodilatación inferior a 0,5 g fueron descartados para la evaluación.



Figura 23. Estación del equipo de baño de órgano aislado. Marca Biopac con 4 cámaras de capacidad 20 ml, flujo de carbógeno en cada cámara, sistema de calentamiento de cámaras a 37°C, PC con software Acknowledge v 3.07, Transductores de tensión y termostato (37°C).

6.2.4 Determinación del efecto vasomotor del veneno total

Inicialmente se hizo determinación del efecto del veneno total sobre del tono vascular, se realizaron curvas de concentración exponiendo el anillo aórtico a dosis acumulativas de veneno soluble desde 10µg, 50 µg, 100 µg, 200 µg, 300 µg, 400 µg, hasta completar 600µg de veneno total en la cámara de órganos, cada dosis se dejó en exposición por un intervalo de 10 minutos antes de adicionar la siguiente dosis. Las curvas de veneno se realizaron en anillos aórticos íntegros (con endotelio), anillos lesionados de endotelio (sin endotelio) y anillos expuestos a los reactivos L-Name e Indometacina con el fin de saturar las vías de vasodilatación el endotelio, estos últimos fueron incubados por 20 minutos antes de realizar la curva de veneno y tomar su registro.

6.2.5 Determinación del efecto vasoconstrictor de los péptidos aislados

En anillos íntegros.

Se utilizaron 5 anillos aórticos para cada uno de los péptidos aislados. Verificada la viabilidad del anillo y la respuesta endotelial, se utilizó como control positivo Fenilefrina utilizando concentraciones acumulativas (2, 4, 6... 30 µM) con intervalos de 10 min hasta alcanzar la tensión máxima. Posteriormente se procedió a hacer lavado del anillo y de la cámara con solución KH, y luego de 30 minutos de lavado se procedió a anexar dosis acumulativas del péptido problema cada 10 minutos hasta alcanzar tensión máxima. Las dosis de cada péptido se calcularon teniendo como referente la EC50 del veneno total en este experimento y la cantidad del péptido que pueda existir en el veneno total a partir de la masa molecular hallada.

En los anillos donde no hubo respuesta vasoconstrictora, se hizo nuevamente una curva de fenilefrina con el fin de verificar algún efecto del péptido sobre la respuesta del anillo al fármaco.

En anillos sin endotelio.

Verificada la viabilidad del anillo, se procedió a incubarlo con los fármacos L-Name + Seratrodast durante 30 minutos, con el fin de anular la actividad endotelial. Posteriormente se verificó la no actividad endotelial contrayendo el anillo con KCl y relajando con AcCo, en cuyo caso no hubo respuesta vasodilatadora a AcCo. Se hizo lavado con solución KH y después de 30 minutos se agregó el péptido en las dosis anteriormente establecidas. Se utilizaron 5 anillos por péptido evaluado.

6.2.6 Determinación del efecto vasodilatador de los péptidos aislados

En anillos íntegros. Verificada la viabilidad del anillo y la funcionalidad endotelial, se hizo vasoconstricción del mismo utilizando KCl 40 mM durante 30 minutos, posteriormente se aplicó el péptido problema en la dosis establecida en las valoraciones de vasoconstricción. Cuando no hubo respuesta positiva de vasodilatación por el péptido, se hizo una curva dosis respuesta agregando al anillo el fármaco Bradicinina como control positivo.

El mismo proceso se repitió para evaluar efecto vasodilatador de los péptidos en anillos sin endotelio, los cuales fueron previamente incubados con L-Name y Seratrodast antes de la contracción con KCl y de anexar las dosis del péptido.

6.2.7 Recolección de la información y procesamiento de datos

Se obtuvo una serie de registros gráficos de los cuales, mediante el Software AcqKnowledge, se hallaron los valores de respuesta contráctil o dilatadora en gramos. Los valores de tensión se llevaron también a valores de porcentaje teniendo como referente el control positivo. El análisis de los datos se hizo mediante ANOVA de una vía para aquellos resultados que cumplieron la prueba de normalidad de Kolmogorov-Smirnov, con un nivel de significancia de $p < 0,05$. Todos los datos fueron analizados con el programa estadístico GraphPad Prism 5.0®.

En los casos donde hubo efecto vaso contráctil o vasodilatador se hicieron curvas Dosis Respuesta utilizando los valores de tensión en porcentaje o en gramos y las dosis en valores logarítmicos obteniendo valores de IC 50 para los fármacos control y cada uno de los péptidos.

6.3 RESULTADOS Y ANALISIS

6.3.1 Efecto vasomotor del veneno total

La determinación del efecto del veneno total de *C. Margaritatus* sobre anillos aórticos con o sin endotelio, fue fundamental para poder establecer los posibles efectos de los péptidos aislados. El porcentaje de contracción inducido por el veneno total sobre el tono basal del anillo aórtico permitió establecer que el veneno es tóxico en anillos sin endotelio con una EC50 (concentración que da una respuesta media entre la línea de base y la máxima) entre 262 y 258 µg disueltos en 10 ml de sln KH que es el volumen de la cámara. En la tabla 2 se muestra el porcentaje de contracción del anillo (Emax) y la cantidad de veneno (ug) para generar una contracción efectiva (EC50).

Haciendo un análisis de los porcentajes de contracción del anillo por cada dosis del veneno mediante comparación múltiple de Tukey's, los anillos con lesión endotelial y los incubados con L-Name + Indometacina presentan diferencia estadísticamente significativa con respecto a los anillos intactos de endotelio de donde se concluye que el veneno total causa vasoconstricción a partir de los 100 µg hasta los 600 µg presentes en la cámara y a partir de allí al aumentar la dosis no hay efecto de contracción adicional (figura 24).

Tabla 9. Valores de contracción (% con KCl) de los anillos aórticos sanos, incubados con L-name + Indometacina y con lesión endotelial, tratados con veneno total.

	Anillo integro	Anillo con lesión endotelial	Anillo con L-name + Indometacina	Significancia
Emax (%kcl)	6,7±1,6	43 ± 2,5	35,41 ± 3,5	0,0001***
EC50 (ug)	328 ± 51	262,5 ± 11,39	258,3 ± 30,38	0,0123 **

ANOVA, Media ± Error estándar, **p<0.01 ***p<0.001

6.3.2 Prueba de efecto vasomotor de los péptidos aislados en anillos aórticos

Cada uno de los 4 péptidos aislados fueron evaluados agregando dosis acumulativas en la cámara con 10 ml de solución KH teniendo como valor referente un valor medio calculado así: para PI = 2,42 µg (57.93 nM), para PII = 0,51 µg (10.64 nM), para PIII = 1.02 µg (25,63 nM), para FII6-10 = 4,47 µg (15,05 nM) hasta alcanzar el mayor valor de tensión o relajación del péptido.

La respuesta vasoconstrictora o vasodilatadora de cada uno de los péptidos se evaluó en anillos íntegros y anillos sin endotelio. En las tablas 9.1 a 9.4, se presentan los registros de tensión promedio de 5 anillos aórticos en gramos y en porcentajes de tensión a partir de la tensión máxima producida por 40 mM de KCl (100%).

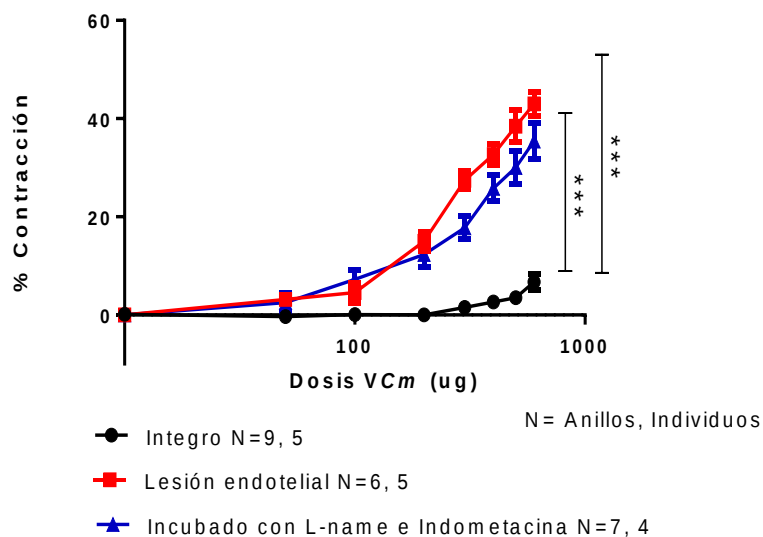


Figura 24. Efecto del veneno total de *C. margaritatus* (VCCm) en las curvas acumulativas de concentración-respuesta en anillos aórticos de rata (●) en preparaciones con endotelio presente, (■) con endotelio eliminado y (▲) con endotelio más L-name e Indometacina.***p<0.001. N= Número de piezas de anillos, número animales experimentales. (n>4).

