

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA DEL VENENO DE *Tityus gonzalespongai* (SCORPIONES, BUTHIDAE) EN RATONES C57BL/6

BIOLOGICAL ACTIVITY OF *Tityus gonzalespongai* (SCORPIONES, BUTHIDAE) VENOM IN MICE C57BL/6

LEONARDO DE SOUSA^{1,2}, PEDRO PARRILLA-ÁLVAREZ³, PAMELA PÉREZ DI GAETA¹,
LEOMERY ROMERO¹, MERCEDES QUIROGA³

¹Centro de Investigaciones en Ciencias de la Salud (CICS), Instituto de Investigación y Desarrollo Anzoátegui (INDESA) y Dpto. de Ciencias Fisiológicas, Esc. de Ciencias de la Salud, Universidad de Oriente, Núcleo de Anzoátegui, Puerto La Cruz, Venezuela. ²Postgrado de Biología Aplicada, Esc. de Ciencias, Universidad de Oriente, Núcleo de Sucre, Cumaná, Venezuela. ³Lab. de Alacranología, Esc. de Ciencias de la Salud, Universidad de Oriente, Núcleo de Bolívar, Ciudad Bolívar, Venezuela.
E-mail: leonardodesousa@yahoo.com

RESUMEN

En este trabajo se estudió la actividad biológica de la inyección intraperitoneal del veneno de *Tityus gonzalespongai* (Scorpiones, Buthidae) en ratones hembra homocigotos C57BL/6. Se calculó la DL₅₀ para una hora de experimentación, y se evaluaron los signos de toxicidad aguda. En estas condiciones, la DL₅₀ fue de 11,91 (11,22-12,59) mg.kg⁻¹. Los signos observados correspondieron fundamentalmente con activación colinérgica muscarínica. Se observaron tres grupos de manifestaciones clínicas cuando se comparó el conjunto de ratones que fallecieron por efecto tóxico del veneno con el grupo de los sobrevivientes. Los ratones que murieron presentaron secreción ocular, exoftalmos, cianosis peribucal y convulsiones (tónico-clónicas). Los signos caracterizados por respiración forzada abdominal, periodos de bradipnea/apnea, presencia de defecación líquida, sialorrea (escasa que evolucionó a abundante y espesa) y parálisis flácida se presentaron precozmente en los animales que murieron. Con estos resultados el veneno de *Tityus gonzalespongai* refuerza el criterio toxinológico que define la macroregión endémica de escorpionismo en la región Nororiental de Venezuela.

PALABRAS CLAVE: Veneno, escorpión, toxicidad, toxínología.

ABSTRACT

We report on the biological activity of *Tityus gonzalespongai* (Scorpiones, Buthidae) venom when injected intraperitoneally in female homozygous C57BL/6 mice. The lethal dose (LD₅₀) was calculated one hour after injection, and the acute toxicity symptoms were noted. The LD₅₀ was 11.91 (11.22-12.59) mg.kg⁻¹. The toxicity symptoms observed suggest a venom-mediated muscarinic cholinergic receptor activation. Three groups of clinical manifestations were recorded in envenomed animals compared to control (saline-injected) mice. Animals injected with lethal doses presented ocular secretions, exophthalmos, perioral cyanosis and tonic-clonic convulsions. In this group, early symptoms included forced abdominal breathing, bradypnea/apnea intervals, liquid defecation, sialorrhoea (scarce at the beginning but thick and abundant later on) and flaccid paralysis. These data allow the classification of *Tityus gonzalespongai* as a species of medical importance and provide support for the toxínological criteria used previously to define the Venezuelan Northeast as an endemic macroregion for scorpionism.

KEY WORDS: Venom, scorpion, toxicity, toxinology.

INTRODUCCIÓN

La escorpiofauna venezolana está constituida, por cinco familias (Buthidae, Chactidae, Euscorpiidae, Hemiscorpiidae y Scorpionidae), 17 géneros y 184 especies (Borges y De Sousa 2006; Rojas-Runjaic y De Sousa 2007). Entre ellas, se encuentran las del género *Tityus* (Buthidae), de interés médico, con 52 taxa (Rojas-Runjaic y De Sousa 2007). Algunas de sus especies han

sido responsabilizadas por accidentes humanos graves, incluyendo casos fatales de escorpionismo (Borges 1996; De Sousa *et al.* 2000; Borges *et al.* 2002; Borges y De Sousa 2006).

La composición del veneno de estos artrópodos es compleja. Contiene proteínas de bajo peso molecular, esenciales en el efecto tóxico, y causantes de las alteraciones fisiológicas observadas tanto en el modelo

experimental como en el humano (Borges *et al.* 2004a; 2006a,b; 2008). Sus componentes más letales son las α - y β -toxinas; cuyos blancos moleculares son los canales de Na^+ voltaje-dependiente de las membranas excitables. Su interacción con estos canales modifican los mecanismos de permeabilidad iónica fundamentales para la homeostasis celular; produciendo alteraciones de la función de varios órganos y sistemas (Borges *et al.* 1999; Tsushima *et al.* 1999; Barona *et al.* 2005; Borges y De Sousa 2006; Borges *et al.* 2006a, 2008; Leipold *et al.* 2006). Sus efectos farmacológicos posteriores se deben, al menos en parte, a la descarga de catecolaminas y acetilcolina como resultado de la despolarización de terminales pre- y post-ganglionares del sistema nervioso autónomo, produciendo los signos y síntomas clásicos observados en el escorpionismo (humano, veterinario y experimental) (Mazzei *et al.* 2002; Saldarriaga y Otero 2000; Barona *et al.* 2004; Borges y De Sousa 2006); incluso se ha demostrado actividad sobre parásitos del género *Leishmania* (Kinetoplastida, Trypanosomatidae) (Borges *et al.* 2006c).

El envenenamiento escorpiónico es un complejo sindrómico principalmente asociado a disfunción en los sistemas cardiovascular, respiratorio, nervioso e inflamatorio que puede conducir a falla multiorgánica y a la muerte por distres respiratorio (Sofer *et al.* 1996; Voronov *et al.* 1999; Mazzei *et al.* 1997, 2002; Otero *et al.* 1998, 2004; Borges y De Sousa 2006). En los casos moderados o graves, durante las primeras horas del accidente, se observan manifestaciones de distintos sistemas: diaforesis, sialorrea, vómitos, epífora, tos, broncorrea, disfagia, miosis o midriasis, temblores y contracciones de la musculatura esquelética, reflejos osteotendinosos exaltados, hiperexcitabilidad, priapismo, dolor abdominal con hipertonia visceral o distensión gastrointestinal, alteraciones de la frecuencia y ritmo respiratorio y cardíaco. Las cardíacas están caracterizadas por taquicardia seguida de bradicardia (o viceversa) u otras alteraciones electrocardiográficas. Adicionalmente, se observa incremento de la presión sanguínea o, por el contrario, hipotensión con alteraciones del flujo sanguíneo. Finalmente, el paciente puede evolucionar a la insuficiencia cardíaca congestiva asociada a hipotensión grave y edema agudo de pulmón relacionadas con la posible participación de mediadores inflamatorios liberados por el páncreas (De Sousa *et al.* 1995; Mazzei *et al.* 1997, 2002; Sofer *et al.* 1996; Voronov *et al.* 1999; Otero *et al.* 1998, 2004; Borges *et al.* 2004b).

