

Heer.

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO
FACULTAD DE CIENCIAS



1 de junio de 1979
N. 25

CONTRIBUCION AL ESTUDIO DE LAS TOXINAS
DEL VENENO Y ULTRAESTRUCTURA DEL
TELSON DEL ALACRAN DE NAYARIT
CENTRUROIDES NOXIUS HOFFMANN

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
B I O L O G O
P R E S E N T A

MYRNA ALEXANDRA R. DENT

MEXICO, D. F.

6353

1979

SSP.

38



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

I N D I C E

	Pag.
INTRODUCCION	
a) Generalidades	1
b) Química de los venenos de alacranes	4
c) Aspectos fisiológicos y acción de los venenos	9
d) Aspectos ecológicos	12
e) El Alacrán de Nayarit	15
MATERIAL Y METODO	17
RESULTADOS	23
DISCUSION	45
BIBLIOGRAFIA	50

INTRODUCCION

GENERALIDADES

"Párikuté, "El Dueño de los Animales", tuvo temor de que el alacrán hiciera daño a la gente y pidió al zopilote que acarreará un canasto de los que usan los chamanes. Debía colocarlo en una repisa alta. No le dijo que contenía el más peligroso de los alacranes y le ordenó que no mirara, pues lo que estaba aprisionado podía escapar. Pero el zopilote era curioso y abrió el canasto; el alacrán salió y se escondió. El zopilote no pudo hallarlo y es por eso que ahora nos importunan los alacranes" (Furst y Nahmad, 1972).

Como en toda leyenda, su contenido se encuentra enriquecido por el medio ambiente que rodea al hombre; así, los huicholes tienen muchas historias a propósito de los alacranes que participan dentro de sus ritos y supersticiones. En todas ellas, los alacranes aparecen como animales dañinos para el hombre, representantes del mal, del dolor y de la muerte, envueltos dentro de una fantasía y una imaginación asombrosa. Esto es aceptable, si se toma en cuenta que los huicholes habitan la porción de la Sierra Madre Occidental, localizada en el estado de Nayarit, donde se encuentra la especie de alacrán más venenoso de México.

Como los huicholes, existen muchas civilizaciones donde se hace alusión, no sólo a los alacranes, sino a varios de los animales ponzoñosos. Se mencionan en la literatura religiosa o mitológica, como en la Biblia o el Talmud, o en la leyenda de Orión de la Mitología Griega. En ocasiones aparecen en monumentos como en el Antiguo Egipto o en la cultura Maya donde la serpiente es un representante religioso muy importante. Los Aztecas llamaban al alacrán "Colotl" y en ocasiones acompañaban al Dios del Sol junto con arañas, ciempies y alacranes. Incluso existen documentos como Los Papiros del Viejo Egipto (1600

a.c.) donde se indica el tratamiento para el piquete de alacrán y mordeduras de serpiente (Baerg, 1928; Balozet, 1971).

Dentro de los clásicos griegos, Aristóteles escribió que la nocividad de los alacranes no era la misma en todos ellos, más aún, en algunas localidades su picadura era inofensiva, mientras que en otros era mortal.

Sin embargo, no fue sino hasta el siglo XVII que se efectuó un estudio ausente de misticismo y superstición por Francesco Redi en 1668, el cual llevó a cabo un estudio sistemático sobre serpientes y determinó además, las variaciones en la toxicidad del veneno de los alacranes, basándose en la distribución geográfica de los alacranes europeos y africanos. A pesar de ello, no existe una continuidad sobre el estudio científico de estos animales. En 1731, Maupertuis estudia el efecto del veneno de alacrán sobre perros y pollos. En el siglo XIX aparecen algunos trabajos como los de Maccary (1810), Bert (1865, 1885), Valentín (1876) y otros, pero son escasos. Es realmente hasta principios de este siglo que el estudio sobre animales ponzoñosos cobra mayor interés (Balozet, 1971). Son en su mayoría trabajos de interés médico, donde se describen las sintomatologías producidas y los tratamientos utilizados para la curación de la intoxicación originada por la acción del veneno sobre el hombre.

Actualmente se ha despertado un gran interés por la investigación científica de los venenos animales. En los últimos años el incremento de trabajos sobre este tema es increíble, lo que rebasa el interés médico y se adentra ya en el conocimiento a nivel molecular. Se calcula que cada año se publican alrededor de 10,000 artículos en este campo (Zlotkin, 1973).

Su interés posiblemente se deba a la convergencia evolutiva de los organismos, que se observa en el amplio espectro de los animales ponzoñosos existentes, que por diferentes caminos han dado lugar a la formación de componen-

tes tóxicos tan diversos. Así se incluyen, desde organismos unicelulares (Dinoflagellata), moluscos (Gastropoda, Cephalopoda), equinodermos (Asteroidea, Echinoidea), arácnidos (Scorpionida, Araneae), ácaros (Acarida), insectos (Hymenoptera, Lepidoptera, Isoptera, Hemiptera, Coleoptera), peces (Tetraodontiformes), anfibios (Anura), reptiles (Ophidia, Sauria) hasta mamíferos (Monotremata, Insectivora). Cabe mencionar que dentro del Phylum Chordata, las aves es la única clase que no los presenta (Zlotkin, 1973).

La diversidad de los organismos, refleja la variabilidad en la composición de las estructuras anatómicas para la formación y liberación de las sustancias tóxicas que contienen, desde los pelos urticantes de algunos insectos, hasta estructuras especializadas para la inoculación del veneno, como es el telson de los alacranes.