Para establecer la curva dosis-respuesta (DR) y determinar la EC50 de cada uno de las toxinas caracterizadas, los valores de concentración molar (M) de la dosis se escriben como log de la concentración molar (en Nm).

Tabla 9.1. Registros de tensión en gramos (g) y en porcentaje (%) para cada uno de los efectos vasoconstrictor y vasodilatador como respuesta a las diferentes dosis del péptido PI (M=4177Da)

Péptido PI (4177 Da)		Efecto Vasoconstrictor				Efecto Vasodilatador			
		anillo integro		Anillo sin endotelio		Anillo integro		Anillo sin endotelio	
Dosis (nM)	Dosis (log)	Tensión (g)	% Tensión	Tensión (g)	% Tensión	Tensión (g)	Tensión %	Tensión (g)	Tensión %
1	0,00	0,000	0,00	0,000	0,000	1,049	100,00	1,987	100,00
11	1,04	0,018	1,42	0,016	0,905	1,033	98,91	1,961	98,57
23	1,36	0,030	2,73	0,032	1,577	1,034	98,99	1,962	98,99
34	1,53	0,048	4,23	0,037	2,483	1,042	98,60	1,927	94,36
46	1,66	0,082	6,96	0,067	4,522	1,032	96,48	1,935	95,92
58	1,76	0,084	7,31	0,072	4,638	1,040	98,21	1,932	95,55
70	1,85	0,107	9,20	0,071	4,616	1,029	97,86	1,930	94,99
81	1,91	0,111	9,51	0,098	6,385	1,035	97,23	1,919	95,84
93	1,97	0,125	11,00	0,080	5,464	1,039	98,88	1,949	97,82
104	2,02	0,126	11,14	0,096	6,698	1,036	98,30	1,944	98,28

Tabla 9.2. Registros de tensión en gramos (g) y en porcentaje (%) para cada uno de los efectos vasoconstrictor y vasodilatador como respuesta a las diferentes dosis del péptido PII (M=M4792 Da)

Péptido		Efecto Vasoconstrictor				Efecto Vasodilatador			
PI (4792 Da)		anillo integro		Anillo sin endotelio		Anillo integro		Anillo sin endotelio	
Dosis (nM)	Dosis (log)	Tensión (g)	% Tensión	Tensión (g)	% Tensión	Tensión (g)	Tensión %	Tensión (g)	Tensión %
1	0,00	0,000	0,00	0,000	0,000	1,175	100,000	0,991	100,000
2,12	0,33	0,034	2,49	-0,074	-3,213	1,144	97,487	0,967	97,138
4,24	0,63	0,042	2,67	-0,259	-11,895	1,127	96,153	0,977	97,939
6,36	0,80	0,051	3,24	-0,221	-10,147	1,128	96,330	0,956	96,672
8,48	0,93	0,062	3,77	-0,342	-16,145	1,137	96,847	0,954	95,611
10,6	1,03	0,044	3,05	-0,283	-12,763	1,132	96,524	0,964	97,609
12,72	1,10	0,044	3,01	-0,415	-19,596	1,137	96,851	0,962	97,270
14,84	1,17	0,051	3,29	-0,283	-11,731	1,147	97,575	0,946	95,306
16,96	1,23	0,047	2,91	-0,361	-15,393	1,170	99,540	0,956	96,338
19,08	1,28	0,044	2,77	-0,414	-17,950	1,168	99,507	0,966	97,727

Tabla 9.3. Registros de tensión en gramos (g) y en porcentaje (%) para cada uno de los efectos vasoconstrictor y vasodilatador como respuesta a las diferentes dosis del péptido PIII (M=3980 Da)

Péptido		Efecto Vasoconstrictor				Efecto Vasodilatador			
PIII (3980 Da)		anillo integro		Anillo sin endotelio		Anillo integro		Anillo sin endotelio	
Dosis (nM)	Dosis (log)	Tensión (g)	% Tensión	Tensión (g)	% Tensión	Tensión (g)	Tensión %	Tensión (g)	Tensión %
1	0,00	0,000	0,00	0,000	0,000	0,779	100,000	0,410	100,000
3,7	0,57	0,015	0,56	0,036	3,269	0,766	99,331	0,401	97,707
7,5	0,88	0,184	6,35	0,068	6,219	0,734	93,054	0,396	96,589
15	1,18	0,245	8,40	0,084	7,521	0,735	94,267	0,390	93,884
22,5	1,35	0,348	12,17	0,116	10,574	0,753	96,861	0,400	97,119
30	1,48	0,381	13,35	0,102	10,449	0,748	96,542	0,407	99,047
37,5	1,57	0,568	19,89	0,107	11,038	0,750	96,742	0,398	96,743
45	1,65	0,579	20,29	0,106	11,168	0,752	96,445	0,401	96,964
52,5	1,72	0,581	20,37	0,095	10,322	0,745	95,539	0,404	98,002
1	0,00	0,000	0,00	0,000	0,000	0,779	100,000	0,410	100,000

Tabla 9.4. Registros de tensión en gramos (g) y en porcentaje (%) para cada uno de los efectos vasoconstrictor y vasodilatador como respuesta a las diferentes dosis del péptido PI (4177Da)

Péptidos FII10-6		Efecto Vasoconstrictor				Efecto Vasodilatador			
		anillo integro		Anillo sin endotelio		Anillo integro		Anillo sin endotelio	
		Tensión (g)	% Tensión	Tensión (g)	% Tensión	Tensión (g)	Tensión %	Tensión (g)	Tensión %
1	0,00	0,000	0,00	0,000	0,000	0,831	100,000	0,961	100,000
3,7	0,57	0,007	0,92	0,006	0,605	0,807	97,223	0,944	98,187
7,5	0,88	0,019	2,21	0,011	1,298	0,802	96,855	0,928	96,188
11,2	1,05	0,026	3,18	0,017	1,844	0,813	98,244	0,936	97,232
15	1,18	0,022	2,61	0,024	2,687	0,800	97,008	0,928	97,095
18,75	1,27	0,029	3,43	0,028	3,220	0,797	96,342	0,932	96,821
22,5	1,35	0,041	4,78	0,042	5,078	0,810	97,388	0,946	98,091
26,25	1,42	0,040	4,94	0,047	5,603	0,796	96,002	0,943	97,732
30	1,48	0,041	4,90	0,055	6,507	0,799	96,635	0,931	96,036
1	0,00	0,000	0,00	0,000	0,000	0,831	100,000	0,961	100,000

6.3.3 Efecto vasoconstrictor de los péptidos aislados en anillos íntegros.

Con los datos de los registros obtenidos del efecto vasoconstrictor de cada péptido se compararon las medias de tensión en gramos mediante la prueba de Anova de una vía con comparaciones múltiples, encontrándose diferencia significativa entre el péptido PIII y los demás péptidos (Figura 25)

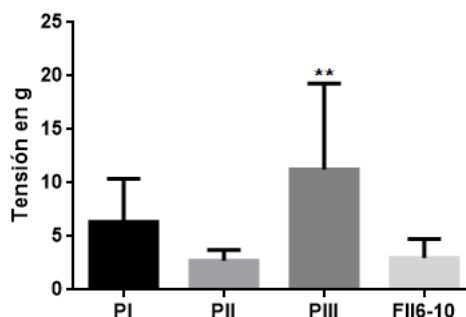


Figura 25. Anova de una vía comparaciones múltiples, se presenta diferencia significativa ($p < 0,05$) entre el péptido PIII y los demás péptidos

Los péptidos PIII y PI, superan el valor de 5 g de tensión, lo cual sugiere un efecto vasoconstrictor sobre el anillo aórtico que es mucho mayor al efecto de los péptidos PII, y FII6-10. No existe diferencia significativa entre PI y PIII, lo cual permite considerar también un posible efecto vasoconstrictor de PI.

Al elaborar las curvas de DR para cada uno de los péptidos, se hallaron valores de EC50 para PI: 61,49; PII: 1,07; PIII: 20,13 y FII6-10: 10,13. Si consideramos que para los péptidos PII y FII6-10 los valores de constricción no superan el 5% de tensión y por lo tanto no tendrían un efecto vasoconstrictor. Podríamos afirmar que

PIII tiene mayor porcentaje de tensión con una dosis menor que PI, por lo tanto, tiene un mayor efecto vasoconstrictor. (Figura 26).

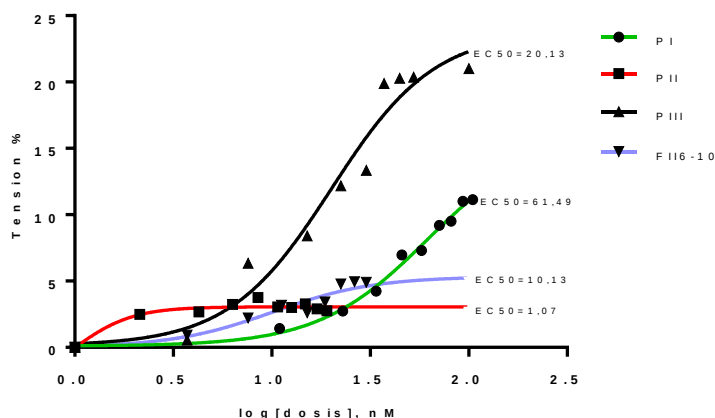


Figura 26. Curvas Dosis respuesta de vasoconstricción con valores de EC50 de los péptidos PI, PII, PIII y FII6-10 aislados del Veneno de *C. margaritatus*, en anillos íntegros de arteria aorta de rata.