La Dosis Letal Cincuenta (DL_{50}) es la cantidad requerida de una droga o toxina que es capaz de producir

la muerte en el cincuenta por ciento de una población de animales experimentales (Ross 1996). Su determinación es esencial para la estandarización de los venenos y antivenenos de origen natural (Sevcik 1987). Este índice letal se puede establecer utilizando distintos métodos, entre los cuales se pueden mencionar: Reed y Muench (1938), Dixon y Mood (1948), Beccari (1949), Lichtfield y Wilcoxon (1949), Finney (1952), Molinengo (1979) o Meier y Theakston (1986).

En el presente trabajo se determinó por vía intraperitoneal, para 60 minutos de experimentación, la DL_{50} del veneno de *Tityus gonzalespongai* (Quiroga *et al.* 2004) por el método de Dixon y Mood (1948) modificado (Sevcik 1987) y se evaluaron las manifestaciones clínicas inducidas como efecto tóxico del envenenamiento agudo experimental con el veneno de esta especie en ratones hembra C57BL/6.

MATERIALES Y MÉTODOS

Área y método de captura

Los escorpiones fueron capturados, en febrero de 2004, en la hacienda cafetalera La Orquídea (10°00'09,2" N y 64°07'45,4" O, 1.600 m de altitud) (a unos 4,8 km del caserío La Piedra de Mundo Nuevo, parroquia Libertador, municipio Freites, estado Anzoátegui), localidad tipo de *T. gonzalespongai* (Quiroga *et al.* 2004). Durante el día fueron localizados bajo troncos, en el interior de la corteza parcialmente desprendida de los árboles, en el interior de troncos en proceso de descomposición y en la base de plantas de café (*Coffea arabica*). Durante la noche se utilizaron lámparas portátiles de luz ultravioleta. Trasladados al laboratorio, se mantuvieron vivos para la extracción de su veneno. Parte de estos ejemplares se ingresaron, depositaron y catalogaron como material de referencia en la Colección de Escorpiones del Laboratorio de Toxinología (CELT), Centro de Investigaciones en Ciencias de la Salud (CICS), Escuela de Ciencias de la Salud, Universidad de Oriente, Núcleo de Anzoátegui, con los números de catálogo CELT-551 a 615 (n = 65; ♀ = 45, ♂ = 20).

Obtención y purificación parcial del veneno

Los escorpiones se ordeñaron por estimulación eléctrica [pulsos rectangulares (6 por segundo), de 100 mseg de duración y 60 V/pulso generados con un estimulador Grass®, modelo S-D5, B-04-03954] según técnica desarrollada en el Laboratorio de Alacranología, Escuela de Ciencias de la Salud, Universidad de

Oriente, Núcleo de Bolívar (Quiroga *et al.* 1982). El veneno eyectado, de ejemplares hembras y machos, fue recogido de forma separada en tubos capilares de 100 μ l de capacidad y luego transferido a tubos Eppendorf de 1,5 ml. El veneno fue suspendido en un mililitro de agua bidestilada y agitado en vortex (Super-Mixer®). Consecutivamente se centrifugó a 14 000 g (Labnet para tubos Eppendorf®, modelo Z180M) por 20 minutos para separar restos celulares de la fase soluble que contiene las proteínas con actividad farmacológica. Se realizaron diluciones del veneno, cuando fue necesario, en agua bidestilada 1/5, 1/10 o 1/20 como paso previo a la cuantificación de las proteínas contenidas en el veneno.

Cuantificación de la cantidad de proteínas del veneno

Se determinó la concentración de proteínas en la fracción soluble (obtenida en el proceso de centrifugación) mediante lectura de absorbancia en espectrofotómetro (Jenway®, modelo 6405 UV/vis) a una longitud de onda de 280 nm, asumiendo que 1 unidad de absorbancia (a esta longitud) representó una concentración de 1 mg. ml⁻¹ (Possani *et al.* 1980). Alícuotas de 1 ml del veneno, de ejemplares hembras, se almacenaron a -20 °C hasta el momento de su uso para evaluar su actividad biológica en el modelo múrido. El resto fue liofilizado (liofilizador Labconco®) y almacenado a -20 °C.

Determinación de la DL₅₀ y evaluación de los signos de toxicidad aguda

Los lineamientos de investigación en Toxinología, utilizando animales de experimentación, según el Código Ético de la *International Society on Toxinology* (IST), refrendado por sus miembros en ocasión del 6th *European Symposium on Animal, Plant and Microbial Toxins* (Basle, Suiza, Agosto de 1984) estableció: (1) Disminuir al mínimo el período de sufrimiento de los animales de experimentación y no someterlos a procedimientos dolorosos extremos. (2) Utilizar el menor número posible. (3) Sólo se requerirán para investigar los mecanismos de acción de las toxinas de origen natural. (4) El uso de la DL₅₀ sólo procederá, con fines científicos, para la estandarización de los venenos y de los antivenenos de origen natural. (5) En lo posible, para establecer este índice letal se debe utilizar alrededor de 12 animales, acompañando los resultados del tiempo de supervivencia y los exámenes patológicos de los ejemplares sometidos a este procedimiento. En tal sentido, el método de Dixon y Mood (1948) es uno de los más apropiados (Sevcik 1987).

Se estableció la Dosis Letal Cincuenta (DL₅₀), para 60

minutos de experimentación, del veneno de ejemplares hembra de *T. gonzalespongai*, por el método secuencial de Dixon y Mood (1948), modificado por Sevcik (1987) en ratones hembra, homocigotos, cepa C57BL/6 (adquiridos en el bioterio del Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas, IVIC). El veneno, parcialmente purificado, fue inyectado con una microjeringa Hamilton® de 50 μ l de capacidad, por vía intraperitoneal (vip). Las dosis administradas se calcularon según el peso de cada animal experimental (Tabla 1). Para la administración del veneno se siguió el siguiente esquema de trabajo: en el primer ratón C57BL/6, por vip, se utilizó una dosis inicial de: $X_1 = \text{Anti-log}(\text{Anti-logaritmo}) 1 = 10 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ de ratón. Si este primer animal respondió con la muerte, el segundo ratón recibió un *Anti-log* de la dosis: $X_2 = \text{Anti-log Dosis}(X_1) - d$. Si el primer animal se mantuvo vivo, entonces, el segundo recibió un *Anti-log* de la dosis: $X_2 = \text{Anti-log Dosis}(X_1) + d$. En estos experimentos el *Anti-log* de la dosis (X) fue modificado por un factor constante [$d = 0,05$]. El procedimiento continuó y la dosis del siguiente animal fue: $X_n = X_m - d$, si el animal m respondió con la muerte con la dosis *Anti-log* X_m ; o bien: $X_n = X_m + d$, si el ratón m se mantuvo vivo con la dosis *Anti-log* X_m . El muestreo se detuvo al obtener una secuencia de: † 0 † 0 † 0 † 0 ⊗, ó 0 † 0 † 0 † 0 † 0 † ⊗; donde † indicó muerte, 0 supervivencia y ⊗ la dosis que debería ser administrada al siguiente animal (punto final).

Para establecer la DL₅₀ se calculó la mediana de las dosis a partir del primer punto de inflexión que incluye además el valor de la dosis que recibiría el siguiente animal (punto final: ⊗). Los signos clínicos expresados como efecto de toxicidad aguda experimental inducida por la inyección intraperitoneal del veneno fueron observados meticulosamente durante los 60 minutos de experimentación y tabulados cronológicamente. La población de ratones que sobrevivió, al finalizar el tiempo establecido de observación, fue sacrificada con vapores de cloroformo. Se utilizaron animales testigo a los cuales se administró solución salina fisiológica en volúmenes similares a los del grupo experimental. Todos los animales se mantuvieron con alimentación e hidratación *ad libitum*.

