

Cambios en aminoácidos luego de administración intraperitoneal de veneno del escorpión *Tityus zulianus* en ratones. Estudio con microdiálisis subcutánea y electroforesis capilar

Ximena Páez¹, Carmen Amalia Mazzei-Dávila², Belkis Quiñonez³, Gina D'Suze⁴ y Luis Hernández¹.

¹Laboratorio de Fisiología de la Conducta, ²Departamento de Pediatría, Facultad de Medicina, ³Departamento de Farmacología, Facultad de Odontología, Universidad de los Andes, Mérida. ⁴Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC), Caracas, Venezuela.

Palabras clave: Ratones, cromatografía electrocinética micelar, arginina, fenilalanina, alanina, glutamato, aminoácidos neutros, escorpiotoxinas.

Resumen. El envenenamiento por escorpiones es un problema de salud pública en la zona suroccidental de Venezuela. El *Tityus zulianus* es uno de los escorpiones que causa, especialmente en niños, edema pulmonar e insuficiencia cardíaca que pueden ser fatales y que se han atribuido en parte a una gran descarga simpática. La administración intraperitoneal de (20 µg/g peso) de veneno del *T. zulianus* a ratones anestesiados durante microdiálisis subcutánea provocó aumento de secreciones, dificultad respiratoria, convulsiones y muerte entre 30 min a 2 h. En los dializados recolectados antes y después de recibir el veneno, se analizaron 7 aminoácidos por electroforesis capilar con detección mediante fluorescencia inducida por láser (EC-DFIL). Se encontró un aumento en arginina (39%), fenilalanina (40%) y glutamato (94%), sin cambios en valina, serina y aspartato, en los animales que recibieron veneno con respecto a sus valores pretratamiento. Estos cambios porcentuales fueron significativos al comparar veneno vs. vehículo después de la inyección; y antes vs. después de recibir el veneno. Para este momento no hay una explicación clara del significado de estos aumentos de aminoácidos específicos. Se requieren nuevos estudios para conocer si estos cambios bioquímicos tienen o no una relación con los mecanismos de acción molecular del veneno o algunos de sus componentes y/o con las manifestaciones clíni-

cas. De acuerdo con la literatura revisada, este es el primer reporte de la combinación de microdiálisis subcutánea y EC-DFIL en el estudio *in vivo* del emponzoñamiento por escorpiones en ratones.

Changes in amino acids after intraperitoneal administration of *Tityus zulianus* venom in mice. Study with subcutaneous microdialysis and capillary electrophoresis

Invest Clin 2003; 44(4): 291 - 302

Key words: Mice, micellar electrokinetic chromatography, arginine, phenylalanine, alanine, glutamate, neutral amino acids, scorpionotoxins.

Abstract. Scorpion human envenoming is a public health hazard in the southwest of Venezuela. *Tityus zulianus* is one of the scorpion species whose venom causes lung edema and cardiac failure in children. These occasionally deadly manifestations have been attributed to a massive sympathetic discharge. The intraperitoneal administration of *T. zulianus* venom (20 µg/g mouse) to anesthetized mice during subcutaneous microdialysis caused increased secretions, dyspnea, seizures and death between 30 min to 2 h. Seven amino acids were analyzed by capillary electrophoresis with laser induced fluorescence detection (CE-LIFD) in the collected samples before and after the venom administration. We found an increase of arginine (39%), phenylalanine (40%) and glutamate (94%), with no changes in valine, serine and aspartate, changes were significant when the injection of venom and vehicle were compared and before vs after venom injection. Further investigation is needed to know if the observed changes could be related to the molecular mechanisms of the venom or some of its components and therefore with the envenoming symptoms. To our knowledge, this is the first report with subcutaneous microdialysis and CE-LIFD coupling in scorpion envenomation studies *in vivo*, in mice.

Recibido: 14-10-2002. Aceptado: 05-06-2003.

INTRODUCCIÓN

El emponzoñamiento con escorpiones es frecuente en Venezuela sobre todo en la zona centrooccidental (1). Uno de los escorpiones que causa patología aguda, ocasionalmente letal en niños, es el *Tityus zulianus* (2, 3). Las manifestaciones clínicas se caracterizan fundamentalmente por síntomas de descarga simpática con edema pulmonar agudo e insuficiencia cardíaca

que puede llevar a la muerte en pocas horas si el paciente no recibe rápidamente el anti-veneno. También han sido descritos signos de descarga parasimpática y signos neurológicos, pero estos son de baja frecuencia y poca significación clínica (4-6). Para algunos, el aumento de catecolaminas descrito en ratas explicaría las alteraciones cardiovasculares y hemodinámicas (7), mientras que para otros hay también efectos directos del veneno sobre el miocardio (8). Se han

reportado cambios ultraestructurales en pulmón y miocardio por veneno de escorpiones del género *Tityus* (9, 10) pero no está claro si el efecto del veneno es directo o a través de mediadores, como factores de inflamación que también podrían explicar la clínica (11, 12).