Para evaluar si hay un efecto neutralizante de los péptidos en la actividad vasoconstrictora de fenilefrina se hicieron curvas dosis respuesta en porcentajes de contracción del fármaco pre y post incubación del anillo aórtico por 30 minutos con la dosis máxima de cada uno de los péptidos y un test t pareado entre los valores de tensión de vasoconstricción en gramos del fármaco pre y post incubación, resultando una diferencia significativa ($p < 0,05$) para los péptidos FIII y FII6-10 (Figura 27).

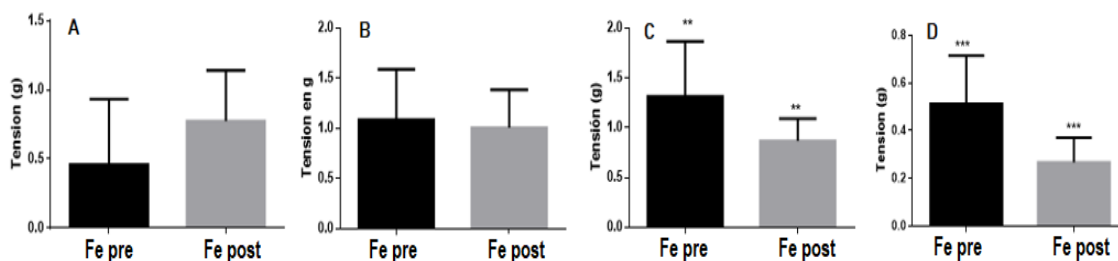


Figura 27. Test t pareado entre la tensión de vasoconstricción pre y post incubación para los péptidos A: PI, B: PII, C: PIII, D: FII6-10 ($p < 0,05$)

El fármaco Fenilefrina (Fe) tiene un efecto agonista α_1 en receptores adrenérgicos, generando un efecto vasoconstrictor. Se hacen dos curvas DR de Fe una previa y otra posterior a la incubación de los anillos con el péptido a evaluar. (Figura 28)

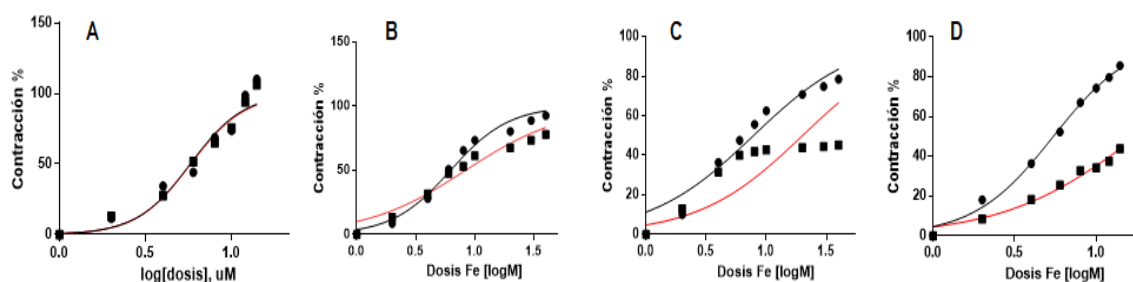


Figura 28. Curvas dosis respuesta de Fenilefrina en anillos aórticos íntegros de rata, pre incubación (línea negra) y post incubación (línea roja) con los péptidos: A: PI, B: PII, C: PIII, y D: FII6-10.

6.3.4 Efecto vasoconstrictor de los péptidos aislados en anillos aórticos libres de endotelio.

Los anillos libres de endotelio se obtuvieron mediante la metodología anteriormente descrita usando los fármacos L Name + Indometacina. Los valores de tensión para el péptido PII no se tuvieron en cuenta en este análisis puesto que resultaron negativos, es decir que los anillos sufren una distensión desde la tensión basal que puede ser consecuencia de un efecto vasodilatador del péptido. Con los registros obtenidos en la tabla 3, se compararon las medias de contracción en gramos de los cinco anillos mediante la prueba de Anova de una vía comparaciones múltiples. Este análisis estadístico dio como resultado una diferencia altamente significativa ($p < 0,05$) entre PIII y FII6-10 y no significativa con PI. (Figura 29).

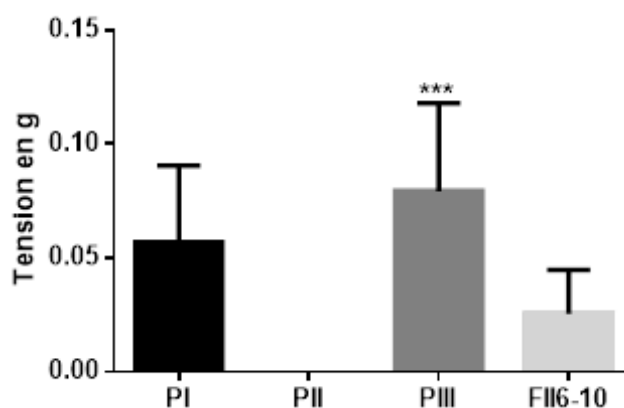


Figura 29. Anova de una vía comparaciones múltiples, se presenta diferencia significativa ($p < 0,05$) entre el péptido PIII y los demás péptidos

Se elaboraron curvas DR para los tres péptidos obteniéndose valores de EC50 para PI: 48,76, PIII: 6,31; FII6-10: 18,21. Este análisis muestra un efecto vasoconstrictor en anillos sin endotelio del péptido PIII mucho mayor que el que produce el péptido PI, puesto que supera el 10% de tensión con un valor de EC50 mucho menor. (Figura 30)

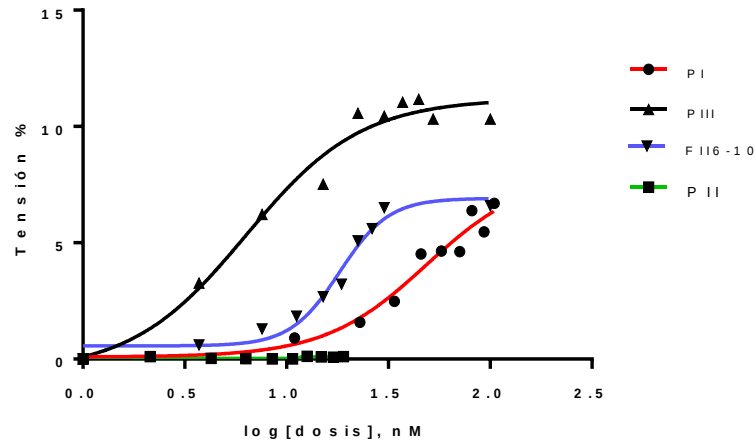


Figura 30. Curva Dosis respuesta de vasoconstricción de los péptidos PI, PII, PIII y FII6-10 en anillos con endotelio bloqueado de arteria aorta de rata.

6.3.5 Pruebas del efecto vasodilatador de los péptidos aislados en anillos íntegros.

Los anillos fueron llevados a contracción máxima agregando en la cámara una concentración de 40 mM de KCL, después de 30 minutos, se agregó el péptido a evaluar en dosis progresivas hasta máxima respuesta, obteniéndose los resultados descritos en la tabla 9.

Como los valores de vasodilatación producidos por todos los péptidos objetos de evaluación no alcanzaron un porcentaje de distensión mayor al 5% de la tensión total, se puede decir que no hay un notable efecto vasodilatador. No obstante, lo anterior, se elaboraron curvas DR que permitieron hallar valores de EC₅₀ tales como: PI: 12,24; PII: 4,77; PIII: 3,84 y FII6-10: 0,0 (Figura 31).

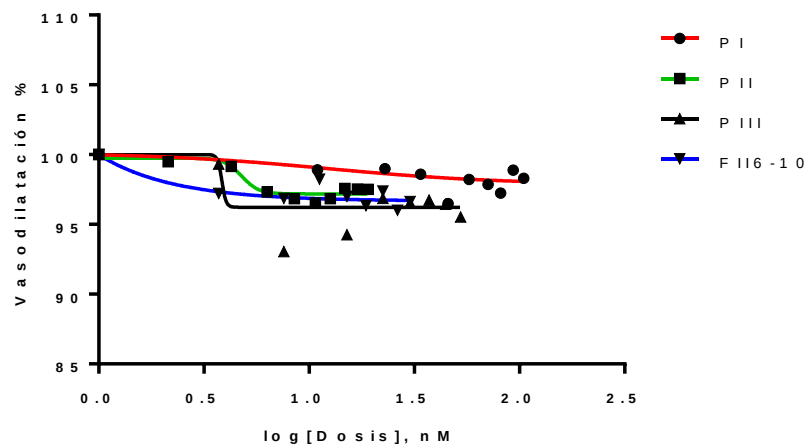


Figura 31. Curvas Dosis Respuesta (DR) a partir del porcentaje de vasodilatación producido en anillos aórticos íntegros por los péptidos PI, PII, PIII y FII6-10.