Procesamiento estadístico

Se calcularon las medianas (de los datos válidos a partir del punto de inflexión) según el método no paramétrico de Hodges y Lehmann y sus límites de confianza (entre paréntesis) al 95% de certeza para la DL₅₀ y el tiempo de aparición de los signos de toxicidad aguda experimental. La diferencia entre las medianas

fue probado por la técnica de análisis de variancia de Kruskal-Wallis, con un nivel de significación $p < 0,05$. Para el procesamiento de los datos se utilizó el programa estadístico V-8.2 del Dr. Carlos Sevcik, Laboratorio de Neurofarmacología Celular, Centro de Biofísica y Bioquímica, IVIC, Caracas.

RESULTADOS

En la Tabla 1 se presentan los datos del protocolo de administración del veneno de *T. gonzalespongai* por vip para el estudio de la toxicidad aguda experimental y para la determinación de la DL_{50} en ratones hembra C57BL/6 observados durante sesenta minutos. La secuencia de

cálculos fue la siguiente: R_1 recibió una dosis (*Anti-log* 1) = 10,00 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ de ratón, este animal sobrevivió a los efectos del veneno. Se calculó la dosis de R_2 : $R_2 = \text{Anti-log Dosis } R_1 + 0,05$; $R_2 = 1,00 + 0,05$; $R_2 = \text{Anti-log } 1,05 = 11,22 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ de ratón (R_2 sobrevivió). Se calculó la dosis de R_3 : $R_3 = \text{Anti-log Dosis } R_2 + 0,05$; $R_3 = 1,05 + 0,05$; $R_3 = \text{Anti-log } 1,10 = 12,59$ (R_3 murió: punto de inflexión; cambio de sobrevivencia a muerte). A partir de este animal se inició la corrida válida. La dosis de R_4 : $R_4 = \text{Anti-log Dosis } R_3 - 0,05$; $R_4 = 1,10 - 0,05$; $R_4 = \text{Anti-log } 1,05 = 11,22$. $R_5 = \text{Anti-log } 1,10 = 12,59$, hasta finalmente R_{14} : Punto final \otimes : *Anti-log* 1,05 = 11,22. El número total de ratones (válidos o no), para la experiencia fue de 13 animales más el punto final (R_{14}).

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

RATÓN (n)	PESO (g)	DOSIS (<i>Anti-Log</i>)	DOSIS ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)	DOSIS TOTAL (μg)	VOLUMEN (μl)	MUERTE SOBREVIVENCIA
CORRIDA NO VÁLIDA						
1	17,57	1,00	10,00	175,57	24,99	0
2	18,18	1,05	11,22	203,98	29,02	0
		Sub-Total		379,55		
CORRIDA VÁLIDA						
3	15,33	1,10	12,59	193,00	27,45	†
4	18,97	1,05	11,22	214,84	30,28	0
5	18,09	1,10	12,59	227,44	32,40	†
6	17,35	1,05	11,22	194,67	27,69	0
7	18,49	1,10	12,59	232,79	33,11	0
8	17,69	1,15	14,13	249,96	35,50	†
9	18,28	1,10	12,59	230,15	32,74	†
10	15,31	1,05	11,22	171,78	24,44	†
11	17,15	1,00	10,00	171,50	24,40	0
12	18,94	1,05	11,22	212,51	30,23	0
13	17,07	1,10	12,59	214,91	30,57	†
		Sub-Total		2.313,55		
		Total		2.693,10		
SIGUIENTE ANIMAL						
14		1,05	11,22			⊗

Ratones válidos: $R_3 \rightarrow R_{13} + R_{14}$, Control: R_C , 13,60 g de peso corporal; inyectado vip con 50 μl de solución fisiológica, 0: Ratón con sobrevivencia, †: Ratón con *exitus letales*, ⊗: Punto final. Dosis A (*Anti-log* 1.00), Dosis B (*Anti-log* 1.05), Dosis C (*Anti-log* 1,10).

Para establecer la DL_{50} se utilizaron los ratones de la corrida válida de $R_3 \rightarrow R_{13}$ ($n = 11$) + R_{14} (punto final: \otimes) (total; $n = 12$) y para los efectos de toxicidad aguda experimental de $R_3 \rightarrow R_{13}$ ($n = 11$). Se descartaron las respuestas no válidas (ratones R_1 y R_2). Se utilizó un ratón control (R_C), el cual no desarrolló ninguna manifestación clínica de toxicidad aguda posterior a la inyección de 50 μ l de solución fisiológica por vip. La cantidad total de veneno utilizado fue de 2,7 mg.

En la Tabla 2 se proveen los datos para establecer la frecuencia de muerte según la dosis administrada por vip en el modelo C57BL/6. En la corrida válida murieron seis (6) ratones. Cuatro (66,6%) con la dosis C (12,59 μ g.g⁻¹), uno (16,7%) con la dosis D (14,13 μ g.g⁻¹) y uno con la B (11,22 μ g.g⁻¹). Cuando se utilizó la dosis A (10,00 μ g.g⁻¹) el ratón sobrevivió. La DL_{50} para 60 minutos de observación, del veneno de *Tityus gonzalespongai* administrado por vip en ratones hembra C57BL/6 fue de 11,91 (11,22-12,59) μ g.g⁻¹ (Figura 1).

Tabla 2. Secuencia de dosis administradas, por vip, del veneno de *T. gonzalespongai* en el modelo murido C57BL/6.

NÚMERO DE RATÓN	ANTI-LOG DOSIS (μ g.g ⁻¹ DE RATÓN)			
	1,00 (10,00 μ g.g ⁻¹) DOSIS A	1,05 (11,22 μ g.g ⁻¹) DOSIS B	1,10 (12,59 μ g.g ⁻¹) DOSIS C	1,15 (14,13 μ g.g ⁻¹) DOSIS D
CORRIDA NO VÁLIDA				
1	0			
2		0		
CORRIDA VÁLIDA				
3			†	
4		0		
5			†	
6		0		
7			0	
8				†
9			†	
10		†		
11	0			
12		0		
13			†	
SIGUIENTE ANIMAL: PUNTO FINAL				
14		\otimes		
DATOS				
CORRIDA VÁLIDA (FRECUENCIA DE MUERTE [†]) n = 6 (100%)	0 (0%)	1 (16,7%)	4 (66,6%)	1 (16,7%)

0: indica supervivencia, †: indica muerte, \otimes : indica siguiente animal (punto final del experimento).