Los venenos de escorpiones son una mezcla de muchos, a veces cientos, de péptidos activos que sirven para inmovilizar a la presa. Estos polipéptidos afectan la conductancia iónica en membranas excitables neuronales y musculares por actuar sobre sitios específicos en proteínas canales, particularmente de sodio y potasio pero también de cloro y calcio (13-19). Estos cambios de flujo iónico en diferentes órganos pueden ser responsables moleculares de desencadenar cascadas de eventos que explicarían las manifestaciones clínicas cardiovasculares y neurológicas vistas en estos emponzoñamientos. Las diferencias en la clínica, hallazgos anatomopatológicos y alteraciones en conductancia iónica observadas en emponzoñamientos por escorpiones obedecen probablemente a las diferencias en la composición de los venenos que tienen variadas combinaciones de toxinas con distintos mecanismos de acción molecular por lo que, desde el punto de vista clínico, tiene interés estudiar los venenos de escorpiones del área geográfica de donde proceden los pacientes. Actualmente, están en progreso muchos estudios para determinar la composición de los venenos de diferentes especies de escorpiones y caracterizar sus péptidos y sus posibles mecanismos de acción. Los estudios existentes son sobre todo del veneno del escorpión brasileño amarillo *Tityus serrulatus* (16), pero no hay del *Tityus zulianus*. Conocer los cambios bioquímicos en el medio extracelular que ocurren junto o preceden a las diversas manifestaciones clínicas del envenenamiento, podría dar claves para entender los cambios moleculares que ocasionan las di-

ferentes toxinas del veneno y, por tanto, podría dar pautas para la prevención y tratamiento de las complicaciones. Es interesante investigar si los cambios se deben a aminoácidos que están en el veneno, o si por el contrario ocurren liberaciones neuronales de ellos, o cambios en la composición extracelular en respuesta al veneno, lo que pudiera tener que ver con las manifestaciones clínicas.

Un modo de analizar el ambiente interno bioquímico es mediante la microdiálisis, una técnica que, sin extraer sangre u otros fluidos, permite obtener un ultrafiltrado del medio extracelular del tejido donde se realiza la diálisis (20-22). En el presente trabajo, estudiamos cambios simultáneos en algunos aminoácidos luego de la administración intraperitoneal de veneno de *Tityus zulianus* en ratones anestesiados mediante microdiálisis subcutánea combinada con electroforesis capilar con detección mediante fluorescencia inducida por láser (EC-DFIL) (23-25).

MATERIALES Y MÉTODOS

Animales

Doce ratones albinos de la línea NMIR, machos adultos de peso entre 15 y 20 g fueron alojados con agua y comida *ad libitum* y mantenidos juntos, a temperatura entre 22-24°C y con ciclos de luz /oscuridad de 12 horas cada uno.

Veneno

Se usó veneno de escorpiones de la zona suroeste del Estado Mérida, Venezuela, identificados como *Tityus zulianus* (2, 3). El veneno se obtuvo por estimulación eléctrica de la parte media de la cola del animal, y luego de cuantificar su contenido de proteínas (Sprectronic Genesys TM2 a 280 nm), se liofilizó y guardó a -70°C (27). El veneno reconstituido en NaCl 0,9% fue administrado por vía intraperitoneal (ip) a

6 ratones a razón de 20 µg/g de peso (la mitad de la LD50 estimada en otro estudio no publicado). Los controles recibieron el mismo volumen del vehículo por peso de ratón.

Microdiálisis subcutánea

Cánula de microdiálisis: un trozo de 15 mm de tubo de celulosa con poros que permiten la difusión de moléculas cuyo peso es inferior a 13.000 Da, fue insertado entre dos segmentos de 2 cm de tubo de acero inoxidable 26 ga. Las uniones se pegan con cemento *epoxy*. Uno de los extremos libres del tubo de acero termina en bisel lo cual permite la punción de la piel para implantar el segmento de diálisis dentro del tejido celular subcutáneo. Por este extremo se recoge el líquido dializado y por el otro entra la solución de perfusión (26). La parte funcional de la cánula (celulosa), donde tendrá lugar la diálisis, queda inmersa en el tejido celular subcutáneo.

Los ratones fueron anestesiados previamente con una solución de clorhidrato de ketamina 50mg/mL (2,5 µg/50µL/ratón) ip. La cánula de microdiálisis conectada a una bomba (WPI sp100i) se perfundió con NaCl 0,9% a un flujo de 1 µL/min. En condiciones de asepsia se perforó la piel del abdomen con el extremo biselado de la cánula entrando al tejido celular subcutáneo, para salir a 15 mm de distancia perforando nuevamente la pared abdominal, de tal manera que la parte funcional de la cánula, donde tiene lugar el intercambio de moléculas entre el interior de la misma y el medio extracelular quedó colocada en el tejido celular subcutáneo. Los primeros 30 min de recolección se eliminaron y luego se recogieron muestras de 30 min. de diálisis. Al terminar la primera muestra se inyectó cada ratón con veneno o vehículo y luego se tomó la muestra post-inyección. Las muestras se conservaron en congelación a -70° C hasta ser procesadas.

Análisis de aminoácidos mediante EC-DFIL

Las muestras fueron tratadas previamente con el objeto de hacerlas fluorescentes para que los analitos pudieran ser detectados por el láser. Para tales efectos, se hizo una dilución 1:1 (v/v) de las muestras o soluciones estándar de aminoácidos 10^{-5} M con una mezcla 1:1 de solución $6,4 \times 10^{-3}$ M del colorante fluorescente isotiocianato de fluoresceína (FITC) más fluoresceína $7,5 \times 10^{-5}$ M como estándar interno con solución 20 mM de carbonato buffer a pH 9. Luego de agitar las muestras se incubaron por 24-48 horas en la oscuridad, a temperatura ambiente.