Así también, la amplia heterogeneidad de su composición química, desde compuestos alifáticos simples o cíclicos de algunos artrópodos, compuestos alógenos como el ácido fórmico de las hormigas (Habermann, 1972), compuestos heterocíclicos de algunos peces y moluscos (Karlsson, 1973), complejos glucolipoproteínicos como la primnesina secretada por un dinoflagelado, hasta una gran variedad de moléculas polipeptídicas, ya sean neurotóxicas de bajo peso molecular como en elápidos y alacranes o de alto peso molecular como en la araña "capulina" o "Viuda Negra" (Tu, 1977).

Uno de los fines perseguidos dentro del estudio de los venenos, es lograr la determinación de la estructura de sus componentes tóxicos. Sin embargo, el objetivo principal se funda en el descubrimiento de la dinámica establecida entre la forma y la función, la cual contribuye a la fisiología y la bioquímica comparativas de los receptores nerviosos y musculares.

Algunos de ellos, juegan ya un papel importante como drogas dentro de la bioquímica farmacológica, en los estudios del sistema nervioso; por ejemplo la saxitoxina o la tetrodotoxina, actúan como bloqueadores no-despolarizantes, en fenómenos como la transmisión sináptica o conductancia iónica (Karlsson, 1973; Zlotkin, 1973; Caterall y Morrow, 1978); o actúan sobre las membranas celulares, como la melitina o la fosfolipasa A₂ y en otros fenómenos fisiológicos (Habermann, 1972).

Así, a medida en que los estudios sobre venenos se incrementen, estos podrán ser útiles herramientas para la investigación de los mecanismos moleculares, fuentes potenciales como nuevos agentes terapéuticos, recursos para el estudio de relaciones zo ecológicas, etológicas, así como para el estudio taxonómico de los animales venenos. Este trabajo versará principalmente sobre venenos de alacranes, por lo que se hará mayor énfasis sobre ellos.

QUIMICA DE LOS VENENOS DE ALACRANES

El veneno del alacrán es una mezcla de diversos componentes; se encuentra constituido principalmente por un 90% de proteínas farmacológicamente activas. Algunas proteínas son enzimas que participan sobre la acción tóxica del veneno o presentan otro tipo de moléculas como lipoproteínas, mucopolisacáridos, etc. Sin embargo, la acción letal se atribuye principalmente a una o varias proteínas neurotóxicas, que difieren en el grado de toxicidad al ser probadas sobre vertebrados e invertebrados, así como a la acción de algunas enzimas hidrolíticas, las cuales juegan un papel biológico específico (Babin, et al, 1975; Tu, 1977).

El término neurotoxina se refiere a aquellas proteínas de los venenos de elápidos y de alacranes que bloquean la transmisión sináptica al combinarse con

las membranas sinápticas del sistema nervioso periférico (Babin, et al 1974; Watt, et al 1974). Sin embargo, en el último Congreso Internacional de Toxinología, efectuado en 1976, se sugirió utilizar el término toxina en vez de neurotoxina, hasta satisfacer los criterios requeridos para aseverar su acción neurotóxica sobre el sistema nervioso.

Todas las toxinas del veneno de alacrán son proteínas básicas, de cadenas polipeptídicas sencillas, de bajo peso molecular, entre 6500 y 9000, la mayoría alrededor de 7000; presentan cuatro puentes de disulfuro, con algunas excepciones, constan de 57 a 78 aminoácidos, la mayor parte entre 62 y 66, y ausencia de metionina (Watt, et al 1974; Tu, 1977), a excepción del veneno del Tityus serrulatus, que contiene la primera toxina de alacrán descrita (componente - δ) que presenta metionina (Possani, et al 1977).

Las toxinas de serpientes son también polipéptidos de cadenas sencillas, básicas, de bajo peso molecular, con 4 o 5 puentes de disulfuro, las neurotoxinas cortas presentan de 60-62 aminoácidos y las largas de 70-74 aminoácidos. Sin embargo, difieren de las de los alacranes en que pertenecen a otra familia de proteínas homólogas, dado que difieren en su estructura primaria, en la localización de las cisteínas y presentan diferente actividad fisiológica e inmunológica. Esto se refleja en el diferente tipo de acción de las toxinas de ambos grupos (Rochat, et al 1970b; Tu, 1977 Watt, et al 1974).

De los venenos más estudiados se encuentran los de los alacranes del Norte de Africa: Androctonus australis (Chellala, Argelia), Leiurus quinquestratus (Khartum, Sudan), y Buthus occitanus (Mecheria, Argelia), de los cuales se han aislado 11 toxinas que difieren en la composición de aminoácidos y en el grado de toxicidad sobre vertebrados e invertebrados. En todas se observa un total de 57 a 65 aminoácidos, ausencia de metionina y presencia de 4 puentes

de disulfuro. Además se aprecia un efecto sinérgico al mezclar las toxinas (Miranda et al 1970).

De las tres toxinas de A. australis se determinó la secuencia completa de aminoácidos de la toxina I, la cual contiene 63 aminoácidos y un peso molecular de 6808 (Rochat, et al 1970a) y de la toxina II, compuesta por 64 aminoácidos y un peso molecular de 7249 (Rochat, et al 1972). Ambas toxinas presentan un 50% de homologías entre sí. Se halló una isoneurotoxina I' de los alacranes colectados en Tunes, la cual difiere de la toxina I de los alacranes capturados en Argelia, por la sustitución de un residuo de valina, en la posición 17, por una isoleucina. Esta diferencia genética, sugiere una heterogeneidad taxonómica.