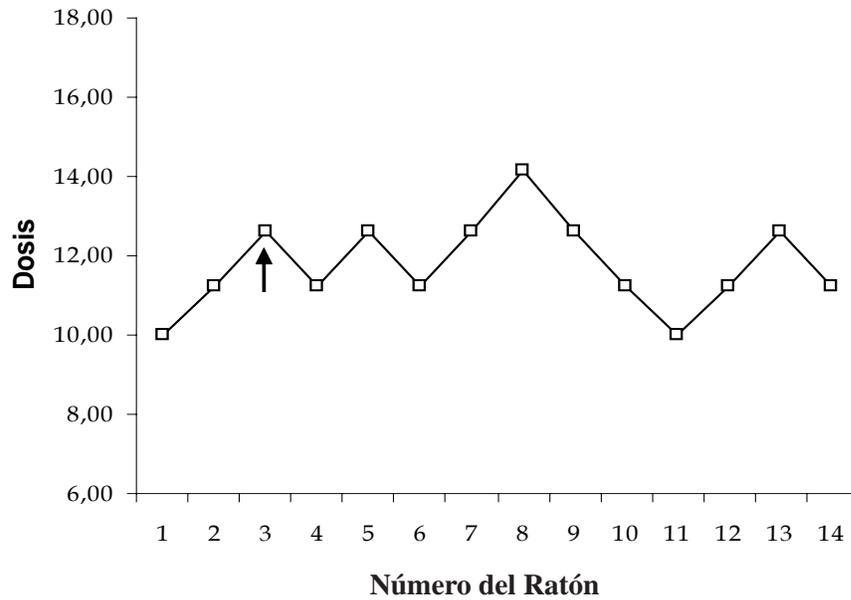


Figura 1. Determinación de la DL₅₀ del veneno de *T. gonzalespongai* en ratones hembra C57BL/6, con pesos entre 15,31 y 18,97 g, inyectados vip. La flecha indica el primer punto de inflexión e inicio de los datos válidos para el cálculo de la DL₅₀. El resultado se presenta como la mediana y sus límites para un 95% de confianza (entre paréntesis): DL₅₀, vip, 60 minutos = 11,91 (11,22-12,59) mg.kg⁻¹ de ratón.

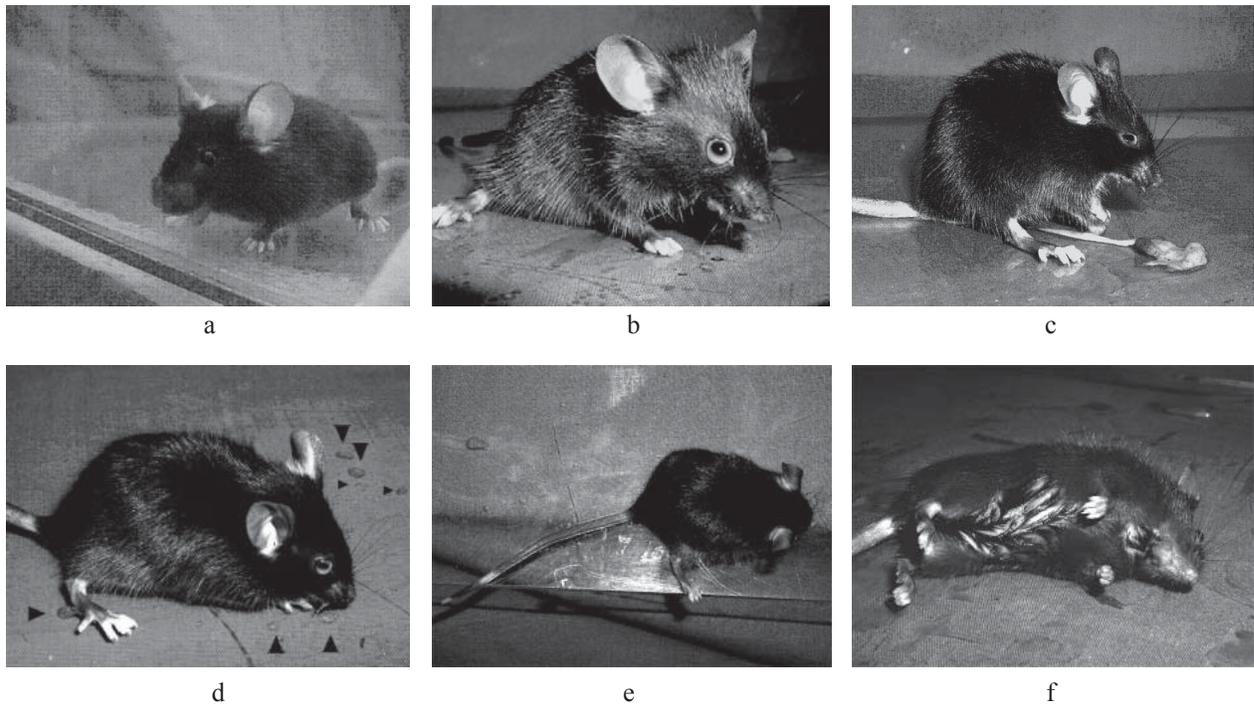


Figura 2. Comparación de un ratón hembra C57BL/6 control con uno inyectado por vip con el veneno de *T. gonzalespongai* mostrando signos de toxicidad aguda. (a) Ratón testigo. (b) Ratón experimental mostrando: facies tóxica, exoftalmos y secreción ocular. (c y d) Debilidad muscular. (c) Defecación pastosa. (d) Sialorrea abundante [las flechas indican ubicación de saliva espesa sobre el sustrato]. (e) Postura mostrando debilidad muscular y parálisis flácida. (f) Secreciones abundantes sobre abdomen y postura pre-mortem con parálisis flácida.

En el modelo múrido C57BL/6, se observaron 15 signos clínicos de toxicidad aguda inducidos como efecto tóxico de la inyección vip del veneno (Tabla 3). En el 100% de los animales, correspondientes a la corrida válida, se observó: hiperactividad seguida de hipoactividad, piloerección, alteraciones de la marcha, movimientos deglutorios, disnea (caracterizada inicialmente por respiración superficial torácica que pasa a superficial abdominal, evolucionando a forzada abdominal y finalmente periodos de bradipnea/apnea), sialorrea (que evolucionó de escasa a abundante y espesa) y defecación (sólida a líquida con o sin moco). En el

90,9% se observó parálisis flácida (5/5 ratones muertos y en 5/6 ratones sobrevivientes) y en 72,7% secreción ocular (5/5 ratones muertos y en 2/6 vivos). El 54,5% exoftalmos, convulsiones y cianosis peribucal (estos signos se observaron fundamentalmente en la población de ratones que murieron como respuesta al efecto tóxico). Con menor frecuencia (18,2%) signo de Straub y temblores generalizados. Algunos efectos relevantes de toxicidad aguda se presentan en la figura 2: facies tóxica, piloerección y signos de potente estimulación muscarínica [sialorrea, secreción ocular y defecación que evolucionó desde sólida hasta pastosa (con moco) o líquida].

Tabla 3. Frecuencia de las manifestaciones clínicas inducidas por la toxicidad aguda del veneno de *T. gonzalespongai* administrado por vía intraperitoneal en ratones C57BL/6.

SIGNO DE TOXICIDAD ⇓	RATÓN (N) ⇔	MUERTOS					VIVOS						N	%
		R ₃	R ₅	R ₈	R ₉	R ₁₀	R ₄	R ₆	R ₇	R ₁₁	R ₁₂	R ₁₃		
Hiperactividad		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	11	100
Hipoactividad		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	11	100
Piloerección		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	11	100
Alteración de la marcha		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	11	100
Movimientos deglutorios		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	11	100
Disnea	RST	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	11	100
	RSA	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	11	100
	RFA	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	11	100
	Bradipnea/Apnea	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	11	100
Sialorrea	Escasa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	11	100
	Abundante	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	11	100
Defecación	Sólida *	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	11	100
	Pastosa *	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	11	100
	Líquida *	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	11	100
Parálisis flácida		+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	10	90,9
Secreción ocular		+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	8	72,7
Exoftalmos		+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	6	54,5
Convulsiones		+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	6	54,5
Cianosis peribucal		+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	6	54,5
Signo de Straub		-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	2	18,2
Temblores generalizados		-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	2	18,2

RST = Respiración superficial torácica, RSA = Respiración superficial abdominal, RFA = Respiración forzada abdominal

* con o sin moco.