El equipo de EC diseñado y construido en el Laboratorio de Fisiología de la Conducta de la Universidad de los Andes (Modelo R2D2, Meridialysis CZE System Mérida, Venezuela) utiliza un láser de ion argón (Ion Laser Technology, Salt Lake City, UT USA) ajustado a 488 nm. Una fibra óptica lleva el rayo láser a un espejo dicróico centrado a 510 nm (Omega Optics, Brattelboro, VT, US). El láser se enfoca en la ventana de un capilar de sílica fundida (Polymicrotechnologies, Phoenix, AZ, USA) por medio de un objetivo cuya apertura numérica es de 0,75. La ventana del capilar se hace eliminando la cubierta de poliimida a 38 cm del extremo anódico de un capilar de sílica fundida de 50 cm de largo con diámetro externo de 346 µm e interno de 27 µm. La fluorescencia es recogida a través de un objetivo y enfocada sobre un tubo fotomultiplicador R120-05 multialkali (Hamamatsu, Bridgewater, NJ, USA). La muestra es cargada en el extremo anódico, aplicando una presión negativa (19 psi por 1 seg) en el extremo catódico del capilar. El volumen real inyectado fue de aproximadamente 1 nanolitro (10^{-9} L). Para la separación de los aminoácidos cargados, glutamato (Glu) y aspartato (Asp), se usó una solución *buffer* de carbonato 20 mM a pH 9.5 y la separación

electroforética se hizo aplicando 20 KV entre el ánodo y cátodo. Para la separación de los aminoácidos neutros y del aminoácido positivo arginina (Arg) (cromatografía micelar electrocinética) (24, 28) se usó una solución *buffer* de borato 23 mM a la que se añadió el detergente lauril sulfato de sodio 120 mM a pH 9 y se aplicaron 26 KV entre el ánodo y el cátodo. La identificación de los aminoácidos se hizo con soluciones estándar de cada aminoácido agregadas a la muestra. Entre corridas de muestras el capilar fue lavado con NaOH 0,1 M, luego con agua filtrada deionizada por 1 min con cada una de las soluciones y luego con *buffer* de corrida durante 3 min. Los reservorios de solución *buffer* en los extremos del capilar también se lavaron entre corridas con nueva solución *buffer* para evitar contaminación y obstrucción del capilar.

Análisis estadístico

Los valores de fluorescencia de cada aminoácido fueron corregidos por el estándar interno en las muestras. Se usó el test de "t" de Student para comparación de esos valores en la muestra pre-inyección (30 min a 0 min) vs la muestra post-inyección (0 min a 30 min), tanto en animales tratados con el veneno como en los controles, y así como entre los controles vs veneno antes y después de la inyección. Este análisis se hizo individualmente para cada aminoácido. Se calcularon también para cada aminoácido los cambios porcentuales con referencia los valores pretratamiento, y luego se hicieron comparaciones entre el grupo control (vehículo) y el grupo experimental (veneno). Se estableció el límite de significación estadística en $p < 0,05$.

Microdiálisis *in vitro* del veneno del *Tityus zulianus*

Se realizó con una cánula construida igual que las usadas en los ratones. El segmento de tubo de celulosa de 15 mm dobla-

do en asa quedó inmerso en un microvial con la solución de veneno (4,5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) usada para inyectar a los animales. El resto del procedimiento es igual al descrito anteriormente para la diálisis y para el tratamiento de las muestras. Estas se analizaron en las mismas condiciones de EC-DFIL.

RESULTADOS

Durante la microdiálisis subcutánea, los ratones anestesiados luego de la inyección de veneno, mostraron manifestaciones clínicas de severidad variable: piloerección y sudoración (piel mojada), aumentos de frecuencia de micciones y evacuaciones, aumento muy notorio de secreciones orofaríngeas (moco, saliva), secreción uretral, dificultad respiratoria progresiva hasta ser muy intensa; en algunos casos la clínica recordaba a un edema agudo pulmonar con abundante secreción espumosa por la boca unida a un extremo esfuerzo inspiratorio. Todos los animales presentaron convulsiones tónico clónicas casi inmediatamente después de la administración del veneno. En todos los animales se logró obtener, al menos un dializado después de la inyección de veneno. La muerte ocurrió entre 30 min y 2 h después de recibir el veneno.

En los dializados analizados con EC-DFIL, se encontraron patrones típicos de aminoácidos obtenidos con las dos soluciones de corrida. La solución 23 mM de borato más detergente, que forma micelas para lograr la separación de aminoácidos neutros o apolares, permite una buena separación e identificación de los aminoácidos arginina (Arg), isoleucina (Ile), valina (Val), fenilalanina (Phe), treonina (Thr), GABA, serina (Ser), alanina (Ala) y GABA (Fig. 1). La solución 20 mM de carbonato permite la separación e identificación de los aminoácidos cargados Glutamato (Glu) y Aspartato (Asp) (Fig. 2). La Figura 3 muestra los cambios en aminoácidos específicos después de la in-