Usando enzimas proteolíticas se determinaron las posiciones de los 4 puentes de disulfuro de la toxina II. Probablemente dadas las homologías entre dichas toxinas de alacranes, estas posiciones se mantengan constantes en todas las todas las toxinas de alacranes que tienen efectos sobre mamíferos. La localización de estos puentes es fundamental, dado que juegan un papel importante en la determinación de la relación entre la estructura y la función de las proteínas (Kopeyan, et al 1974).

Estas II toxinas se describen como componentes proteínicos con efectos tóxicos sobre mamíferos. Sin embargo, se ha aislado y purificado una proteína específica, altamente tóxica al inyectarse sobre insectos, derivada del veneno de A. australis, denominada "toxina para insecto". Difiere de la que actúa sobre mamíferos, tanto en composición de aminoácidos, actividad, como en respuestas fisiológicas. Esta toxina presenta 67 aminoácidos, 4 puentes de disulfuro, ausencia de metionina y un peso molecular de 7,498. Es curioso observar, que a pesar de ser lo alacranes, depredadores naturales de insectos, el porcen-

taje de la "toxina para insecto", es 6 veces menor que el de la toxina para mamífero en el veneno de A. australis (Zlotkin, et al 1971).

Las escasas homologías entre las secuencias N-terminal de ambas toxinas sugieren que pertenecen a diferentes familias de proteínas homólogas. Sin embargo, esto sólo se podrá verificar en la medida en que se efectúen un mayor número de caracterizaciones sobre toxinas para insectos.

Del mismo veneno se ha aislado una proteína tóxica sobre isópodos conocida como "toxina para crustáceos", de 70 residuos de aminoácidos, presencia de 5 puentes de disulfuro y un peso molecular de 8,191 (Zlotkin, 1976).

Del alacrán norteamericano Centruroides sculpturatus se ha efectuado el aislamiento de 4 toxinas designadas I, II, III y IV, las cuales actúan sobre vertebrados (Mc Instosh y Watt, 1973) y 3 variantes menos tóxicas que producen parálisis sobre insectos y, en grandes proporciones sobre vertebrados (Babin, et al 1974). Se ha determinado la estructura primaria de la toxina I que contiene 64 aminoácidos y ausencia de metionina y alanina (Babin, et al 1975) y de las tres variantes que presentan 65, 66 y 65 aminoácidos respectivamente (Babin, et al 1974). Las secuencias de estas toxinas muestran grandes homologías, lo que sugiere que pertenecen a una familia de proteínas homólogas.

Del veneno del alacrán brasileño Tityus serrulatus se han purificado dos toxinas denominadas Tityus-toxina I y II (Gómez y Diniz, 1966; Toledo y Neves, 1976), las cuales contienen 63 y 78 aminoácidos respectivamente. A diferencia de otras toxinas la Tityus-toxina II presenta 6 puentes de disulfuro (Toledo y Neves, 1976), lo que representa una excepción al igual que la toxina II de C. sculpturatus y la toxina para crustáceo de A. australis (Zlotkin, 1973). Mediante diferente metodología, se han caracterizado 5 toxinas del T. serrula-

tus, de éstas la más tóxica, denominada toxina- γ contiene 62 aminoácidos, la presencia de una metionina y un peso molecular alrededor de 7,000 (Possani, et al 1977).

La caracterización de las toxinas aparece como una herramienta útil para estudios de filogenia y taxonomía. Se ha intentado obtener un máximo de homologías entre las secuencias N-terminal de las toxinas de diferentes especies de alacranes, alineando los aminoácidos con el mínimo de cambios por interconversión, suponiendo que han permanecido inalterados durante la evolución. Las secuencias presentan un 50% de homologías aproximadamente entre ellas, se han agrupado hasta el momento en 5 grupos estructurales con base en los aminoácidos flatantes. Esto podría indicar que los 5 grupos representan líneas evolutivas divergentes de un ancestro común (Rochat, et al 1970b; Possani, et al 1977). El alto grado de homologías sugiere que la conservación de estos aminoácidos juega un papel importante en las funciones biológicas, dado que pueden constituir el sitio activo, ser esenciales para mantener la conformación activa o servir para el doblamiento de la cadena peptídica (Zlotkin, et al 1971; Karlsson, 1973). Recientemente, se ha sugerido que las toxinas de serpientes, alacranes y abejas evolucionaron de un polipéptido ancestral común, de la mitad de largo que las toxinas actuales, a través de duplicación génica interna y doblamiento génico (Erickson, 1978).

Además de las toxinas, el veneno de alacrán presenta enzimas de tipo hidrolítico, que ayudan a la toxicidad del veneno, aunque en menor porcentaje y diversidad que las serpientes. Buthus quinquestriatus presenta actividad de fosfolipasa A y B (Mohamed, et al 1969a) y de proteasa, siendo negativo para colinesterasa, transaminasa y amilasa (Mohamed, et al 1969b). Otros alacranes como Heterometrus fulvipes presentan actividad de succinato-deshidrogenasa

(Selvarajan, et al 1975); en C. sculpturatus y Hadrurus hirsutus se encontró, aunque en un porcentaje muy bajo, actividad fosfodiesterasa, pero no así en Velovis spinigerus y Anuroctonus phalodactylus (Russel, 1966). Al veneno del alacrán T. serrulatus se le detectó actividad hialuronidásica, pero no de fosfolipasa, fosfodiesterasa, proteasa o fibrinolítica (Possani, et al 1977).

ASPECTOS FISIOLÓGICOS Y ACCIÓN DE LOS VENENOS.