Los signos observados antes de la muerte fueron: periodos de irregularidad en la amplitud y frecuencia respiratoria (bradipnea/apnea con cianosis peribucal) y exoftalmos. Todos los ratones antes de morir presentaron apnea prolongada. La parálisis flácida se manifestó como signo relevante de toxicidad con este veneno.

En el modelo C57BL/6 se observaron tres grupos de manifestaciones clínicas (Tabla 4): (a) El Grupo 1, sin diferencias significativas en el tiempo de aparición de los signos (cuando se comparó el conjunto de ratones que fallecieron como respuesta a los efectos tóxicos del veneno con el de los sobrevivientes). En los primeros 20 minutos: hiperactividad seguida, inmediatamente, de hipoactividad, piloerección, alteraciones de la marcha, movimientos deglutorios, disnea (caracterizada por respiración torácica y abdominal superficial) y

defecación (sólida a pastosa). (b) El Grupo 2, con signos clínicos que presentaron diferencias significativas en su tiempo de aparición cuando se compararon los dos grupos de ratones: disnea caracterizada por respiración forzada abdominal que evolucionó a periodos de bradipnea/apnea, defecación líquida, sialorrea (escasa que evolucionó a abundante y espesa) y, finalmente, parálisis flácida. En los ratones que fallecieron estos signos se presentaron precozmente. (c) El Grupo 3, con signos clínicos presentes casi exclusivamente en el grupo de animales que fallecieron por efecto tóxico del veneno. Estos ratones presentaron, en orden de aparición, secreción ocular y exoftalmos. Inmediatamente antes de la muerte, cianosis peribucal y convulsiones (tónico-clónicas). La mediana para el tiempo de muerte con sus límites de confianza al 95% fue de 38,5 (33,50-42,00) minutos.

Tabla 4. Comparación del tiempo de aparición de los signos de toxicidad aguda entre ratones C57BL/6 que murieron y sobrevivieron al efecto tóxico inducido por el veneno de *T. gonzalespongai* administrado por vía intraperitoneal.

Signo de Toxicidad	TIEMPO DE APARICIÓN DE LOS SIGNOS DE TOXICIDAD (Minutos)				Kruskal-Wallis	p	
	Sobrevivientes		Muertos				
	Mediana	[Límites al 95%]	Mediana	[Límites al 95%]			
Hiperactividad		1,00	[1,00-1,50]		0,73	ns	
Hipoactividad		4,00	[3,50-5,00]		0,27	ns	
Piloerección		4,00	[3,00-5,00]		1,63	ns	
Alteración de la marcha		5,00	[4,00-6,50]		1,20	ns	
Movimientos deglutorios		21,50	[19,00-25,00]		3,15	ns	
Disnea	RST		8,00	[7,00-9,00]		1,01	ns
	RSA		17,50	[13,50-20,00]		1,88	ns
	RFA	48,50	[45,00-51,50]	25,00	[20,50-30,00]	7,50	p=0,00038
	Bradipnea/Apnea	50,50	[45,00-54,00]	32,50	[28,50-35,00]	7,50	p=0,00038
Defecación	Sólida *		12,50	[9,50-15,00]		2,14	ns
	Pastosa *		16,00	[12,50-19,00]		0,53	ns
	Líquida *	35,00	[30,00-39,00]	22,50	[18,50-25,00]	7,50	p=0,00038
Sialorrea	Escasa	31,00	[30,00-31,00]	21,00	[18,00-24,00]	7,22	p=0,00022
	Abundante	46,00	[45,00-47,00]	30,00	[24,00-35,00]	7,50	p=0,00038
Parálisis flácida		56,00	[47,00-57,00]	31,00	[27,00-35,00]	6,00	p=0,00131
Secreción ocular				20,00	[15,00-25,00]		
Exoftalmos				31,00	[26,50-41,00]		
Cianosis peribucal				33,00	[27,00-40,00]		
Convulsiones **				35,50	[31,00-39,50]		
Estado final	Vivo	60	[60,00-60,00]				
	Muerto			38,50	[33,50-42,00]		

RST = Respiración superficial torácica, RSA = Respiración superficial abdominal, RFA = Respiración forzada abdominal, * con o sin moco

** Tónico-clónicas.

DISCUSIÓN

El procedimiento de Dixon y Mood proporcionó, en este trabajo, las siguientes ventajas: (1) Utilización de un menor número de animales de experimentación [$n = 13 +$ punto final ($R_1 \rightarrow R_{13} + R_{14}$)], (2) Establecimiento de un menor tiempo de experimentación (ajustado para 60 minutos de observación con el fin de minimizar la duración del ensayo y, por lo tanto, el sufrimiento de los animales), (3) Ahorro de material biológico (la cantidad total de veneno utilizado fue de 2,70 mg) y (4) Empleo de una vía fácil de administración del veneno como la intraperitoneal.

Otros métodos han sido utilizados para determinar la potencia del veneno de algunas especies de

escorpiones venezolanos. Ortiz (1985) y Febres (1991) emplearon el de Reed y Muench (1938), para el estudio de la actividad biológica del veneno de *Rhopalurus laticauda* y *T. caripitensis* en ratones albinos, por vía intravenosa. Éste implicó la utilización de un gran número de animales de experimentación (entre 90 y 94 ratones albinos); además de usar un tiempo de observación experimental de 24 horas. Parrilla-Álvarez (1999) evaluó los venenos de *T. discrepans*, *T. caripitensis* y *T. ivicnancor* y determinó sus DL_{50} , para 60 minutos de observación, por el método de Dixon y Mood (1948) modificado (Sevcik 1987) utilizando la vía subcutánea en el modelo C57BL/6. En las condiciones antes señaladas, las DL_{50} obtenidas por estos y otros autores venezolanos se presentan en la Tabla 5.

Tabla 5. DL_{50} de varias especies de escorpiones venezolanos.

Especie	Cepa de Ratón	Vía de Administración	Tiempo de Observación	Método	DL_{50} (mg.kg ⁻¹)	Ref
<i>Rhopalurus laticauda</i>	Albino	intravenosa	24 h	Reed & Muench	30,0	1
<i>Tityus discrepans</i>	CD1	intravenosa	24 h	Lichtfield & Wilcoxon	2,5	2
<i>Tityus discrepans</i>	CD1	intracisterna magna	24 h	Lichtfield & Wilcoxon	16,0 µg.g ⁻¹	2
<i>Tityus caripitensis</i> (♀)	Albino	intravenosa	24 h	Reed & Muench	5,0	3
<i>Tityus caripitensis</i> (♂)	Albino	intravenosa	24 h	Reed & Muench	5,0	4
<i>Tityus caripitensis</i> (♀)	NMRI	intraperitoneal	24 h	Reed & Muench	7,07	5
<i>Tityus ivicnancor</i>	C57BL/6	subcutánea	1 h	Dixon & Mood	8,43	6
<i>Tityus discrepans</i>	C57BL/6	subcutánea	1 h	Dixon & Mood	8,81	6
<i>Tityus caripitensis</i> (♀)	C57BL/6	subcutánea	1 h	Dixon & Mood	14,56	6
<i>Tityus zulianus</i> (a)	CD1	intravenosa	24 h	Finney	1,61	7
<i>Tityus zulianus</i> (b)	CD1	intravenosa	24 h	Finney	1,68	7
<i>Tityus perijanensis</i> (a)	CD1	intravenosa	24 h	Spearman-Karber	0,91	8
<i>Tityus perijanensis</i> (b)	CD1	intravenosa	24 h	Spearman-Karber	0,94	8
<i>Tityus gonzalespongai</i>	C57BL/6	intraperitoneal	1 h	Dixon & Mood	11,91	9

(1) Ortiz 1985; (2) Borges *et al.* 1990; (3) Febres 1991; (4) Parrilla-Álvarez *et al.* 1992; (5) Betancourt 1995; (6) Parrilla-Álvarez 1999; (7) Borges *et al.* 2002; (8) Borges y Rojas-Runjaic 2007; (9) Este trabajo.