6.3.6 Pruebas Efecto vasodilatador de los péptidos aislados en anillos sin endotelio.

Siguiendo la metodología descrita en la sección anterior, los anillos aórticos utilizados fueron incubados previamente con los fármacos L-Name + Indometacina antes de someterlos a tensión máxima con KCl 40 mM. Los resultados de vasodilatación no superaron el 5% de relajación total, concluyéndose que los péptidos no tienen un notable efecto vasodilatador.

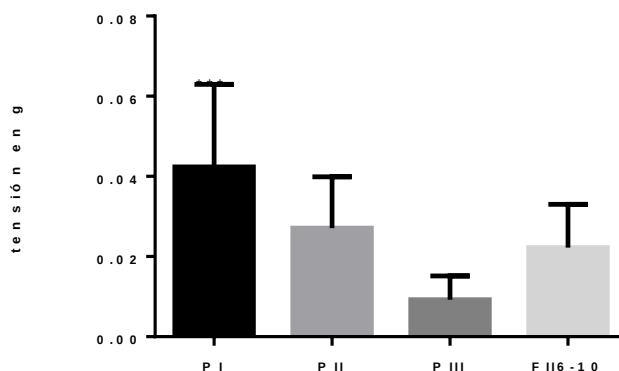


Figura 32. Anova de una vía comparaciones múltiples presenta diferencia significativa ($p < 0,05$) entre el efecto vasodilatador de los péptidos PI y PIII, y no diferencia entre los péptidos PII y FII6-10.

No obstante, las medias de tensión en gramos de los 4 péptidos fueron comparadas mediante Anova de una vía por comparaciones múltiples (figura 32), notándose un mayor efecto vasodilatador del péptido PI con diferencia significativa ($p < 0,05$) respecto a los péptidos PIII y FII6-10. Con PII no hay diferencia significativa, lo que implica que PII tiene también un efecto vasodilatador leve.

Las curvas DR de los péptidos mostraron valores de EC50 para PI: 44,43; PII:8,28; PIII:7,97; FII6-10: 2,46. Siendo PI y PII los que mayor porcentaje de vasodilatación tienen, pero PI tiene una EC50 de 44,43 nM. (Figura 33).

Lo anterior permite afirmar que los péptidos aislados en general no tienen un efecto vasodilatador importante con actividad en musculo liso o en endotelio. Se verifica además que los valores negativos que dieron en las pruebas de vasoconstricción para el péptido PII, no se deben a un efecto vasoconstrictor del péptido.

Adicionalmente se llevó a cabo la evaluación del efecto de los péptidos sobre el fármaco Bradicinina, realizando una curva previa y una posterior a la incubación de los anillos con cada uno de los péptidos según la metodología descrita. Aplicando la prueba de test t pareado entre los valores de vasodilatación en gramos del

fármaco bradicinina pre y post incubación, no se presentó diferencia significativa ($p < 0,05$), para ninguno de los péptidos evaluados.

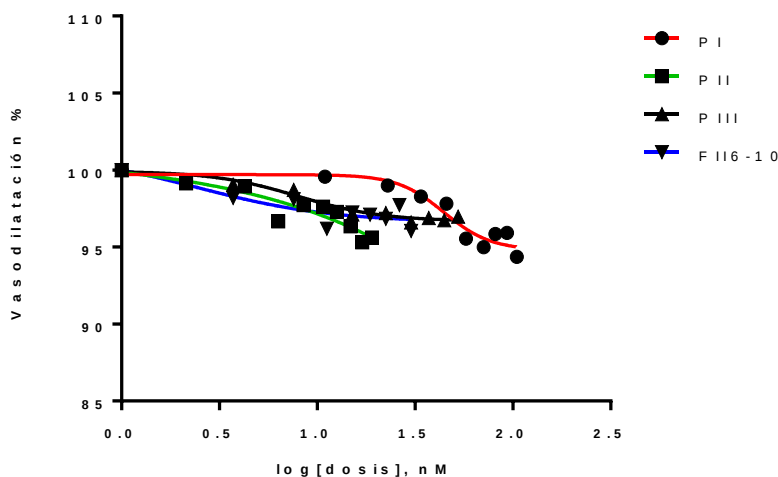


Figura 33. Curvas Dosis Respuesta del efecto vasodilatador en porcentaje de tensión de los péptidos Pi, PII, PII y FII-10, aislados del veneno de *C. margaritatus*

6.4 DISCUSION

El veneno de *C. margaritatus* ha sido considerado un veneno de baja toxicidad (109), puesto que los efectos en cuanto sintomatología clínica lo catalogan como un escorpionismo grado II. El veneno de la especie aquí estudiada corresponde a la población de *C. margaritatus* presente el Valle del Patía (Cauca, Colombia) con una DL_{50} establecida para ratones de 42,83 mg/Kg (42), siendo un veneno de mayor letalidad que el producido por la población de escorpiones de la misma especie presente en el Valle del Cauca con una DL_{50} para ratones de 59,9 mg/kg)(8).

La caracterización química de los componentes del veneno de *C. margaritatus*, permitió establecer que el veneno está compuesto por péptidos de cadena corta comprendidos en el intervalo de masas moleculares de 2,5 a 6 KDa, hallados en la Fracción II obtenida por espectrofotometría HPLC, donde también se encontraron péptidos mayores a 6000 Da. Los venenos escorpiónicos y particularmente los del género *Centruroides*, contienen péptidos de cadena corta con 23 a 42 residuos de amino ácidos y con tres a cuatro puentes disulfuro(13), que tienen actividad bloqueadora en los canales de potasio de membranas excitables, contienen además péptidos de cadena mediana con 61-70 residuos de aminoácidos, que impiden el mecanismo de apertura de los canales de sodio.(14)(13). Las principales dianas moleculares de las neurotoxinas de los escorpiones son cerradas a los canales 9 y 10 de sodio (Na^+) y al canal de potasio dependiente de voltaje (K_v).

En este estudio se logró evidenciar inicialmente que el veneno total de *C. margaritatus* produce un efecto directo sobre la actividad vasomotora de anillos

aislados de aorta de rata causando vasoconstricción sobre el tono vascular en anillos aórticos libres de endotelio con bloqueo de los fármacos L-Name, inhibidor de la actividad del óxido nítrico sintasa, e Indometacina, bloqueador de la vía de la ciclooxigenasa de los prostanoïdes, (prostaglandinas y tromboxano). Estudios anteriores han mencionado el efecto del veneno escorpiónico en la actividad vasomotora, causando alteraciones de la presión arterial y de la actividad hemodinámica (110).

De los cuatro péptidos aislados para el estudio, el péptido PI, de masa molecular 4177 Da, mostró un efecto vasoconstrictor tanto en anillos aórticos íntegros como sin endotelio y no alteró el efecto de la fenilefrina, un agente simpático mimético agonista α -1 selectivo que actúa sobre los receptores alfa adrenérgicos con una mínima acción beta (111) lo cual significa que la actividad del péptido se relaciona directamente con las células del musculo liso vascular (CMLV) y no con la actividad endotelial.

De esta especie se han realizado estudios de proteómica que han permitido caracterizar un péptido de 39 residuos de aminoácido, estabilizado por 3 puentes disulfuro con un peso molecular de 4185 Da, denominado margatoxina (MgTx)(39). Este péptido es ampliamente utilizado en el campo de la investigación de canales iónicos pues tiene una alta afinidad como inhibidor selectivo de los canales Kv1.1, Kv1.2 y Kv1.3, en el rango nano molar ($K_d = 4.2$ nM) (40). El péptido PI de este estudio, con masa molecular de 4178 Da, se asemeja en cuanto su masa molecular a la MgTx, lo cual implica que de igual manera podría tener efectos en los canales iónicos mencionados, sin embargo, es necesario hacer la secuenciación del péptido para verificar que se trata de la misma toxina.

El máximo efecto vasoconstrictor de los péptidos evaluados lo alcanzó PIII, un péptido de Masa molecular de 3980 Da, con una curva DR que permitió alcanzar más del 20 % de la tensión total producida por KCl (40mM) y una EC50 de 20,13 nM en anillos íntegros y una tensión que supera el 10 % de la tensión total, con una EC50 de 6,31 nM en anillos libres de endotelio. Este péptido causó interferencia con la actividad de la fenilefrina, indicando que su efecto además de estar relacionado con las CMLV, está relacionado con la actividad endotelial. La actividad vasomotora de arterias y capilares está determinada por la acción directa del endotelio y del sistema nervioso autónomo que liberan catecolaminas, (estimulan receptores específicos adrenérgicos Alfa 1, Alfa 2, Beta 1, etc.), endotelina, óxido nítrico, prostaciclina, acetilcolina (50).