Se han efectuado estudios fisiológicos y farmacológicos con el fin de observar los efectos producidos por los venenos de alacrán, ya que originan parálisis respiratoria, y en consecuencia la muerte de los organismos. Ismail, et al (1974a) utilizó sobre rata, la toxina del alacrán L. quinquestratus marcada con iodo radioactivo, encontrando que la mayor radioactividad se hallaba en los riñones y la más baja en el cerebro. El gran contenido en el riñón sugiere una rápida tasa de excreción del veneno, dado que se encuentra en la orina 15 min. después de la inyección.

La inyección intravenosa del veneno de alacrán sobre perros, gatos y conejos muestra un incremento en la presión sanguínea (Patterson, 1960; Del Pozo, et al 1944; Bücherl 1971), así como la liberación de catecolaminas de las glándulas suprarrenales de la rata, su efecto se produce principalmente sobre estructuras nerviosas (Celeste, et al 1968).

Los efectos cardiovasculares de los venenos de Pandinus exitalis (Ismail, et al 1974b), T. serrulatus (Corrado, et al 1974) y Androctonus amoreuxi (Ghazai, et al 1975) parecen ser originados a través de la estimulación del sistema nervioso autónomo, particularmente el simpático, con la liberación de catecolaminas. Se sugiere que el veneno prevenga la destrucción de las catecolaminas o facilite su acción sobre los receptores adrenérgicos.

Se ha observado la ultraestructura del músculo estriado de cucarachas inyectadas con el veneno del T. serrulatus, demostrándose mionecrosis y degeneración de las miofibrillas (Rossi, et al 1973).

Utilizando una toxina pura del alacrán T. serrulatus, se han observado efectos cardiovasculares y arritmias respiratorias en ratas, como taquípnea, hipotensión, amplitud e irregularidad en los movimientos respiratorios y apnea. Sobre fleum aislado de rata se aprecia una contracción, seguida por un incremento en la amplitud de los movimientos pendulares y una variación rítmica del tono. Estos efectos probablemente se deban a la liberación de acetilcolina, catecolaminas y la substancia P (Cunha Melo, et al 1973; Freire-Maia, et al 1973; Del Pozo, et al 1945). Las necropsias indican un agudo edema pulmonar (Lima, et al 1975).

Las toxinas del veneno de varios alacranes se asocian con las terminaciones colinérgicas y adrenérgicas nerviosas presinápticas, para estimular la liberación de neurotransmisores (Benoit y Mambrini, 1967; Celeste, et al 1968; Katz y Edwards, 1972; Smythies, et al 1974), como la acetilcolina (Diniz, et al 1974; Gómez, et al 1973), serotonina, norepinefrina (Moss, et al 1974) ó ácido γ -aminobutírico (Romey, et al 1976).

Las toxinas denominadas para crustáceo, para insecto y para mamífero I y II del alacrán A. australis, fueron estudiadas sobre preparaciones de músculo-nervio de cangrejo, araña, insecto e fleum de cobayo, mostrando un efecto excitatorio muscular debido a la acción presináptica postganglionar despolarizante sobre los nervios motores, liberando acetilcolina. Sólo la toxina para insecto fue selectiva, dado que únicamente presenta actividad sobre preparaciones de insecto (Rathmayer, et al 1978; Tintpulver, et al 1976).

Se ha observado que la acción de los venenos de los alacranes L. quinques-

tratus, T. serrulatus y A. australis produce una prolongada despolarización de las membranas nerviosas y musculares y en consecuencia una prolongación del potencial de acción. Esto parece deberse al cierre del canal de sodio y a la apertura del canal de potasio, reduciendo la tasa y la cantidad de activación del sodio (Romey, et al 1975; 1976; Koppenhöfer y Schmidt, 1968; Moss, et al 1974).

Con el veneno de T. serrulatus se observó sobre células de neuroblastoma, que la toxina pura parece unirse sobre el canal de sodio, el cual es distinto del sitio de acción de la tetrodotoxina y de los sitios de uniones de los alcaloides (Linden y Raftery, 1976; Cahalan, 1975).

Se ha demostrado con el veneno de T. serrulatus y L. quinquestratus que la liberación de los neurotransmisores acetilcolina y norepinefrina respectivamente, dependen del pH, la concentración de la toxina, la energía del sistema y el tiempo de exposición. La liberación de los neurotransmisores, se acompaña por una estimulación en la tasa de entrada de calcio en cerebro y sinaptosomas aislados de rata; posiblemente este incremento en la permeabilidad al calcio, se deba a una interacción directa sobre el canal de calcio, sin afectar el potencial de membrana o a una despolarización de la membrana presináptica (Moss, et al 1974; Romey, et al 1976).

La toxina de alacrán es semejante a la batracotoxina, dado que ambas producen una despolarización antagonizada por la tetrodotoxina; posiblemente actúe en el mismo sitio que la toxina del T. serrulatus (Gómez, et al 1973). También la veratridina se asemeja a la toxina de alacrán, aunque se aprecien algunas diferencias (Romey, et al 1976).

Esto sugiere, que los venenos de alacranes pueden ser herramientas útiles para la caracterización química de las moléculas, que intervienen sobre el fun-

cionamiento y acoplamiento del sodio y el potasio de la membrana del axón; para estudios sobre la transmisión sináptica, sobre la liberación y almacenamiento de neurotransmisores, principalmente donde las técnicas electrofisiológicas no pueden ser aplicadas, para la liberación de neurohormonas y estudios sobre membranas celulares (Gómez, et al 1973; Moss, et al 1974; Romey, et al 1975, 1976).