Tityus zulianus capturados en: (a) Mesa Bolívar, Mérida; (b) Tucaní, Mérida. *T. perijanensis* capturados en: (a) Ipica, Sierra de Perijá, Zulia; (b) La Orchila, Sierra de Perijá, Zulia.

Los efectos de la inyección del veneno de *T. gonzalespongai*, por vip, fueron hiperactividad inicial que se continuó con hipoactividad. Posteriormente, efectos sobre el sistema nervioso autónomo parasimpático con salivación profusa, diarrea (aumento del peristaltismo intestinal) y secreción ocular. Alteraciones en el ritmo y frecuencia respiratoria. Los que mueren, por el efecto tóxico del veneno, desarrollaron periodos de apnea prolongada y convulsiones acompañadas de hiperextensión de la columna vertebral, tren delantero y trasero (semejando un opistótono) y finalmente parálisis flácida hasta morir. Se logró separar tres grupos de manifestaciones clínicas. (1) El grupo sin deferencias significativas en su tiempo de aparición cuando se compararon los ratones que fallecieron y los que sobrevivieron a los efectos del veneno. (2) Los signos que presentaron diferencias significativas en el tiempo de aparición cuando se compararon los dos grupos de ratones, y (3) Los signos que están presentes casi exclusivamente en el grupo de animales que fallecieron por causa del envenenamiento experimental. Estos efectos, en general, fueron similares a los observados con los venenos de otros *Tityus* (Betancourt 1995; Febres 1991; Parrilla-Álvarez 1999).

La clínica inducida experimentalmente con el veneno de distintos géneros y especies es, en esencia, similar; la mayoría debidos a estimulación del sistema nervioso autonómico (tanto simpático como parasimpático) y motor (Bücherl 1953; Borges 1996; Parrilla-Álvarez 1999). Los animales inyectados por distintas vías de administración (intravenosa, intracisterna magna, subcutánea o intraperitoneal) con el veneno de *T. discrepans*, *T. caripitensis*, *T. ivicnancor*, *T. serrulatus* o *Rhopalurus laticauda*; presentaron un síndrome muscarínico caracterizado por sialorrea, secreción ocular y nasal, defecación, pérdida de orina, disnea y en el sistema motor fasciculaciones y contracciones musculares, parálisis espástica de los miembros (con las extremidades tetanizadas) ocurriendo la muerte debido a falla respiratoria y cardiovascular (Sampaio *et al.* 1983; Ortiz 1995; Borges *et al.* 1990; Febres 1991; Betancourt 1995; Parrilla-Álvarez 1999).

Ortiz (1985) observó el signo de Straub, como manifestación de toxicidad aguda, con una frecuencia del 6% (5/90 ratones) durante la evaluación del veneno de *Rhopalurus laticauda* en ratones albinos. Este signo está caracterizado por la elevación de cola en forma perpendicular al dorso del animal semejando una “S” itálica. El inducido por el veneno de *R. laticauda* fue

similar al desarrollado por la morfina y en ambos casos fue antagonizado por naloxona (Ortiz 1985). En el presente trabajo este signo se advirtió con una frecuencia de 18,2% (2/11 ratones). Según Parrilla-Álvarez (1999) éste tendría su base en la interacción del veneno en las terminaciones colinérgicas presinápticas de los centros medulares que producen la contracción de la musculatura encargada de la erección de la cola del ratón.

Ortiz (1985), Parrilla-Álvarez (1999) y Betancourt (1995), señalaron a la apnea prolongada, hiperventilación, fasciculaciones, exoftalmos, “saltos de rana”, salivación y parálisis del tren posterior; como signos que anticipan a la muerte en el modelo múrido utilizado por ellos. En este trabajo los que antecedieron a la muerte de los ratones, señalados en la Tabla 4, fueron en orden de aparición: secreción ocular y exoftalmos. Inmediatamente antes de la muerte, cianosis peribucal y convulsiones; falleciendo el animal con parálisis flácida (a diferencia de la parálisis espástica observada por la mayoría de los autores).

Nishikawa *et al.* (1994) clasificaron los venenos, de varias especies y géneros de escorpiones de Brasil, a partir de sus DL₅₀, en: (1) venenos altamente tóxicos, (2) moderadamente tóxicos y (3) prácticamente no tóxicos. Una propuesta como esta se debería aplicar a las especies venezolanas. En tal sentido el veneno de *T. gonzalespongai* podría iniciar esta clasificación de toxicidad (calculando la DL₅₀ por el método de Dixon y Mood, para 60 minutos de experimentación, en ratones hembra C57BL/6 y administrando el veneno por vip).

El territorio venezolano ha sido delimitado, con base en criterios epidemiológicos, en regiones macroendémicas de escorpionismo; en las cuales los accidentes severos y fatales se deben al envenenamiento por *Tityus* (De Sousa *et al.* 2000; Borges y De Sousa 2006). *Tityus gonzalespongai* (Scorpiones: Buthidae) fue la primera especie de este género descrita para el estado Anzoátegui (Quiroga *et al.* 2004); por lo cual viene a reforzar los criterios que determinan la macroregión endémica de escorpionismo en el nororiente de Venezuela (De Sousa *et al.* 1995, 1996, 1997, 1999, 2005, 2006, 2007, 2008), y adicionalmente contribuye con la elaboración del mapa de letalidad de las especies de *Tityus* propuesto por Borges (1996) y, más recientemente, para una demarcación del país en “Provincias Toxinológicas” planteada por Borges y De Sousa (2006) para una comprensión integral del escorpionismo en el país.