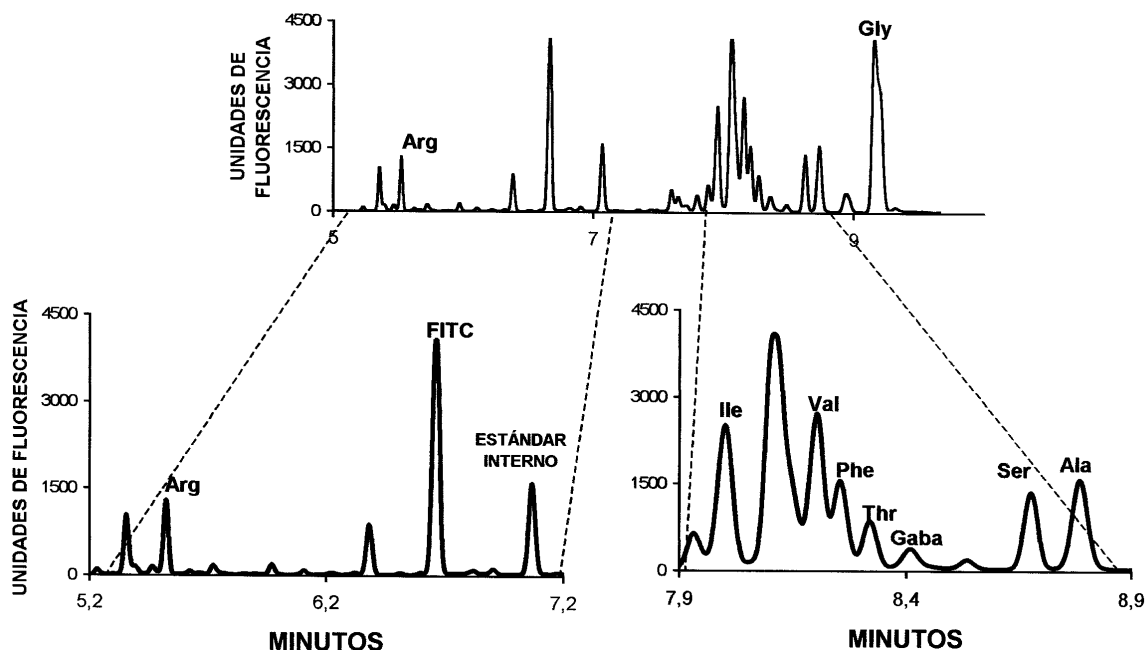


Fig. 1. Electroferograma completo y magnificación de un segmento de un minuto que muestra los aminoácidos Arg, Ile, Val, Phe, Thr, Gaba, Ser, Ala separados mediante cromatografía electrocinética micelar con solución de corrida borato 23mM con lauril sulfato 120mM.

yección ip. de veneno en un ratón. Los promedios de los valores de fluorescencia corregidos de los aminoácidos Arg (1125 ± 127 vs 943 ± 93), Phe (948 ± 109 vs 890 ± 70), Ala (1116 ± 82 vs 1251 ± 51), Glu ($113 \pm 10,3$ vs $94 \pm 4,9$), Val (1294 ± 111 vs 1418 ± 82), Ser (857 ± 47 vs 882 ± 11) y Asp (81 ± 13 vs 69 ± 9) en los animales que recibieron vehículo ($n=5$) no mostraron ningún cambio significativo luego de la inyección con respecto a sus valores pretratamiento. Mientras que en los animales que recibieron veneno ($n=7$) hubo aumentos significativos ($p < 0,05$) de Arg (981 ± 39 vs 1334 ± 48), Phe (902 ± 32 vs 1248 ± 46), Ala (1186 ± 38 vs 1495 ± 49) y Glu (107 ± 7 vs 204 ± 17) con respecto a sus valores preinyección.

Al convertir los valores absolutos a cambios porcentuales con respecto a los valores pretratamiento se hizo más evidente el aumento de Glu luego del veneno con respecto a los otros cambios (Fig. 4). Des-

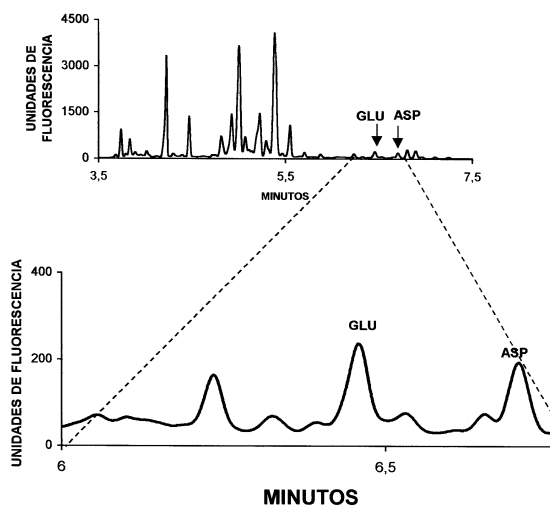


Fig. 2. Electroferograma completo y magnificación de un segmento de un minuto que muestra los aminoácidos Glu y Asp separados mediante EC-DFIL con solución de corrida carbonato 20 mM.