ASPECTOS ECOLOGICOS

Distribución geográfica

Los alacranes son uno de los organismos más antiguos que se conocen. A pesar de ser animales con escasas probabilidades de fosilización, existen poco más de un centenar de fósiles, desde el Silúrico hasta el Oligoceno. Se les considera "fósiles vivientes" dado que han permanecido desde el Silúrico hasta nuestros días, virtualmente inalterada su morfología, no obstante los grandes cambios geológicos y climáticos ocurridos a través del tiempo. Esto demuestra, una evolución continua e independiente entre los artrópodos, con ligeras variaciones. Como ejemplo fósil, se tiene Palaeophonus nuncius, que posiblemente fue un alacrán acuático durante el Silúrico; es la especie más primitiva que se conoce, proviene de la Isla de Gotland del Silúrico Superior (Vachon, 1953; Moore, 1952).

México posee una amplia distribución de especies de alacranes venenosos, los altamente tóxicos pertenecen al género Centruroides Marx y su distribución aparece a través de toda la vertiente del Pacífico, en la zona Tropical y Subtropical de México. Esta región ocupada por los alacranes se encuentra cortada en dos partes por la Sierra Volcánica Transversal e interrumpida en tramos por la Sierra Madre Occidental. Al Norte, pero siempre en la misma direc-

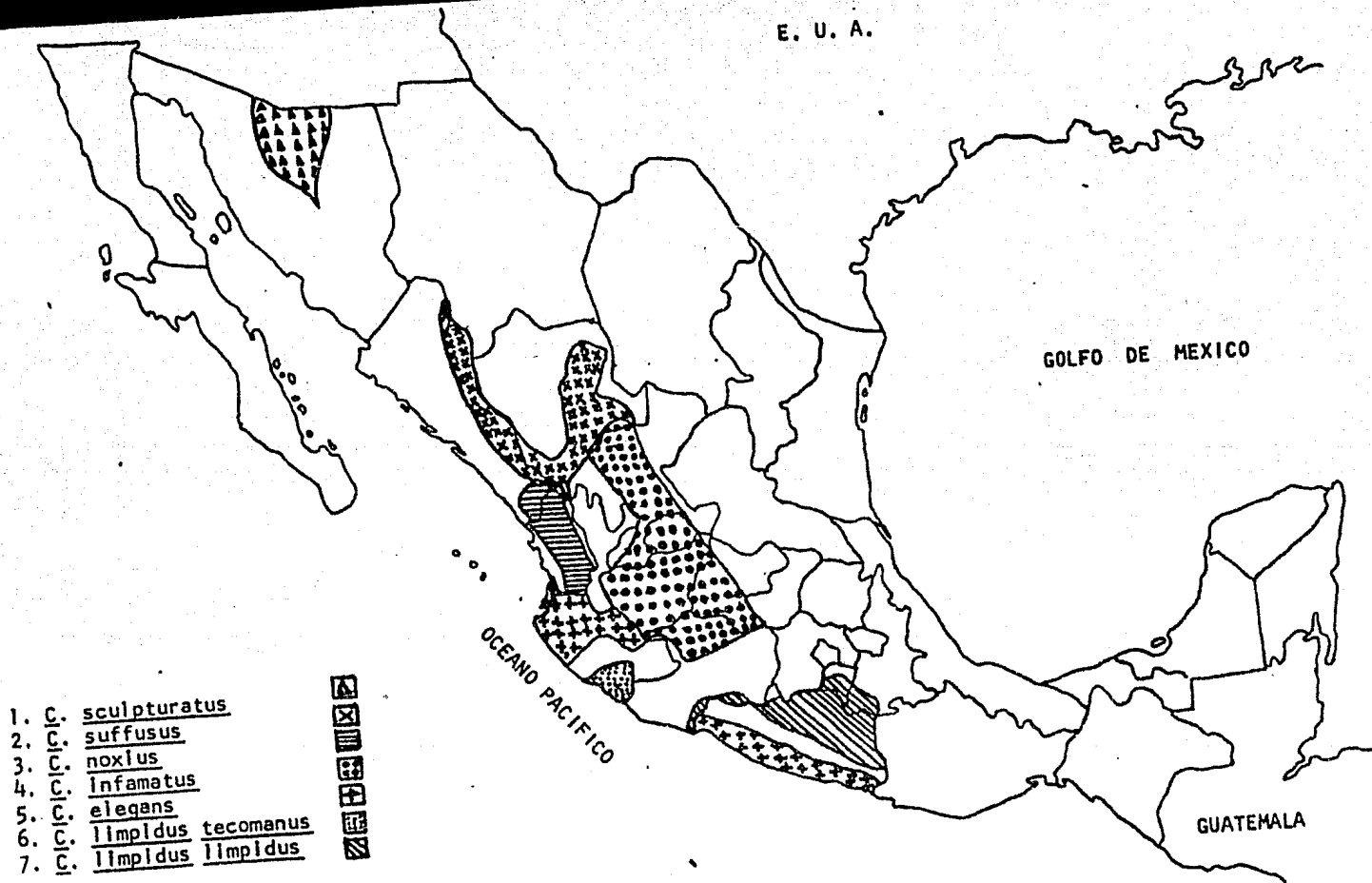


Fig. 1. Distribución geográfica de las especies más peligrosas del género *Centruroides* en la República Mexicana. (Hoffmann, 1938)

ción, se aprecia el foco de Centruroides sculpturatus.