El péptido PII, de masa molecular 4798 Da, presentó en la prueba de vasoconstricción una serie de registros inversos (negativos), con disminución de la tensión basal del anillo equivalente a 2g. Esto podría predecir un efecto vasodilatador del péptido en anillos íntegros, sin embargo, en la prueba de vasoconstricción el péptido no mostro un efecto vasodilatador superior al 5%. Por debajo de este porcentaje se observó una leve actividad vasodilatadora menor que la presentada por el péptido PI. Este péptido fue caracterizado en estudio adicional a esta investigación como un péptido de 42 residuos de aminoácidos con cuatro

puentes disulfuro, al cual se le dio el nombre trivial de ERG toxina 1 de *C. margaritatus* (CmERGTX1). Al hacer la comparación (Blast) con otras toxinas en la base de datos UniProt, este péptido corresponde a la subfamilia de las γ -KTx, las cuales son Ergtoxinas (ErgTx) y se describen como ligandos de los canales hERG(33). Este tipo de péptidos se han encontrado en los escorpiones de los géneros *Centruroides*, *Mesobuthus* y *Buthus* (112). El primer péptido aislado fue ErgTx1 del escorpión *C. noxius* (32). Algunas ErgTxs han sido obtenidas por técnicas de secuenciación directa de péptidos o deducidas del gen clonado usando ADNc de la glándula venenosa de diferentes especies, esto implica la construcción y análisis de bibliotecas de ADNc y de ARNm de las glándulas de veneno animal (31)(15). Esta toxina CmErg1 tiene la propiedad de bloquear al 100% el canal hKv11.1 de manera reversible, con un valor $IC(50) = 3.4 \pm 0.2$ nM, a diferencias de las otras γ -KTx que no bloquean totalmente el canal. Estudios recientes han considerado que el canal KV11.1 tiene un papel importante en algunos tipos de arritmias, fibrilación auricular y síndrome de QT largo (113). En la mayoría de los casos, la disfunción de un canal particular (canalopatía) resulta de mutaciones en el gen correspondiente(114), por lo tanto, los moduladores selectivos de estos canales pueden ser agentes terapéuticos prometedores en enfermedades cardiovasculares (15).

Los péptidos de FII6-10, fueron evaluados en conjunto dado que se encuentran en cantidades muy mínimas en el veneno total, no permitiendo tener la cantidad de material (mg) suficiente para evaluar cada péptido por separado. Un estudio particularizado de cada péptido implica hacer una captura de un mayor número de especímenes de *C. margaritatus*, trayendo como consecuencia la afectación de la población existente. Los péptidos de la fracción FII6-10, no mostraron un efecto significativo vasoconstrictor ni vasodilatador de anillos aórticos aislados en comparación a los péptidos PI y PIII, sin embargo, causaron un efecto significativo en la actividad de la fenilefrina en anillos incubados con la fracción, lo cual significa que los péptidos actúan sobre receptores α adrenérgicos (111).

En este estudio se descartaron los péptidos de masas moleculares mayores a 6000 Da, puesto que se conoce que en los venenos de los escorpiones de la familia Buthidae, existen neurotoxinas que actúan como ligandos en canales de sodio dependientes de voltaje expresando una sintomatología particular observada en víctimas de picadura y que se atribuyen a una marcada hiperactividad autonómica (taquicardia, hipertensión, cardíaca, arritmias, midriasis, salivación excesiva y lagrimeo, bradicardia, hipotensión, etc.) (115)(106). Los casos letales por escorpionismo de esta familia, son consecuencia de los efectos cardiovasculares atribuidos a la liberación masiva de catecolaminas de las glándulas suprarrenales y terminales nerviosas noradrenérgicas, junto con complicaciones asociadas a un edema pulmonar y falla respiratoria en mamíferos (21)(107). Nuestro trabajo se centró básicamente sobre los efectos de los péptidos de masas 2,5 a 6 KDa en la actividad vasomotora.

7. CONCLUSIONES

Se reporta el aislamiento, determinación de la estructura primaria y la evaluación electrofisiológica de dos nuevas toxinas para canales Kv:

Una de ellas denominada CmERG1 que se determinó como una γ -KTx, causante de bloqueo total (100%) del canal hERG1 lo cual la diferencia de las otras ERGTxs aisladas del veneno de escorpiones del género *Centruroides*. Esta toxina carece de actividad vasomotora en anillos aórticos aislados

La otra toxina se determinó como una α -KTx, con actividad bloqueadora del canal hERG1 en un 40%, con alta identidad con una toxina putativa hallada por transcriptómica en la glándula del veneno de *C. henzi*. Esta toxina tiene gran actividad vasoconstrictora en anillos aórticos aislados con y sin endotelio, no tiene efecto vasodilatador y presenta un bloqueo parcial a la actividad de la Fenilefrina un fármaco α adrenérgico altamente vasoconstrictor.

Se aisló además un péptido que por su Masa molecular y secuencia se asume como la toxina margatoxina (MgTx), ya estudiada previamente por otros investigadores con un efecto bloqueador de los canales iónicos Kv1.1, Kv 1.2 y Kv 1.3. canales que se relacionan directamente con los procesos fisiológicos vasomotores de CMLV. Y que en este estudio presentó un efecto vasoconstrictor en anillos aórticos aislados libres de endotelio, sin efecto vasodilatador.

Los péptidos de la fracción FII6-10, no presentaron actividad vasomotora definida, sin embargo, el veneno completo del escorpión *C. Margaritatus*, presentó un efecto vasoconstrictor cuya acción se define directamente sobre las CMLV, dado que el efecto se notó únicamente en anillos aórticos aislados libre de endotelio. El efecto vasopresor se dio con una concentración de 100 μ g del veneno.

La FII del veneno de *C. margaritatus* que contiene péptidos con actividad en canales de Sodio y de Potasio, presentó en dosis de 1mg/Kg, una incidencia altamente significativa en la hemodinámica sistémica de ratas experimentales, alterando la PAM, el VVE, la FC, La PVE, la PVC y el dP/dtmáx. y un notable efecto cardiotóxico que se expresa en alteraciones del registro electrocardiográfico como fibrilación auricular, elevación del segmento ST y onda T puntiaguda. Histológicamente el veneno causó en las fibras cardíacas una gran densidad de edema y hemorragia interfibrilar.

El veneno de *C. margaritatus*, contiene péptidos que actúan como ligandos en los canales de sodio y de potasio, causando alteraciones cardiovasculares, hecho que puede causar escorpionismo severo, por lo tanto, aunque la dosis letal del veneno de esta especie es alta, su nivel de toxicidad debe ser revaluado por su potencialidad en la alteración fisiológica cardiovascular. Los péptidos del veneno aquí estudiados se convierten en herramienta molecular indispensable para el

estudio de la estructura y función de los canales de K^+ y su aplicabilidad farmacológica para tratar patologías relacionadas con canalopatías hKV11.1.

8. BIBLIOGRAFÍA

1. Ward MJ, Ellsworth SA, Nystrom GS. A global accounting of medically significant scorpions: Epidemiology, major toxins, and comparative resources in harmless counterparts. *Toxicon* [Internet]. 2018;151(June):137–55. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2018.07.007>
2. Flórez Daza E. Escorpiones de la Familia Buthidae (Chelicerata: Scorpiones) de Colombia. *Biota Colomb*. 2001;2 (1)(1):25–30.
3. Bergeron ZL, Bingham JP. Scorpion toxins specific for potassium (K⁺) channels: A historical overview of peptide bioengineering. Vol. 4, *Toxins*. 2012. 1082–1119 p.
4. Rokyta DR, Ward MJ. Venom-gland transcriptomics and venom proteomics of the black-back scorpion (*Hadrurus spadix*) reveal detectability challenges and an unexplored realm of animal toxin diversity. *Toxicon*. 2017;128.
5. Guerrero-Vargas. J. A., Rodríguez-Buitrago. J. R., Ayerbe-Gonzales. S., Florez-Daza. Eduardo, Belltrán-Vidal JT. Scorpionism and Dangerous Species of Colombia. In: P. Gopalakrishnakone, L. Possani EFS, editor. *Hand book of toxinology*. 1st ed. New York; 2015. p. 245–72.
6. De Armas L, Luna D, Flórez E. Composición del género *Centruroides* marx, 1890 (Scorpiones Buthidae) en Colombia, con la descripción de una nueva especie. *Boletín la Soc Entomológica Aragon*. 2012;50:105–14.
7. Teruel R. Primer registro de *Centruroides margaritatus* (Gervais, 1841) para Cuba (Scorpiones: Buthidae). *Rev ibérica Aracnol* [Internet]. 2001;5(31-VII–200):87–9. Available from: <http://entomologia.rediris.es/gia>
8. Marinkelle, C.J., Sthanke HL. Toxicological And Clinical Studies On *Centruroides Margaritatus* (Gervais), A Common Scorpion In Western Colombia. *J Med Entomol*. 1965;2(2):197–9.
9. Ramírez MS, Ynestroza W, Abello MI. Emponzoñamiento escorpiónico. Manejo de las manifestaciones cardiovasculares. Hospital Universitario de Pediatría “Dr. Agustín Zubillaga” de Barquisimeto, estado Lara, Venezuela. *Av cardiol*. 2009;29(1):68–75.
10. Khattabia, A., Soulaymani-Bencheikha, R., & Achourb S. Classification of clinical consequences of scorpion stings. *R Soc Trop Med Hyg*. 2011;105(7):364–9.
11. Gwee MCE, Nirthan S, Khoo H, Gopalakrishnakone P, Kini RM, Cheah L. AUTONOMIC EFFECTS OF SOME SCORPION VENOMS AND TOXINS. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2002;(April):795–801.
12. Olamendi-Portugal T, Bartok A, Zamudio-Zuñiga F, Balajthy A, Becerril B, Panyi G, et al. Isolation, chemical and functional characterization of several new K⁺-channel blocking peptides from the venom of the scorpion *Centruroides tecomanus*. *Toxicon* [Internet]. 2016 Jun 1 [cited 2019 Jan 14];115:1–12. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0041010116300344?via%3Dihub>
13. Rodríguez De La Vega RC, Possani LD. Overview of scorpion toxins specific