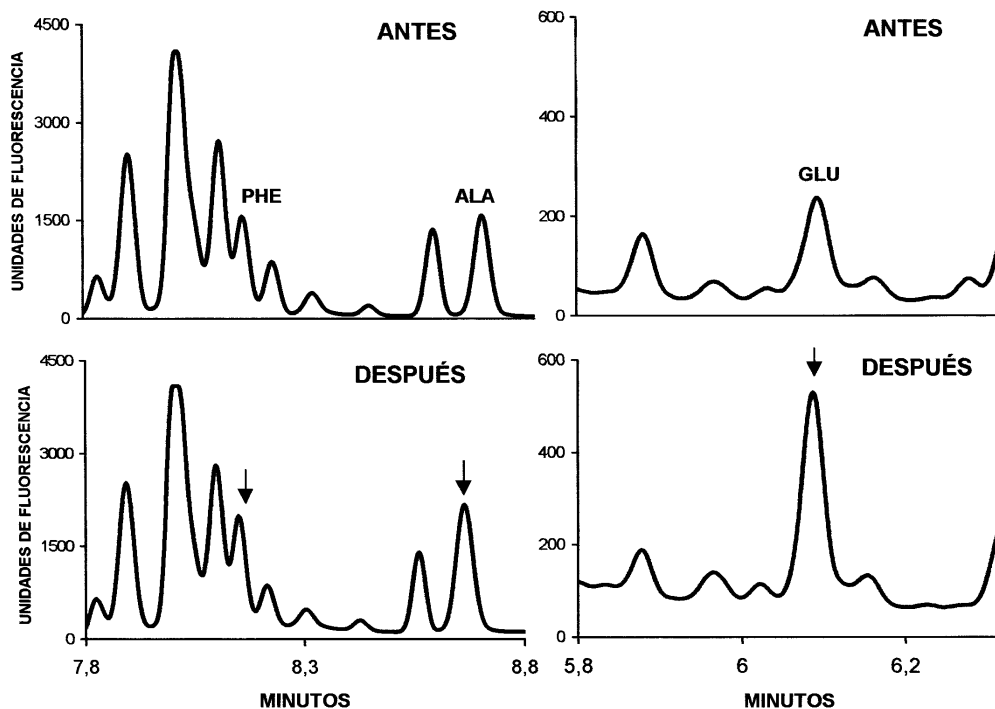


Fig. 3. Magnificación de segmentos de electroferogramas de dializados subcutáneos de ratón. **Arriba**, antes de la administración ip de veneno del escorpión *Tityus zulianus*. **Abajo**, después del veneno. A la izq.: separación con solución de corrida de borato 23mM con lauril sulfato 120mM. Se observa aumento discreto en Phe y Ala luego del veneno. A la der.: separación con solución de corrida de carbonato 20 mM. Se observa un notorio aumento del Glu después de la administración ip. del veneno.

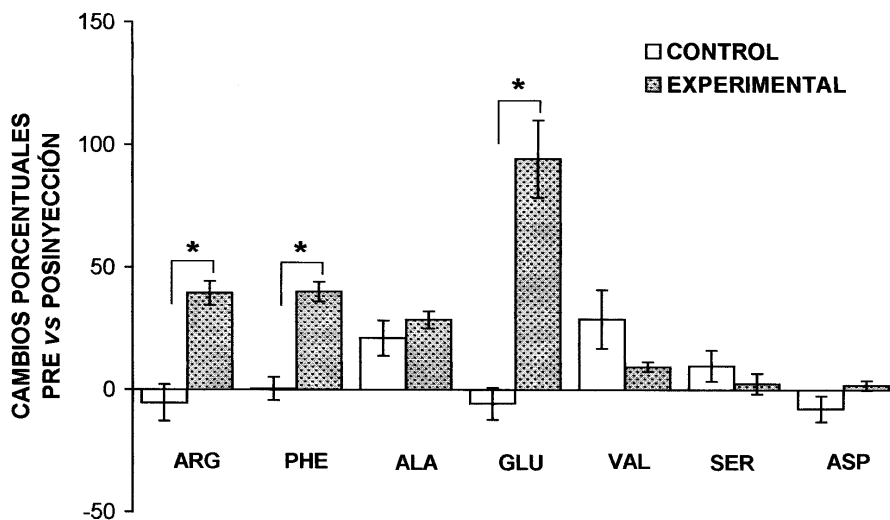


Fig. 4. Cambios porcentuales (promedios \pm errores estándar) postratamiento con respecto a los valores pretratamiento en los 7 aminoácidos analizadas con EC-DFIL en dializados subcutáneos de ratones. Arg, Phe, y Glu aumentaron significativamente en el grupo que recibió veneno, el resto de aminoácidos no cambió. * $p < 0.05$.

pués de la administración del veneno, hubo aumentos porcentuales en todos los aminoácidos estudiados, pero estas variaciones sólo fueron significativas en Arg, Phe y Glu al compararlos con los cambios después de la administración del vehículo. El discreto aumento de Ala observado en los valores absolutos después de la administración del veneno no fue significativo al comparar los cambios porcentuales entre el grupo control y el experimental.

El análisis con EC-DFIL del dializado del veneno (DV) del *T. zulianus* muestra que hay aminoácidos libres (Fig. 5). Con la solución 23 mM de borato se pueden identificar los mismos aminoácidos que en el dializado subcutáneo (DSC) pero con un patrón diferente en los electroferogramas, por ejemplo, proporcionalmente hay más Phe que Val (veneno Phe/Val: 2,52 vs ratón

0,71); y más Ser que Ala (veneno Ser/Ala: 1,67 vs ratón 0,66). Con la solución 20 mM de carbonato también se mostró que en el DV hay más Glu y Asp que en el DSC, pero su proporción es igual (veneno Glu/Asp 1,68 vs ratón 1,63). La comparación de los promedios porcentuales de los aminoácidos de DV vs DSC sin veneno (analizados en las mismas condiciones) mostró que en el veneno hay menos Arg (8%), Val (46%) y Ala (35%); pero más Phe (92%), Ser (63%), Glu (129%) y Asp (137%) que en los DSC.

DISCUSIÓN

Los animales inyectados con el veneno del escorpión *Tityus zulianus*, a pesar de estar anestesiados, mostraron manifestaciones clínicas que semejaron el curso del emponzoñamiento agudo por el mismo escor-