Al parecer son 6 las especies más venenosas del país, que son seguramente los restos de una antigua fauna norteamericana, producto de una larga estancia en la misma zona. Así se tiene: el alacrán de Durango C. suffusus suffusus en Durango, NO de Zacatecas y E de Sinaloa; el C. noxius, habita en Nayarit y SE de Sinaloa; el C. limpidus limpidus o alacrán de Guerrero, que además habita en Morelos, SE del Estado de México, SE de Michoacán y SO de Puebla, esencialmente en la Cuenca del Río Balsas; el C. limpidus tecomanus en Colima, SO de Jalisco y SO de Michoacán; el C. elegans al O de Jalisco y áreas costeras de Nayarit, Sinaloa, Guerrero y Oaxaca; el C. infamatus al Sur de Durango, Zacatecas, Aguascalientes, Michoacán y Jalisco y el C. sculpturatus al Sur de Arizona y Norte de Sinaloa (Hoffmann, 1938; Díaz Nájera, 1970; Navarro, et al 1975) (Ver Mapa, Fig. 1).

Importancia Médica.

Desde el siglo XVIII, Francisco J. Clavijero, en la Historia Antigua de México, comenta sobre los alacranes mexicanos: "... en las tierras frías o templadas son por lo común pocos y no considerable su picada. En las tierras cálidas y en aquellas en que el aire es muy seco, aunque el calor sea moderado, abundan más y es tal su ponzoña que en algunas partes basta quitar la vida a los niños y ocasionar ansias terribles en los adultos. Se ha observado que la ponzoña de los escorpiones pequeños y rubios es más activa que la de los grandes y negros, y que es menos funesta su picada en aquellas horas del día en que calienta más el sol".

Desde entonces se citan los alacranes como un grave problema de salud pública, dada la elevada morbilidad y la severidad de las manifestaciones clínicas que originan.

De los estados citados, la mayor mortalidad se presenta en Colima, Nayarit, Guerrero y Morelos, con una tasa media anual por cada 100,000 hab. de 83.7, 41.6, 41.5 y 37.5 respectivamente (Bravo-Becherelle y Mazzoti, 1961). Los datos de mortalidad en México, durante los períodos de 1940 a 1949 y de 1957 a 1958 indican que más de 20,000 personas murieron por picadura de alacrán, 2,000 por mordedura de serpiente y 274 por arañas (Mazzoti y Bravo-Becherelle, 1961), esto significa que los alacranes constituyen un índice mayor de mortalidad que las serpientes, como frecuentemente se supone.

La severidad de la picadura de alacrán está condicionada por la toxicidad de la especie, talla del alacrán, peso y edad de la víctima, así como su estado general. Es también importante el estado fisiológico de la glándula venenosa y la dosis de la toxina inoculada, ya que dosis grandes de los venenos menos activos causaron los mismos efectos, que dosis pequeñas de venenos más activos (Hoffmann y Nieto Roaro, 1939).

La acción del veneno puede ser de dos tipos: local y sistémica. La acción local puede variar desde una sensación de ardor alrededor de la picadura, que puede durar de unos cuantos minutos a varias horas, como la producida por los géneros Heterometrus, Scorpio, Veiovís, hasta una hinchazón local temporal y dolor intenso como el producido por el género Diplocentrus. La acción sistémica es principalmente neurotóxica, que en ocasiones produce la muerte como en el caso de los géneros Centruroides, Tityus, Androctonus, etc. (Bücherl, 1971). El análisis de los datos sobre defunciones por edad, muestra que éstas ocurren entre edades de 0 a 1 año principalmente, de 1 a 4 años en segundo lugar y de 5 a 9 años en tercer lugar, obteniendo un total de 93.3% de morbilidad total (Mazzoti y Bravo-Becherelle, 1961).

La acción neurotóxica del veneno produce los siguientes síntomas: dolor lo-

cal, entumecimiento de la lengua y la garganta, hipersensibilidad, rinorrea, disnea, convulsiones, sudoresis, hipersalivación, aumento de la presión arterial, hiperestesia, taquicardia, fiebre hasta de 40 y 41 °C, fotofobia, parálisis de los músculos oculares, midriasis, los movimientos respiratorios son irregulares y la muerte se debe a una parálisis respiratoria (Flores, 1963; Bucherl, 1971; Watt, et al 1974; Navarro, et al 1975).

Aunque el bajo valor antigénico del veneno no permite la obtención de suero de alto poder neutralizante, la aplicación de suero antialacrán ha tenido influencia en la disminución de la mortalidad. Representa, sin embargo, un peligro por sensibilización en un cierto número de personas (Del Pozo, et al 1944; Del Pozo, 1962).

A pesar de esta amplia distribución y la importancia que los alacranes representan, el estudio de los venenos es escaso. Hoffmann (1938) menciona la utilidad de dichos estudios para la valoración específica de las diferencias morfológicas encontradas y para el estudio zoogeográfico de los mismos. De los venenos de alacranes mexicanos estudiados hasta el momento, se encuentra el de C. suffusus suffusus (alacrán de Durango) por RoCHAT, et al 1976; el C. sculpturatus (alacrán de Arizona) estudiado por Babin, et al (1974) y recientemente el C. elegans (alacrán de Jalisco) por Possani et al (1978), el C. limpidus tecomanus (alacrán de Colima) por Possani et al (comunicación personal) y el presente trabajo sobre el alacrán de Nayarit, C. noxius.

EL ALACRAN DE NAYARIT

El alacrán Centruroides noxius habita en las lomerías y cerros del estado de Nayarit y Sur de Sinaloa. Según Hoffmann y Vargas (1935) es conside-

rado como la especie más ponzoñosa del país, es 4 veces más tóxica que el C. limpidus limpidus y 6 veces más tóxica que el C. suffusus suffusus.