AGRADECIMIENTO

Nuestra gratitud a Jesús Manzanilla, Dinora Sánchez, Alberto Rodríguez Maracay, Ricardo Marcano, Héctor Romero, Jesús Lemus Ramos (El Gato), Tonio Gregoriani y Luis Fernando Navarrete, y a todos aquellos estudiantes de la Universidad Central de Venezuela y de la Universidad de Oriente, por su valiosa participación y ayuda en las distintas expediciones y trabajos de campo en el cerro La Laguna, caserío La Piedra de Mundo Nuevo. A los Drs. Mario García-París, David Buckley e Iñigo Martínez-Solano (Museo Nacional de Ciencias Naturales de Madrid, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Madrid, España) por sus comentarios realizados durante la expedición de febrero de 2004 a la localidad tipo de *T. gonzalespongai*. A los Profesores Adolfo Borges (Laboratorio de Toxinas Animales, Centro de Biociencias y Medicina Molecular, Instituto de Estudios Avanzados, Caracas) y Jesús Manzanilla (Museo del Instituto de Zoología Agrícola, Universidad Central de Venezuela, Maracay) por la lectura crítica del manuscrito. A la familia Romero, dueños de la hacienda La Orquídea, localidad tipo de *T. gonzalespongai*. A la compañía TELCOVEN, Manuel Maita y Haydee Guerrero por su hospitalidad. A FUNDACITE-Anzoátegui (PI-009-01, a LDS) y Consejo de Investigación, Universidad de Oriente (CI-1-0403-0799/97-99, a LDS) por el co-financiamiento.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BARONA J., OTERO R., NÚÑEZ V. 2004. Aspectos toxinológicos e inmunoquímicos del veneno de escorpión *Tityus pachyurus* Pocock de Colombia: capacidad neutralizante de antivenenos producidos en Latinoamérica. *Biomédica*. 24: 42-49 pp.
- BARONA J., BATISTA C., ZAMUDIO F., GÓMEZ-LAGUNAS F., OTERO R., POSSANI L. 2006. Proteomic analysis of the venom and characterization of toxins specific for Na⁺ and K⁺ channels from the Colombian scorpion *Tityus pachyurus*. *Bioch. Biophys. Acta*. 1764: 76-84 pp.
- BECCARI E. 1949. A method for reducing the number of pharmacological assays. *Nature*. 163: 534 pp.
- BETANCOURT O. 1995. Actividad biológica del veneno de escorpión (*Tityus caripitensis* hembra) en ratones albinos. Determinación de la Dosis Letal 50 (DL₅₀) por vía intraperitoneal. Ciudad Bolívar: Universidad de Oriente, Escuela de Medicina, [Disertación-Grado Médico Cirujano], 51 pp.
- BORGES A. 1996. Escorpionismo en Venezuela. *Acta Biol. Venez.* 16: 65-75 pp.
- BORGES A., DE SOUSA L. 2006. Escorpionismo en Venezuela: una aproximación molecular, inmunológica y epidemiológica para su estudio. *Rev. Fac. Farmacia (Caracas)*. 69 (1-2): 15-27 pp.
- BORGES A., ROJAS-RUNJAIC FJM. 2007. *Tityus perijanensis* González-Sponga (Scorpiones, Buthidae): Molecular assessment of its geographical distribution and venom lethality of Venezuelan populations. *Toxicon*. 50: 1005-1010 pp.
- BORGES A., ARANTES EC., GIGLIO JR. 1990. Isolation and characterization of toxic proteins from the venom of the Venezuelan scorpion *Tityus discrepans* (Karsch). *Toxicon*. 28: 1011-1017 pp.
- BORGES A., TSUSHIMA RG., BACKX P. H. 1999. Antibodies against *Tityus discrepans* venom do not abolish the effects of *Tityus serrulatus* venom on the rat sodium and potassium channels. *Toxicon*. 37: 867-881 pp.
- BORGES A., ARANDIA J., COLMENARES DE ARIAS Z., VARGAS AM., ALFONZO MJ. 2002. Caracterización epidemiológica y toxicológica del envenenamiento por *Tityus zulianus* (Scorpiones, Buthidae) en el estado Mérida, Venezuela. *Rev. Fac. Medicina (Caracas)*. 25: 76-79 pp.
- BORGES A., ALFONZO M., GARCÍA C., WINAND N., LEIPOLD E., HEINEMANN S. 2004a. Isolation, molecular cloning, and functional characterization of a novel beta-Toxin from the Venezuelan scorpion, *Tityus zulianus*. *Toxicon*. 43: 671-684 pp.
- BORGES A., TREJO E., VARGAS AM., HERNÁNDEZ A., CÉSPEDES G., ALFONZO M. 2004b. Pancreatic toxicity in mice elicited by *Tityus discrepans* and *Tityus zulianus* scorpion venoms. *Invest. Clín.* 45: 269-274 pp.
- BORGES A., GARCÍA CC., LUGO E., ALFONZO MJ., JOWERS MJ., OP DEN CAMP HJM. 2006a. Diversity of long-chain toxins in *Tityus zulianus* and *Tityus discrepans* venoms (Scorpiones, Buthidae): Molecular, immunological and mass spectral analyses. *Comp. Biochem. Physiol.* 142C: 240-252 pp.
- BORGES A., DE SOUSA L., MANZANILLA J. 2006b. Description of a new *Tityus* species (Scorpiones: Buthidae) from Sierra de Portuguesa, western Venezuela, base on

- morphological and mitochondrial DNA evidence. *Zootaxa*. 1107: 49-68 pp.
- BORGES A., SILVA S., OP DEN CAMP H., VELASCO E., ALVAREZ M., ALFONZO M., JORQUERA A., DE SOUSA L., DELGADO O. 2006c. *In vitro* leishmanicidal activity of *Tityus discrepans* scorpion venom. *Parasitol. Res.* 99: 167-173 pp.
- BORGES A., DE SOUSA L., ESPINOZA J., MELO M., SANTOS R., KALAPOTHAKIS E., VALADARES D., CHÁVEZ-OLORTEGUI C. 2008. Characterization of *Tityus* venom using synaptosome binding assays and reactivity towards Venezuelan and Brazilian antivenoms. *Toxicon*. 51: 66-79 pp.
- BÜCHERL W. 1953. Atividades das peçonhas de *Tityus serrulatus e bahiensis* sobre camundongos. *Mem. Inst. Butantan*. 25: 83-108 pp.
- DE SOUSA L., KIRIAKOS D., JIMÉNEZ J., MICHIELLI D., RODRÍGUEZ C., MIRABAL J., QUIROGA M. 1995. Accidente cerebrovascular isquémico por emponzoñamiento escorpiónico: observación clínica. *Saber*. 7: 7-14 pp.
- DE SOUSA L., BÓNOLI S., QUIROGA M., PARRILLA P. 1996. Scorpion sting epidemiology in Montes, Municipality of the State of Sucre, Venezuela: geographic distribution. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*. 38(2): 147-152 pp.
- DE SOUSA L., PARRILLA P., TILLERO L., VALDIVIEZO A., LEDEZMA E., JORQUERA A., QUIROGA M. 1997. Scorpion poisoning in the Acosta and Caripe counties of Monagas State, Venezuela. Part I: characterization of some epidemiological aspects. *Cad. Saúde Públ.* 13: 45-51 pp.
- DE SOUSA L., BÓNOLI S., PARRILLA-ÁLVAREZ P., LEDEZMA E., JORQUERA A., QUIROGA M. 1999. The proposal of a new endemic macroregion for scorpionism in Venezuela. *J. Venom. Anim. Toxins*. 5: 111 pp.
- DE SOUSA L., PARRILLA-ÁLVAREZ P., QUIROGA M. 2000. An epidemiological review of scorpion stings in Venezuela. The northeastern region. Review article. *J. Venom. Anim. Toxins*. 6: 127-165 pp.
- DE SOUSA L., VÁSQUEZ D., SALAZAR D., VALECILLOS R., VÁSQUEZ D., ROJAS M., PARRILLA-ÁLVAREZ P., QUIROGA M. 2005. Mortalidad en humanos por envenenamientos causados por invertebrados y vertebrados en el estado Monagas, Venezuela. *Invest. Clin.* 46: 241-254 pp.
- DE SOUSA L., MANZANILLA J., PARRILLA-ÁLVAREZ P. 2006. Nueva especie de *Tityus* (Scorpiones: Buthidae) del Turimiquire, Venezuela. *Rev. Biol. Trop. (Int. J. Trop. Biol.)* 54: 489-504 pp.
- DE SOUSA L., BOADAS J., KIRIAKOS D., BORGES A., BOADAS J., MARCANO J., TURKALI I., DE LOS RIOS M. 2007. Scorpionism due to *Tityus neoespartanus* (Scorpiones, Buthidae) in Margarita Island, northeastern Venezuela. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 40: 681-685 pp.
- DE SOUSA L., BORGES A., MANZANILLA J., BIONDI I., AVELLANEDA E. 2008. Second record of *Tityus bahiensis* (Scorpiones, Buthidae) from Venezuela: Epidemiological implications. *J. Venom. Anim. Toxins incl. Trop. Dis.* 14: 170-177 pp.
- DIXON WJ., MOOD AM. 1948. A method for obtaining and analyzing sensitivity data. *J. Am. Statist. Ass.* 43: 109-126 pp.
- FEBRES JF. 1991. Determinación de la DL₅₀ del veneno de *Tityus caripitensis* en ratones albinos. Modificación de la DL₅₀ de los venenos de *Rhopalurus laticauda* y *Tityus caripitensis* por el suero hiperinmune específico obtenido de conejo. Ciudad Bolívar: Universidad de Oriente, Escuela de Medicina, [Disertación-Grado Médico Cirujano], 47 pp.
- FINNNEY DJ. Probit Analysis. In: *Statistical Methods in Biological Assays* (Finney DJ. Ed.). London, Charles Griffin & Co. 1952; 513-553 pp.
- LEIPOLD E., HANSEL A., BORGES A., HEINEMANN SH. 2006. Subtype specificity of scorpion β -toxin Tz1 interaction with voltage-gated sodium channels is determined by the pore loop of domain-3. *Mol. Pharmacol.* 70: 340-347 pp.
- LICHTFIELD JT., WILCOXON F. 1949. A simple method for evaluating dose-effect experiments. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 96: 99-113 pp.
- MAZZEI-DÁVILA CA., PARRA M., FUENMAYOR A., SALGAR N., GONZÁLEZ Z. DÁVILA DF. 1997. Scorpion envenomation in Merida, Venezuela. *Toxicon*. 35: 1459-1462 pp.
- MAZZEI-DÁVILA CA., DÁVILA DF., DONIS J., ARATA-BELLABARBA G., VILLARREAL V., BARBOZA L. 2002. Sympathetic nervous system activation, antivenin administration and cardiovascular manifestations of scorpion envenomation. *Toxicon*. 40: 1339-1346 pp.