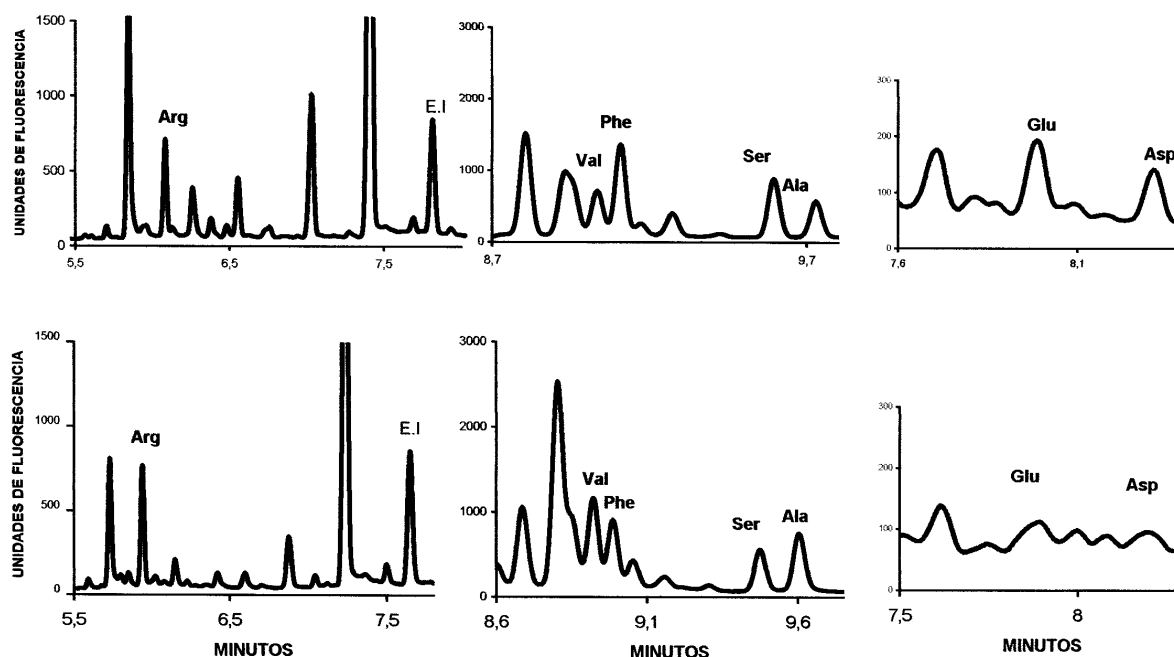


Fig. 5. Comparación de electroferogramas de dializados de veneno y dializados subcutáneos de ratón. **Arriba:** Segmentos magnificados de electroferogramas que muestran la separación de aminoácidos en un dializado *in vitro* del veneno de *Tityus zulianus*. **Abajo:** los mismos segmentos en un dializado subcutáneo de ratón. Los dos segmentos a la izquierda corridos con solución 23mM de borato más detergente, y el de la derecha con solución 20 mM de carbonato. Se aprecia las diferencias y similitudes en ambos tipos de dializados.

pión reportado en niños de la zona suroccidental de Venezuela; es decir, signos de descarga autonómica inicialmente colinérgica y luego una prominente descarga simpática (6), con severa insuficiencia respiratoria y cardíaca, que en los pacientes, con frecuencia, llevan a una muerte en pocas horas si no reciben rápidamente la antivenina (1). En los niños del estudio de Mazzei y col. (1), sin embargo, no hubo manifestaciones neurológicas prominentes como las convulsiones tónico-clónicas que presentaron los ratones. La dosis de veneno de 20 µg/g de ratón usada permitió hacer la diálisis en todos los animales con la obtención de al menos una muestra completa de 30 min. Esta dosis causó la muerte de todos los ratones entre 30 min. y 2 h después de su administración.

El uso de EC-DFIL permitió detectar cambios importantes en algunos aminoácidos extraídos del tejido celular subcutáneo abdominal en los primeros 30 min del envenenamiento. Hubo aumentos significativos en los aminoácidos Arg (39%), Phe (40%) y Glu (94%). No encontramos en la literatura revisada ningún reporte sobre cambios en aminoácidos en el espacio extracelular en la periferia inducidos por venenos de escorpiones.

El análisis descriptivo con EC-DFIL del DV obtenido *in vitro* mostró la presencia de los aminoácidos libres estudiados en los DSC, aunque con un patrón diferente. Los aumentos de aminoácidos observados no parecen deberse a que dichos aminoácidos estaban contenidos en el veneno. Si bien es cierto que el experimento *in vitro* reveló la presencia de aminoácidos en el veneno, los niveles de Phe, Ser, Glu y Asp fueron mayores que en los DSC, mientras que fueron menores para Arg, Val y Ala. Si los cambios de los aminoácidos de los DSC se debieran al aporte del veneno, deberían haber seguido la proporción que tenían los aminoácidos en el veneno y ese no fue el resultado

obtenido. Así por ejemplo, la Arg aumentó luego de la administración del veneno, sin embargo, ella está menos concentrada en el veneno; y por el contrario, la Ser que está más concentrada en el veneno no aumentó luego de la administración del mismo. Más aun, los aminoácidos contenidos en el veneno fueron inyectados en ratones cuyo volumen de agua corporal total es de unos 12 mL (aproximadamente el 60% del peso corporal). Como el volumen de veneno inyectado (unos 100 µl) representa un 0,8% del volumen de agua corporal total, los aminoácidos aportados por el veneno han debido diluirse 120 veces. En resumen, además de que las concentraciones porcentuales de los aminoácidos estudiados en el DV no se corresponden con los cambios en DSC luego de la administración del veneno, el análisis del aporte de aminoácidos por la administración del veneno indica que es de no más de 1% del contenido de aminoácidos en el líquido extracelular. Esto descartaría la influencia del contenido de aminoácidos en el veneno en los cambios observados después de la administración ip del veneno.

Los hallazgos significativos encontrados en algunos de los aminoácidos analizados en las muestras 30 min post-veneno no pueden ser fácilmente atribuidos a una acción particular del veneno, pero pudieran estar en relación con los mecanismos de acción descritos de las escorpiotoxinas sobre la conductancia iónica de Na⁺, K⁺, Cl⁻ y Ca⁺⁺, que lleven a cambios en la neurotransmisión química. Llama la atención que el mayor aumento porcentual ocurrió con Glu, lo que pudiera tener relación con los cambios moleculares en conductancia de sodio y calcio que lleva a modulación de la liberación de Glu por alguna de las toxinas presentes en el veneno. Desde los estudios de Coutinho y col. en los 80 (29) que reportan la acción estimuladora de toxinas de los escorpiones amarillos del Brasil (*T. serrulatus*) sobre la liberación de neurotransmisio-

res como el Glu, en estudios *in vivo* e *in vitro* en corteza cerebral de ratas, se ha avanzado en el estudio de los posibles mecanismos de acción de toxinas de este veneno sobre la liberación neuronal de Glu. La tityustoxina causa una rápida entrada del calcio y de sodio a la neurona que preceden a la liberación central de Glu (30, 31). Recientemente, usando microdiálisis cerebral se reporta aumento de Glu en hipocampo de ratas luego de inyección local de la misma toxina; las descargas epileptiformes inducidas por la toxina fueron bloqueadas por antagonistas de receptores glutamatérgicos (32).