- for Na⁺ channels and related peptides: Biodiversity, structure-function relationships and evolution. *Toxicon*. 2005;46(8):831–44.
14. Barona J, Batista CVF, Zamudio FZ, Gomez-Lagunas F, Wanke E, Otero R, et al. Proteomic analysis of the venom and characterization of toxins specific for Na⁺- and K⁺-channels from the Colombian scorpion *Tityus pachyurus*. *Biochim Biophys Acta - Proteins Proteomics*. 2006;1764(1):76–84.
 15. Kuzmenkov AI, Grishin E V., Vassilevski AA. Diversity of Potassium Channel Ligands: Focus on Scorpion Toxins. *Biochem*. 2015;80(13):1764–99.
 16. Khattabi A, Soulaymani-Bencheikh R, Achour S, Salmi L-R. Classification of clinical consequences of scorpion stings: consensus development. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2011 Jul;105(7):364–9.
 17. Otero R, Navío E, Céspedes F a, Núñez MJ, Lozano L, Moscoso ER, et al. Scorpion envenoming in two regions of Colombia: clinical, epidemiological and therapeutic aspects. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2004 Dec;98(12):742–50.
 18. Chippaux J-P, Goyffon M. Epidemiology of scorpionism: a global appraisal. *Acta Trop*. 2008 Aug;107(2):71–9.
 19. Ayerbe-González S, Rodríguez-Buitrago J. Guías para el manejo de Urgencias Toxicológicas. Bogotá; 2008. p. 294.
 20. Costal-Oliveira F, Guerra-Duarte C, Oliveira MS, Castro KLP de, Lopes-de-Sousa L, Lara A, et al. Cardiorespiratory alterations in rodents experimentally envenomed with *Hadruroides lunatus* scorpion venom. *J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis*. 2016;23(1).
 21. Cordeiro FF, Sakate M, Fernandes V, Cuyumjian PR. Clinical and cardiovascular alterations produced by scorpion envenomation in dogs. *J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis*. 2006;12(1):19–43.
 22. Pinto MCL, Borboleta LR, Melo MB, Labarrère CR, Melo MM. *Tityus fasciolatus* envenomation induced cardio-respiratory alterations in rats. *Toxicon*. 2010 Jun;55(6):1132–7.
 23. Gopalakrishnakone P, Possani LD, Schwartz EF, Rodríguez De La Vega RC. Molecular Description of Scorpion Toxin Interaction with Voltage-Gated Sodium Channels. In: *Scorpion Venoms*. 2015. p. 1–575.
 24. Bartok A, Panyi G, Varga Z. Potassium Channel Blocking Peptide Toxins from Scorpion Venom. In: Gopalakrishnakone P, Possani LD, F. Schwartz E, de la Vega RC, editors. *Scorpion Venoms* [Internet]. Dordrecht: Springer Netherlands; 2015. p. 493–527. Available from: https://doi.org/10.1007/978-94-007-6404-0_30
 25. Gopalakrishnakone P, Possani LD, Schwartz EF, Rodríguez De La Vega RC. Scorpion venoms. *Scorpion Venoms*. 2015.
 26. Xiao L, Gurrola GB, Zhang J, Valdivia CR, SanMartin M, Zamudio FZ, et al. Structure–function relationships of peptides forming the calxin family of ryanodine receptor ligands. *J Gen Physiol*. 2016;
 27. Zhao Y, Chen Z, Cao Z, Li W, Wu Y. Diverse structural features of potassium channels characterized by scorpion toxins as molecular probes. *Molecules*. 2019;24(11):1–16.
 28. Chen Z, Luo F, Feng J, Yang W, Zeng D, Zhao R, et al. Genomic and Structural Characterization of Kunitz-Type Peptide LmKTT-1a Highlights

- Diversity and Evolution of Scorpion Potassium Channel Toxins. PLoS One. 2013;8(4).
29. Stephanie MOUHAT, Bisma JOUIROU, Amor MOSBA MDW† and J-MS. Diversity of folds in animal toxins acting on ion channels. 2004;378:717–26. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1224033/pdf/14674883.pdf>
 30. Kuzmenkov AI, Krylov NA, Chugunov AO, Grishin E V., Vassilevski AA. Kalium: A database of potassium channel toxins from scorpion venom. Database. 2016;2016.
 31. Quintero-Hernández V, Ramírez-Carretero S, Romero-Gutiérrez MT, Valdez-Velázquez LL, Becerril B, Possani LD, et al. Transcriptome analysis of scorpion species belonging to the Vaejovis genus. PLoS One. 2015;10(2).
 32. Gurrola GB, Rosati B, Rocchetti M, Pimienta G, Zaza A, Arcangeli A, et al. A toxin to nervous, cardiac, and endocrine ERG K⁺ channels isolated from *Centruroides noxius* scorpion venom. FASEB J. 1999;13(8):953–62.
 33. Corona M, Gurrola GB, Merino E, Cassulini RR, Valdez-Cruz N a, García B, et al. A large number of novel Ergtoxin-like genes and ERG K⁺-channels blocking peptides from scorpions of the genus *Centruroides*. FEBS Lett. 2002 Dec;532(1–2):121–6.
 34. Korolkova Y V., Kozlov SA, Lipkin A V., Pluzhnikov KA, Hadley JK, Filippov AK, et al. An ERG Channel Inhibitor from the Scorpion *Buthus eupeus*. J Biol Chem. 2001;276(13):9868–76.
 35. Hill AP, Sunde M, Campbell TJ, Vandenberg JI. Mechanism of block of the hERG K⁺ channel by the scorpion toxin CnErg1. Biophys J. 2007;92(11):3915–29.
 36. Tseng GN, Sonawane KD, Korolkova Y V., Zhang M, Liu J, Grishin E V., et al. Probing the outer mouth structure of the hERG channel with peptide toxin footprinting and molecular modeling. Biophys J. 2007;92(10):3524–40.
 37. Pardo-López L, García-Valdés J, Gurrola GB, Robertson GA, Possani LD. Mapping the receptor site for ergtoxin, a specific blocker of ERG channels. FEBS Lett. 2002;510(1–2):45–9.
 38. Pardo-Lopez L, Zhang M, Liu J, Jiang M, Possani LD, Tseng GN. Mapping the binding site of a human ether-a-go-go-related gene-specific peptide toxin (ErgTx) to the channel's outer vestibule. J Biol Chem. 2002;277(19):16403–11.
 39. García-Calvo M, Leonard RJ, Novick J, Stevens SP, Schmalhofer W, Kaczorowski GJ, et al. Purification, characterization, and biosynthesis of margatoxin, a component of *Centruroides margaritatus* venom that selectively inhibits voltage-dependent potassium channels. J Biol Chem. 1993 Sep;268(25):18866–74.
 40. Bartok A, Toth A, Somodi S, Szanto TG, Hajdu P, Panyi G, et al. Margatoxin is a non-selective inhibitor of human Kv1.3 K⁺ channels. Toxicon [Internet]. 2014;87:6–16. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.toxicon.2014.05.002>
 41. Guerrero-Vargas JA. Análise Proteômica Parcial da Peçonha do Escorpião Colombiano *Centruroides margaritatus*. Brasília; 2008.
 42. Guerrero-Vargas JA, Ayerbe S, Rada-Mendoza M, Vélez P, Beltran J DG. Preliminary toxinological characterization of the venom of the scorpion