El C. noxius es un animal de color moreno rojizo y de tamaño pequeño, entre 5 a 8 cms. de longitud. Se encuentra durante el invierno en terrenos bajos y agrietados. Al caer las lluvias los alacranes abandonan sus refugios, localizándoseles en las cortezas de los árboles, bajo los troncos y las piedras (González, 1945).

Los alacranes son el remanente de una fauna muy antigua del continente Norteamericano. Al C. noxius se le considera una especie endémica, desligada del resto de los Centruroides mexicanos, caracterizándose por una virulencia especial de su veneno, más rápido y más intenso en su acción (Hoffmann y Vargas, 1935; Hoffmann, 1938).

Bioquímicamente su veneno no ha sido estudiado, por tanto el presente trabajo pretende incrementar el conocimiento de éste alacrán, mediante el aislamiento y caracterización de sus toxinas, así como el estudio ultraestructural de su telson.

MATERIAL Y METODO

Fuente del veneno

Se colectaron 300 alacranes Centruroides noxius Hoffmann, identificados por el Prof. Jordi Juliá, en la población de Pantanal, Nayarit, a 10 Km de la ciudad de Tepic.

Los alacranes fueron anestesiados con bióxido de carbono y el veneno se le extrajo por estimulación eléctrica del telson, colectándose en cajas de Petri. Se recuperó el veneno con agua bidestilada, se centrifugó a 18,000 x g durante 10 min. y el sobrenadante se congeló.

Fuente de Material

Se empleó el ácido hialurónico de Nutritional Biochemical Corp., el Hide Powder Azur de Calbiochemistry, el Bio-Gel P-10 de Bio-Rad Laboratories, CM-Sepharosa 6B Cl de Pharmacia Fine Chemicals, Carboxi-metil-celulosa (CM-32) de Whatman, el Citocromo C, Mioglobina y Albúmina de Schwarz/Man, OrangeBurg, N.Y., el cloruro de sodio y ácido clorhídrico de Merck. Solamente reactivos de pureza analítica fueron utilizados en este trabajo.

Determinación de la toxicidad.

La toxicidad de las diferentes fracciones proteínicas fue observada sobre ratones albinos de 15 a 20 grs de peso inyectados intraperitonealmente, con cantidades variables de proteína en 0.1 a 0.3 ml. de solución salina o de amortiguador de acetato de amonio.

La dosis letal media (DL₅₀) del veneno soluble se obtuvo utilizando diez dosis distintas con diez ratones por lote, para cada una de las dosis empleadas y graficando el porcentaje de muertes obtenidas 20 hrs. después de la inyección, contra el logaritmo de la dosis. Se efectuaron inyecciones de solu-

ción salina o de amortiguador de acetato de amonio como control, sin que se produjera algún efecto tóxico. Entre menores sean los valores de la DL₅₀ mayor será la toxicidad del veneno.

Determinaciones enzimáticas.

La determinación de la actividad hialuronidásica se realizó turbidimétricamente. Una unidad de actividad se define como la cantidad de proteína necesaria para hidrolizar 1 µg de ácido hialurónico por minuto, a 25°C utilizando 40 µg de ácido hialurónico disuelto en 0.2 ml de amortiguador a pH 5.3 (Tolksdorf, et al 1949). La actividad de fosfolipasa se midió por el procedimiento titulométrico, utilizando yema de huevo como substrato (Shiloah, et al 1973). La actividad de proteasa fue medida utilizando el reactivo Hide Powder Azure como se cita en Glenn, et al 1973.

La homogeneidad de las fracciones cromatografiadas se determinó por electroforesis en gel de poliacrilamida en el sistema de β-alanina-acetato-urea, descrito por Reisfeld, et al (1962), utilizando la mitad de la concentración del amortiguador.

Procedimientos experimentales

El veneno soluble fue ajustado con amortiguador 20 mM de acetato de amonio, pH 4.7, se centrifugó a 18,000 x g durante 10 min, el sobrenadante se liofilizó y se le midió su densidad óptica.

Se calibró una columna de Bio-Gel P-10 (92 x 1.25 cm) aplicando 1 mg de citocromo C (Cyt. C, peso molecular 13,370), mioglobina (Mb, peso molecular 17,800), albúmina (BSA, peso molecular 66,220) y cloruro de sodio (NaCl) Fig 2.