Aunque del veneno del *T. serrulatus* se han aislado dos fracciones activas en las que se han identificado toxinas que actúan sobre canales de sodio voltaje dependientes y canales de potasio, además de que se han podido medir más de 380 compuestos diferentes en las dos fracciones (16). Sin embargo, del veneno del *T. zulianus* no hay todavía reportes sobre su composición, por tanto no hay toxinas aisladas. Ya que en los presentes experimentos se usó el veneno completo, mezcla de muchas proteínas y péptidos que pueden tener diferentes mecanismos de acción a nivel molecular sobre la conductancia iónica, es de suponer también que ocurran cambios en la liberación neuronal de transmisores que pudieran ser responsables de los diferentes signos y síntomas del emponzoñamiento escorpiónico. Los aumentos encontrados en algunos aminoácidos, especialmente el Glu, pudieran corresponder a una liberación de aminoácidos posiblemente neuronal como ya se ha reportado en el sistema nervioso central (32), aunque el presente estudio no estuvo dirigido a examinar esto. Por ahora, sólo podemos decir que estos cambios ocurrieron en asociación con la administración del veneno y muy probablemente no debidos al aporte de aminoácidos contenidos en el veneno.

Se debe continuar la investigación sobre los efectos bioquímicos del veneno del *Tityus zulianus*, de sus fracciones activas, caracterización de los péptidos y su comparación con venenos de otros escorpiones. Mientras, conocer los cambios en el medio interno, ocasionados por los venenos y sus múltiples componentes activos responsables de la patología muchas veces fatal, podría ayudar a hacer intervenciones terapéuticas racionales.

Fue interesante encontrar que el patrón de los aminoácidos analizados con microdiálisis subcutánea acoplada a EC-DFIL fue semejante al obtenido con la misma combinación de técnicas pero en otro espacio extracelular y otra especie: el plasma humano (24, 28). Esto sugiere que el muestreo del ambiente bioquímico extracelular por diálisis subcutánea puede ser equivalente al del plasma al menos en los analitos estudiados, manteniendo en mente las diferencias de distribución de las sustancias que pueden existir entre estos diferentes compartimientos extracelulares, pero con algunas ventajas sobre la diálisis intravenosa (21). Esta requiere canular una vena, colocar un catéter y mantener permeable esta vía, lo cual es técnicamente difícil en animales muy pequeños como los ratones. La microdiálisis cutánea puede ser muy útil para medir otros parámetros bioquímicos y en tiempos mucho más cortos. La única limitación sería disponer de técnicas que permitan medir analitos en volúmenes muy pequeños en el rango de nanolitros, como es la EC-DFIL que se empleó en los experimentos del presente estudio. Esto permitiría tener una visión de lo que ocurre en el medio ambiente interno del animal como consecuencia inmediata de la acción de este veneno.

En conclusión, éste es el primer reporte usando microdiálisis subcutánea acoplada a la EC-DFIL en el estudio del emponzoñamiento con veneno de escorpión. Esta

combinación de técnicas resultó muy conveniente para medir cambios bioquímicos *in vivo* en ratones, después de la administración ip. del veneno del escorpión *Tityus zuliaanus*.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue posible gracias al financiamiento otorgado por el CONICIT proyecto # G 9700082. Agradecemos al personal del Laboratorio de Neurofarmacología Celular del Centro de Biofísica y Bioquímica del Instituto Venezolano de Investigación Científica (IVIC) por la obtención y procesamiento del veneno de *Tityus zuliaanus*.