- MEIER J., THEAKSTON R. 1986. Aproximate LD₅₀ determinations of snake venoms using eight to ten experimental animals. *Toxicon*. 24: 395-401 pp.
- MOLINENGO L. 1979. The curve doses vs survival time in the evaluation of acute toxicity. *J. Pharm. Pharmacol.* 31: 343-344 pp.
- NISHIKAWA AK., CARICATI CP., LIMA ML., DOS SANTOS MC., KIPNIS TL., VON EICKSTEDT VRD., KNYSAK I., DA SILVA MH., HIGASHI HG., DÍAS DA SILVA W. 1994. Antigenic cross-reactivity among the venoms from several species of Brazilian scorpions. *Toxicon*. 32: 989-998 pp.
- ORTIZ N. 1985. Actividad biológica del veneno de escorpión (*Rhopalurus laticauda*) en ratones. Determinación de la dosis letal cincuenta (DL₅₀). Ciudad Bolívar: Universidad de Oriente, Escuela de Medicina, [Disertación-Grado Médico Cirujano], 55 pp.
- OTERO R., URIBE FL., SIERRA A. 1998. Envenenamiento escorpiónico en niños. *Actual. Pediatr. FSF*. 8: 88-92 pp.
- OTERO R., NAVIO E., CÉSPEDES FA., NÚÑEZ MJ., LOZANO L., MOSCOSO ER., MATAALLANA C., ARSUZA NB., GARCÍA J., FERNÁNDEZ D., RODAS JH., RODRÍGUEZ OJ., ZULETA JE., GÓMEZ JP., SILDARRIAGA M., QUINTANA JC., NÚÑEZ V., CÁRDENAS S., BARONA J., VALDERRAMA R., PAZ N., DÍAZ A., RODRÍGUEZ OL., MARTÍNEZ MD., MATURANA R., BELTRÁN LE., MESA MB., PANIAGUA J., FLÓREZ E., LOURENÇO WR. 2004. Scorpion envenoming in two regions of Colombia: clinical, epidemiological and therapeutic aspects. *Tran. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 98: 742-750 pp.
- PARRILLA-ÁLVAREZ P. 1999. Caracterización inmunológica parcial del veneno y toxoide de escorpiones venezolanos del género *Tityus*. Caracas: Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas, Centro de Estudios Avanzados, [Disertación-Magister Scientiarum], 131 pp.
- PARRILLA-ÁLVAREZ P., CERMEÑO J., QUIROGA M. 1992. Actividad biológica del veneno de escorpión (Buthidae) *Tityus caripitensis* macho. Parte II. Determinación de la DL₅₀ en ratones. Boletín VIII Jornadas Científicas, Tecnológicas y Educativas de Guayana. 33 pp.
- POSSANI LD., FLETCHER JR P., ALAGÓN AB., ALAGÓN AC., JULIÁ J. 1980. Purification and characterization of a mammalian toxin from venom of the Mexican scorpion *Centruroides limpidus tecomanus* Hoffmann. *Toxicon*. 18: 175-183 pp.
- QUIROGA M., GONZÁLEZ A., ILLANES A., JARAMILLO E. 1982. Mantención de escorpiones en el laboratorio, orden Scorpionida, Buthidae, *Rhopalurus laticauda*. Influencia de la alimentación. *Acta Cien. Venez.* 33: 502-508 pp.
- QUIROGA M., DE SOUSA L., PARRILLA-ÁLVAREZ P., MANZANILLA J. 2004. The first report of *Tityus* (Scorpiones: Buthidae) in Anzoátegui State, Venezuela. A new species. *J. Venom. Anim. Toxins incl. Trop. Dis.* 10: 10-33 pp.
- REED LJ., MUENCH H. 1938. A simple method of estimating percent end points. *Am. J. Hyg.* 27: 493-497 pp.
- ROJAS-RUNJAIC FJ., DE SOUSA L. 2007. Catálogo de los escorpiones de Venezuela (Arachnida: Scorpiones). *Bol. SEA*. 40: 281-307 pp.
- ROSS ME. 1996. Pharmacodynamics. Mechanisms of drug action and the relationship between drug concentration and effect. In: Hardman JG., Limbird LE., Molinoff PB., Ruddon RW., Goodman-Gilman A. (Ed). *Goodman and Gilman, the pharmacological basis of therapeutics*. Ninth Edition. New York: McGraw-Hill, 29-41 pp.
- SILDARRIAGA MA., OTERO R. 2000. Los escorpiones: aspectos ecológicos, biológicos y toxicológicos. *Med. UNAB*. 3: 17-23 pp.
- SAMPAIO SV., LAURE CJ., GIGLIO JR. 1983. Isolation and characterization of toxic proteins from the venom of the Brazilian scorpion *Tityus serrulatus*. *Toxicon*. 21: 265-277 pp.
- SEVCIK C. 1987. LD₅₀ determination: objections to the method of Beccari as modified by Molinengo. *Toxicon*. 25: 779-783 pp.
- SOFER S., GUERON M., WHITE RM., LIFSHITZ M., APTE NN. 1996. Interleukin-6 release following scorpion sting in children. *Toxicon* 34: 389-392 pp.
- TSUSHIMA RG., BORGES A., BACKX PH. 1999. Inactivated state dependence of sodium channel modulation by b-scorpion toxin. *Pflügers Arch.* 437: 661-668 pp.
- VORONOV E., APTE RN., SOFER S. 1999. The systemic inflammatory response syndrome related to the release of cytokines following severe envenomation. *J. Venom. Anim. Toxins*. 5: 5-3 pp.