- Centruroides margaritatus (Buthidae, Gervais, 1841) of the valle of the Patía, Colombia. *Venom Anim Toxins incl Trop Dis*. 2007;13(1):228.
43. Salazar MH, Arenas I, Corrales-García LL, Miranda R, Vélez S, Sánchez J, et al. Venoms of Centruroides and Tityus species from Panama and their main toxic fractions. *Toxicon*. 2018;141:79–87.
 44. Beltrán J, Guerrero J, Nascimento N, Velasco A, Bezerra P, Farias L. Respuesta hemodinámica de Rattus norvegicus a tres fracciones cromatográficas del veneno de Centruroides margaritatus (Gervais, 1841) (Scorpiones: Buthidae). *Iatreia*. 2018;31(1):S-15.
 45. Agamenon Despopoulus SS. *Color Atlas of physiology*. cuarta. New york; 2003. 436 p.
 46. Mohrman DE, Heller LJ. *Fisiología cardiovascular*. Sexta. Hill MG, editor. Mexico D.F.; 2007. 255 p.
 47. Boron, Emile; Boulpaep W. *Medical Physiology*. 2nd ed. Elsevier, editor. 2012.
 48. Sabatier C, Monge I, Maynar J, Ochagavia A. Valoración de la precarga y la respuesta cardiovascular al aporte de volumen. *Med Intensiva [Internet]*. 2012;36(1):45–55. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.medin.2011.04.005>
 49. Alfonso J, Báez M. Regulación del Sistema Cardiovascular por el Sistema Nervioso Autónomo. *Librosabiertos [Internet]*. 2008;36. Available from: http://mail.fbio.uh.cu/ginvest/mesna/vfc_docs/RegulacionAutonomicaCardiovascular.pdf
 50. Álvarez Ramírez I, Luis Eduardo CM. Fisiología cardiovascular aplicada en caninos con insuficiencia cardiaca. *Rev Med Vet (Bogota) [Internet]*. 2011;21:115–32. Available from: <http://www.scielo.org.co/pdf/rmv/n21/n21a09.pdf>
 51. Flores Chavez, P. Infante V, Oscar. Sanchez T, Gustavo. Martinez M, Raul. Rodriguez R G. A non-invasive methods to record vital signs in rats. *Vet Méx*. 2002;33:179–87.
 52. Domenech RJ, Parra VM. Contractilidad ventricular. *Fisiología y proyección clínica. Rev Med Chil*. 2016;144(6):771–9.
 53. Migliore R, Adaniya M, Miramont G, Guerrero F, Tamagusuku H. Estimación no invasiva de la dP/dt del ventrículo izquierdo: ¿La medición se efectúa durante la contracción isovolumétrica? *Arch Inst Cardiol Méx*. 2000;70(6):580–8.
 54. Guo X, Wang D, Liu Z. Electrocardiographic changes after injury in a rat model of combined crush injury. *Am J Emerg Med [Internet]*. 2013;31(12):1661–5. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ajem.2013.08.054>
 55. Guerra F. Arritmias cardíacas. *Rev las Ciencias la Salud Cienfuegos [Internet]*. 2012;11:1–14. Available from: http://www.sld.cu/galerias/pdf/sitios/urgencia/8_arritmias.pdf
 56. Ashley, Euan A.; Niebauer J. *Cardiology Explained*. London: Remedica; 2004.
 57. Yeo TJ, Teo SG, Soo WM, Poh KK. Variations of atrioventricular block. *Singapore Med J*. 2011;52(5):330–4.

58. Peerbhai S, Masha L, DaSilva-DeAbreu A, Dhoble A. Hyperkalemia masked by pseudo-stemi infarct pattern and cardiac arrest. *Int J Emerg Med* [Internet]. 2017;10(1). Available from: <http://dx.doi.org/10.1186/s12245-017-0132-0>
59. Rosero Salazar DH, Ortiz Salazar MA, Salazar Monsalve L. Miocardiocitos conducentes ventriculares. *Univ y Salud*. 2015;17(2):262.
60. Perna E, Macin S, Bono J. Los marcadores bioquímicos en la evaluación de pacientes en la Unidad de Dolor Torácico. *Rev la Fed Argentina Cardiol*. 2005;34(1):60–70.
61. Xu RY, Zhu XF, Yang Y, Ye P. High-sensitive cardiac troponin T. *J Geriatr Cardiol*. 2013;10(1):102–9.
62. Sharma S, Jackson PG, Makan J. Cardiac troponins. Benefits and pitfalls for diagnosing myocardial infarction. *J Clin Pathol*. 2004;57:1025–6.
63. Kaczmarek LK, Aldrich RW, Chandy KG, Grissmer S, Wei AD, Wulff H. International union of basic and clinical pharmacology. C. Nomenclature and properties of calcium-activated and sodium-activated potassium channels. *Pharmacol Rev*. 2017;69(1):1–11.
64. Pongs O. Regulation of excitability by potassium channels. *Results Probl Cell Differ*. 2007;44(June):145–61.
65. Martin-Eauclaire MF, Pimenta AMC, Bougis PE, De Lima ME. Potassium channel blockers from the venom of the Brazilian scorpion *Tityus serrulatus* (Lutz and Mello, 1922). *Toxicon* [Internet]. 2016;119:253–65. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.toxicon.2016.06.016>
66. Armstrong CM, Hille B. Voltage-Gated Ion Channels Review and Electrical Excitability Early Biophysics and Voltage Clamp Revealed Voltage-Gated Membrane Permeabilities The period from 1939 to 1952 was a heroic time in the. *Neuron*. 1998;20:371–80.
67. Senyon Choe. Potassium channel structures. *Nat Rev Neurosci*. 2002;03(01):115–21.
68. Rueda A, de Alba-Aguayo DR, Valdivia HH. Receptor de rianodina, fuga de calcio y arritmias. *Arch Cardiol México*. 2014;84(3):191–201.
69. Olamendi-Portugal T, Bartok A, Zamudio-Zuñiga F, Balajthy A, Becerril B, Panyi G, et al. Isolation, chemical and functional characterization of several new K⁺-channel blocking peptides from the venom of the scorpion *Centruroides tecomanus*. *Toxicon*. 2016;115:1–12.
70. Ricardo C.Rodríguez de la Vega, Elisabeth F.Schwartz LDP. Mining on scorpion venom biodiversity. *Toxicon*. 2010;56(7):1155–61.
71. Tytgat J1, Chandy KG, Garcia ML, Gutman GA, Martin-Eauclaire MF, van der Walt JJ PL. A unified nomenclature for short-chain peptides isolated from scorpion venoms: alpha-KTx molecular subfamilies. *Trends Pharmacol Sci*. 1999;11:444–7.
72. Dauplais M, Lecoq A, Song J, Cotton J, Jamin N, Gilquin B, et al. On the Convergent Evolution of Animal Toxins. *J Biol Chem*. 1997;272(7):4302–9.
73. Almeida DD, Torres TM, Barbosa EG, Lima JPMS, De Freitas Fernandes-Pedrosa M. Molecular approaches for structural characterization of a new potassium channel blocker from *Tityus stigmurus* venom: CDNA cloning, homology modeling, dynamic simulations and docking. *Biochem Biophys*

- Res Commun [Internet]. 2013;430(1):113–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2012.11.044>
74. Diego-García E, Abdel-Mottaleb Y, Schwartz EF, de la Vega RC, Tytgat J PL. Cytolytic and K⁺ channel blocking activities of beta-KTx and scorpionlike peptides purified from scorpion venoms. *Cell Mol Life Sci*. 2008;65(1):187–200.
 75. Zhu S TJ. The scorpine family of defensins: gene structure, alternative polyadenylation and fold recognition. *Cell Mol Life Sci*. 2004;61(14):1751–63.
 76. Zhu S1, Gao B, Aumelas A, del Carmen Rodríguez M, Lanz-Mendoza H, Peigneur S, Diego-Garcia E, Martin-Eauclaire MF, Tytgat J PL. MeuTXKbeta1, a scorpion venom-derived two-domain potassium channel toxin-like peptide with cytolytic activity. *Biochim Biophys Acta*. 2010;1804(4):872–83.
 77. Winter KL, Fernando R, Ramasamy S, Seymour JE, Isbister GK, Hodgson WC. The in vitro vascular effects of two chirodroid (Chironex fleckeri and Chiropsella bronzie) venoms. *Toxicol Lett*. 2007;168(1):13–20.
 78. Abudupataer M, Zou W, Zhang W, Ding S, Zhou Z, Chen J, et al. Histamine deficiency delays ischaemic skeletal muscle regeneration via inducing aberrant inflammatory responses and repressing myoblast proliferation. 2019;(June):1–18.
 79. Ancion A, Tridetti J, Nguyen Trung M-L, Oury C, Lancellotti P. A Review of the Role of Bradykinin and Nitric Oxide in the Cardioprotective Action of Angiotensin-Converting Enzyme Inhibitors: Focus on Perindopril. *Cardiol Ther* [Internet]. 2019; Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31578675>
 80. Gorzalczany SB, Taira CA. Los agentes adrenergicos en la hipertension experimental por coartacion de la aorta abdominal en ratas. (1113).
 81. Gimeno A, Modesto V. Lbuprofeno frente a indometacina para el tratamiento de la persistencia del conducto arterioso. *An Pediatr Contin*. 2007;5(2):100–4.
 82. Evangelista JSAM, Evangelista JJF, Evangelista IL, Nojosa DMB, Nascimento NRF, Souza MHLP, et al. Hypotensive effects of the Crotalus durissus cascavella venom: involvement of NO. *Nat Prod Commun*. 2011 Jun;6(6):871–4.
 83. Brenes JRB, Rica UDC. Aplicación del método de Termodilución en la medida del gasto Cardíaco en Ratos con y sin anestesia. 1978;21(3):253–7.
 84. Escudero EM, Pinilla OA, Carranza VB. Análisis ecocardiográfico de la geometría ventricular izquierda en ratas espontáneamente hipertensas. *Med (Buenos Aires)*. 2009;69(3):335–40.
 85. Pál Pacher, Takahiro Nagayama², Partha Mukhopadhyay¹, Sándor Bátkai¹ and DA. Measurement of cardiac function using pressure–volume conductance catheter technique in mice and rats. *Nat Protoc*. 2008;3(9):1422–34.
 86. Chaple La Hoz, Manuel; Barber Gutiérrez, Ernesto; Román Aldama, Wilfrido; Castillo Herrera, José; Fox Pascual, María Ofelia; Barber Fox MO. Efectos hemodinámicos de la supresión del propranolol en ratas. *Rev Cuba Investig Biomédicas* [Internet]. 1996;15. Available from:

- http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0864-03001996000200003&lng=es.
87. Sauza-Sosa JC, Cuéllar-Álvarez J, Villegas-Herrera KM, Sierra-Galán LM. Aspectos clínicos actuales del monitoreo ambulatorio de presión arterial. *Arch Cardiol México*. 2016;86(3):255–9.
 88. Karnad DR. Haemodynamic patterns in patients with scorpion envenomation. *Heart*. 1998;79(5):485–9.
 89. Koliass TJ, Aaronson KD, Armstrong WF. Doppler-derived dP/dt and -dP/dt predict survival in congestive heart failure. *J Am Coll Cardiol*. 2000;36(5):1594–9.
 90. Noura S, Elatrous S, Besbes L, Boukef R, Devaux C, Aubrey N, et al. Neurohormonal activation in severe scorpion envenomation: Correlation with hemodynamics and circulating toxin. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2005;208(2):111–6.
 91. Krishna Murthy KR. The scorpion envenoming syndrome: a different perspective. The physiological basis of the role of insulin in scorpion envenoming. *J Venom Anim Toxins*. 2005;6(1):04–51.
 92. Jain MK, Indurkar M, Kastwar V, Malviya S. Myocarditis and multiple cerebral and cerebellar infarction following scorpion sting. *J Assoc Physicians India*. 2006;54(JUNE):491–2.
 93. Actualizados T. Hipertensión arterial . Aspectos fisiopatológicos. *Rev Cubana Med*. 1996;35(3):176–82.
 94. Dickstein K, Cohen-Solal A, Filippatos G, McMurray JJV, Ponikowski P, Poole-Wilson PA, et al. Guía de práctica clínica de la sociedad europea de cardiología (ESC) para el diagnóstico y tratamiento de la insuficiencia cardíaca aguda y crónica (2008). *Rev Esp Cardiol*. 2008;61(12):1–70.
 95. Poveda, Jonathan; Soriano, Tatiana; Garc, Mario J; Rodr L. Determinación no invasiva de la función diastólica ventricular mediante ecocardiografía Doppler de dos dimensiones (Parte II). *Rev Costarric Cardiol [Internet]*. 2003;5(Parte II):18–25. Available from: http://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1409-41422003000200003&lng=en&nrm=iso
 96. Águila-Marín J. Hipertrofia ventricular izquierda. *Med e Investig*. 2013;1(1):25–30.
 97. Montero GU, Campos AU. El calcio en los miocitos cardíacos y su papel en las miocardiopatías. *Rev Costarric Cardiol*. 2006;8(1):19–25.
 98. Castro-ferreira R, Fontes-carvalho R, Falcão-pires I, Leite-moreira AF. Papel de la Titina en la Modulación de la Función Cardíaca y sus Implicaciones Fisiopatológicas. *Soc Bras Cardiol [Internet]*. 2009;96(4):332–9. Available from: http://www.scielo.br/pdf/abc/v96n4/es_aop01311.pdf
 99. Antonio J, Ugarte C, Huanaco EP, Lilia M, Rodríguez C. Concentración de electrolitos en el suero de niños intoxicados por picadura de alacrán. *Rev Mex Pediatría*. 1999;66(3):97–101.
 100. Guerrero-Vargas JA, Mourão CBF, Quintero-Hernández V, Possani LD, Schwartz EF. Identification and phylogenetic analysis of Tityus pachyurus and Tityus obscurus novel putative Na⁺-channel scorpion toxins. *PLoS One*. 2012 Jan;7(2):e30478.

101. Possani LD, Becerril B, Delepierre M, Tytgat J. Scorpion toxins specific for Na. 1999;300(1999):1–14. Available from: [papers2://publication/uuid/B3A4611F-EFE5-475E-99E1-82C48985CCF9](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11111111/)
102. Quintero-Hernández V, Jiménez-Vargas JM, Gurrola GB, Valdivia HHF. Scorpion venom components that affect ion-channels function. *Toxicon*. 2013;76(6):328–42.
103. Bernadó C, González E, Vivas ME, Trilla M, Andrés E, Casal F. TROPONINAS VS CK, CK-MB EN EL DIAGNÓSTICO DEL SÍNDROME CORONARIO AGUDO. REPERCUSIONES PARA ENFERMERÍA. XXII Congr Nac Enfermería en Cardiol. 2001;1–7.
104. García De La Villa B, Díaz-Buschmann I, Jurado JA, García R, Javier Parra F, Medina J, et al. Valor de la troponina I cardíaca como prueba diagnóstica en el estudio del dolor torácico. *Rev Esp Cardiol*. 1998;51(2):122–8.
105. Yi H, Cao Z, Yin S, Dai C, Wu Y LW. Interaction simulation of hERG K⁺ channel with its specific BeKm-1 peptide: insights into the selectivity of molecular recognition. *J Proteome Res*. 2007;6(2):611–20.
106. Nencioni ALA, Neto EB, de Freitas LA, Dorce VAC. Effects of Brazilian scorpion venoms on the central nervous system. Vol. 24, *Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases*. 2018.
107. Duman A, Turkdogan KA, Akoz A, Avcil M, Dagli B, Canakci SE. A rare complication of scorpion venom: Atrial fibrillation. *Am J Emerg Med*. 2016;34(5):938e1–3.
108. Zawadski J V., Furchgott RF, Cherry P. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by substance. *Fed Proc*. 1981;40(3 I).
109. Ward MJ1, Ellsworth SA1 RD. Venom-gland transcriptomics and venom proteomics of the Hentz striped scorpion (*Centruroides hentzi*; Buthidae) reveal high toxin diversity in a harmless member of a lethal family. *Toxicon* [Internet]. 2018;142(1):14–29. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29248469>
110. Pinto MCL, Melo MB, Cruz ML, Verçosa Junior D, Melo MM. Cardiorespiratory evaluation of juvenile rats experimentally envenomed with *Tityus serrulatus* venom. *J venom anim toxins incl trop dis* [Internet]. 2010;16(2):253–67. Available from: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1678-91992010000200008&lng=pt&nrm=iso&tlng=en
111. Ay I, Tuncer M, Onur R. Effects of *Androctonus crassicauda* scorpion venom on endothelium-dependent and -independent vascular responses of rabbit aorta. *Gen Pharmacol*. 1996;27(3):519–23.
112. Jiménez-Vargas JM, Restano-Cassulini R, Possani LD. Toxin modulators and blockers of hERG K⁺ channels. *Toxicon* [Internet]. 2012 Sep 15 [cited 2019 Jan 15];60(4):492–501. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0041010112000967?via%3Dihub>
113. Schmitt N, Grunnet M, Olesen SP. Cardiac potassium channel subtypes: New roles in repolarization and arrhythmia. *Physiol Rev*. 2014;94(2):609–53.
114. Kass RS. The channelopathies: novel insights into molecular and genetic

- mechanisms of human disease. *J Clin Invest*. 2007;115(8):1986–9.
115. Oukkache N, Rosso J-P, Alami M, Ghalim N, Saïle R, Hassar M, et al. New analysis of the toxic compounds from the *Androctonus mauretanicus* scorpion venom. *Toxicon* [Internet]. 2008 Apr 1 [cited 2019 Jan 16];51(5):835–52. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0041010107004618?via%3Dihub>