REFERENCIAS

- Mazzei de Dávila CA, Fuenmayor A, Salgar N, Gonzalez Z, Dávila DF. Scorpion envenomation in Mérida, Venezuela. *Toxicon* 1997; 35: 1459-1462.
- Gonzalez-Sponga M. Guía para identificar escorpiones de Venezuela. Cuadernos Lagoven, Caracas, 1998.
- Mazzei de Dávila CA, Dávila DF, Gonzalez-Sponga M., Dávila-Mazzei DF, Ramoni-Perazi P. Identificación de especies de escorpiones capturadas en el estado Mérida. Tesis Colegio San Luis, Mérida, Venezuela. 1999.
- Gueron M, Illia R, Sofer S. The cardiovascular system after scorpion envenomation. A review. *J Toxicol Clin Toxicol* 1992; 30: 245-258.
- Amitai Y. Clinical manifestations and management of scorpion envenomation. *Public Health Rev* 1998; 26: 257-263.
- Mazzei-Dávila, Dávila DF, Donis JH, Arata-Bellabarba G, Villarreal V, Barboza JS. Sympathetic nervous system activation, antivenin administration and cardiovascular manifestations of scorpion envenomation. *Toxicon* 2002; 40: 1339-1346.
- Zhegal K, Sahnoun Z, Guinot M, Richer C, Giudicelli JF. Characterization and mechanisms of the cardiovascular and haemodynamic alterations induced by scorpion venom in rats. *Fundam Clin Pharmacol* 2000; 14: 351-361.
- Teixeira AL, Fontoura BF, Freire-Maia L, Machado CR, Camargos ER, Texeira M.M. Evidence for a direct action of *Tityus serrulatus* scorpion venom on the cardiac muscle. *Toxicon* 2001; 39: 703-709.
- Rodríguez -Acosta A, Strauss M, Pulido-Méndez M, Gonzalez L, Rodriguez C, Blanco M. An intent of correlating clinical manifestations and ultrastructural lung changes in mice inoculated with *Tityus discrepans* (Buthidae) venom. *J Submicrosc Cytol Pathol* 2001; 33: 343-348.
- Strauss M, Rodriguez-Acosta A, Pulido-Mendez M. Cardiac ultrastructural alterations in mice inoculated with *Tityus discrepans* (Buthidae) venom. *J Submicrosc Cytol Pathol* 2000; 32: 613-618.
- De Matos IM, Talvani A, Rocha OO, Freire-Maia L, Teixeira M.M. Evidence for a role of mast cells in the lung edema induced by *Tityus serrulatus* venom in rats. *Toxicom* 2001; 39: 863-867.
- Petricevich VL, Pena CF. The dynamics of cytokine and nitric oxide secretion in mice injected with *Tityus serrulatus* scorpion venom. *Mediators Inflamm.* 2002;11:173-180.
- Legros C, Martin-Euclaire MF. Scorpion toxins. *C R Seances Soc Biol Fil* 1997; 19: 345-380.
- Becerril B, Marangoni S, Possani LD. Toxins and genes isolated from scorpions of the genus *Tityus*. *Toxicon* 1997; 35: 821-835.
- Possani LD, Merino E, Corona M, Bolívar F, Becerril B. Peptides and genes coding for scorpion toxins that affect ion-channels. *Biochimie* 2000; 82: 861-868.
- Pimienta AM, Stocklin R, Favreau P, Bougis PE, Martin-Eauclaire M.F. Moving pieces in a proteomic puzzle: mass fingerprinting of toxic fractions from the venom of *Tityus serrulatus* (Scorpions, Buthidae). *Rapid Commun Mass Spectrom* 2001; 15: 1562-1572.
- Caterall W.A. Molecular mechanisms of gating and drug block of sodium channels. *Novartis Found Symp* 2002; 241: 206-218.

18. Batista CV, Zamudio FZ, Lucas S, Fox JW, Frau A, Prestipino G, Possani LD. Scorpion toxins from *Tityus cambridgei* that affect Na(+)-channels. *Toxicon* 2002; 40: 557-562.
19. Wang I, Wu SH, Chang HK, Shieh RC, Yu HM, Chen C. Solution structure of a K(+)-channel blocker from the scorpion *Tityus cambridgei*. *Protein Sci* 2002 11: 390-400.
20. Ungerstedt U. Microdialysis-principles and applications for studies in animals and man. *J Intern Med* 1991; 230: 365-73.
21. Páez X, Hernández L. Blood microdialysis in humans: a new method for monitoring plasma compounds. *Life Sci* 1997; 61: 847-856.
22. Müller M. Microdialysis. *Br Med J* 2002; 324:588-591.
23. Hernández L, Tucci S, Páez X, Guzmán N. *In vivo* monitoring of glutamate in the brain by dialysis and capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection. *J Liq Chromatogr* 1993; 652: 393-398.
24. Páez X, Rada P, Hernández L. Neutral amino acids monitoring in phenylketonuric plasma microdialysates using micellar electrokinetic chromatography and laser-induced fluorescence detection. *J. Chromatography B* 2000; 739: 247-254.
25. Páez X, Hernández L. Biomedical applications of capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection. *Biopharm Drug Dispos* 2001; 22: 273-289.
26. Páez X, Mazzei De Dávila CA, Hernández L. Monitoreo continuo de aminoácidos por microdiálisis subcutánea en niño con trauma encefálico. Resúmenes del XX Congreso Latinoamericano de Ciencias Fisiológicas; 2000 Cancún, México.
27. D´Suze G, Corona F, Posan LD, Sevcik C. High performance liquid chromatographic purification in amino acid sequence of toxin from the muscarinic fraction of *Tityus discrepans* scorpion venom. *Toxicon* 2002; 34: 591-598.
28. Rada P, Tucci S, Teneud L, Páez X, Pérez J, Alba G, Garcia I, Sacchettoni S, Del Corral J, Hernández L. Monitoring gamma-aminobutyric acid (GABA) in human brain and plasma microdialysates using micellar electrokinetic chromatography and laser-induced fluorescence detection. *J. Chromatography B* 1999; 735:1-10.
29. Coutinho-Netto J, Abdul-Ghani AS, Norris PJ, Thomas AJ, Bradford HF. The effects of scorpion venom toxin on the release of amino acid neurotransmitters from cerebral cortex in vivo and in vitro. *J. Neurochem* 1980; 35: 558-565.
30. Romano-Silva MA, Ribeiro-Santos R, Gómez MV, Moraes-Santos T, Brammer MJ. Tityustoxin-mediated Na⁺ influx is more efficient than KCl depolarisation in promoting Ca(2+)-dependent glutamate release from synaptosomes. *Neurosci Lett* 1994; 169: 90-92.
31. Bicalho AF, Guatimosin C, Prado MA, Gomez MV, Romano-Silva MA. Investigation of the modulation of glutamate release by sodium channels using neurotoxins. *Neuroscience* 2002; 113: 115-123.
32. Nencioni AL, Lebrum I, Dorce VA. A microdialysis study of glutamate concentration in the hippocampus of rats after TsTX toxin injection and blockade of toxin effects by glutamate receptor antagonists. *Pharmacol Biochem Behav* 2003; 74: 455-463.