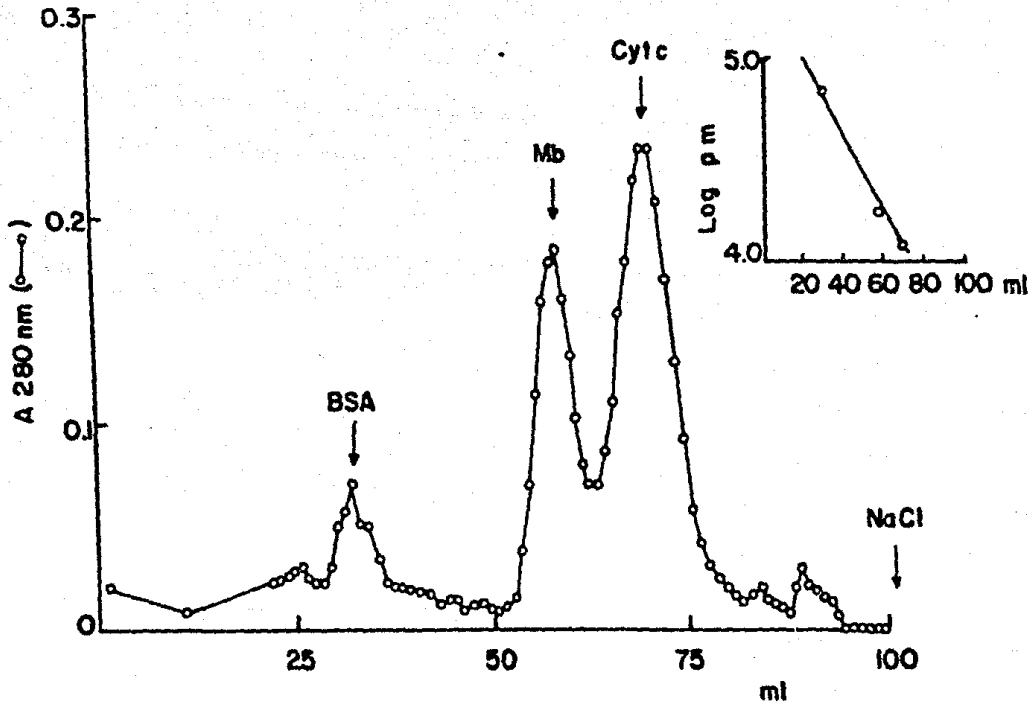


Fig. 2 Calibración de la columna de Bio-Gel P-10 (92 x 1.25 cm)

Se aplicó un mg de citocromo C, mioglobina, albúmina y cloruro de sodio. (Para detalles, ver la sección de Procedimientos Experimentales).

Se aplicó 1 ml que contenía 20.6 μg de veneno en la misma columna de Bio-Gel P-10, eluida con el mismo amortiguador. Se efectuó un ensayo cualitativo para determinar la toxicidad de las fracciones en ratones albinos de 18 a 20 grs.

Las distintas fracciones obtenidas por cromatografía en Bio-Gel P-10, se juntaron y cromatografiaron cada una por separado, sobre una columna de CM-Sepharaosa 6B Cl (24 x 0.5 cm), equilibrada en amortiguador de acetato de amonio 20 mM, pH 4.7. La toxicidad se determinó de la forma antes mencionada.

En electroforesis discontinua en gel de poliacrilamida, las fracciones más tóxicas resultaron impuras, por lo que se dializaron y recromatografiaron por separado en una columna de Intercambio iónico de Carboxi-metil-celulosa CM-32 (42 x 0.65 cm), equilibrada con el mismo amortiguador. La toxicidad de las fracciones se determinó de la misma forma.

Para remover el exceso de sales después de las cromatografías en CM-Sepharaosa y Carboxi-metil-celulosa, se efectuó diálisis contra la solución de 1 mM de acetato de amonio, 20 mM, pH 4.7, utilizando membranas Spectrapor Type 3 como tubo de diálisis (3500 Mr cutoff, Spectrum Medical Industries).

El contenido de proteína, en general, se calculó asumiendo que una unidad absorbencia es igual a 1 mg/ml a 280 nm, en una cubeta de cuarzo con un cm. de paso óptico ($E_{280 \text{ nm}}^1 \text{ cm}$). Las columnas se corrieron a temperatura ambiente (25°C).

Análisis de aminoácidos.

Después de dializar las toxinas puras contra agua, se liofilizaron y se llevó a cabo el análisis de aminoácidos. Se prepararon muestras de proteína por duplicado, por hidrólisis ácida en 6 N de ácido clorhídrico con 0.5% de fe-

no! adicionado para la protección de tirosina en tubos de vidrio cerrados y evacuado individualmente. El análisis de aminoácidos se llevó a cabo sobre muestras hidrolizadas a 110°C por 20, 40, 72 y 120 horas, midiendo la liberación progresiva de los aminoácidos de hidrólisis lenta como valina, isoleucina y la destrucción de aminoácidos sensibles, como resina y treonina. El contenido de cisteína de las proteínas se determinó previa oxidación de la muestra con ácido perbórmico o clástico de acuerdo al método de Moore (1963).

El triptofano se determinó después de la hidrólisis de la proteína en 4.2 N de hidróxido de sodio como lo citan Hugli y Moore (1972), modificándolo para un volumen de 100 μ l.

Se utilizó en lugar de almidón soluble tiodiglicol al 4%. El análisis de aminoácidos se efectuó con un Analizador de aminoácidos Durrum D-500, modificado para alta sensibilidad con el Sistema de Análisis de Datos Mark II.

Ultraestructura del telson del alacrán.

Se separó el telson del cuerpo de dos alacranes Centruroides noxius, éstos se partieron longitudinalmente para permitir la fijación tanto de la quitina como de las glándulas. Se transfirieron inmediatamente a glutaraldehído al 3% (Electron Microscopy Sciences) para su fijación, en amortiguador de fosfatos 0.1 M, pH 7.4, a 4°C durante 2 horas (Sabatini, et al 1963), al cabo de las cuales se retiró el glutaraldehído y se substituyó por medio de lavado, constituido por sacarosa .25 M con el mismo amortiguador, manteniéndose por toda la noche a 4°C. La postfijación se realizó con tetraóxido de osmio (OsO_4) (Electron Microscopy Sciences) al 2% en el mismo amortiguador durante 2 horas a 4°C (Claude y Fullan, 1946).

Después de la postfijación, el osmio se eliminó por medio de 4 cambios,

cada 15 min, con medio de lavado. La deshidratación se efectuó en serie de etanol (Merck) del 30% a absoluto, con dos cambios de 10 min. en cada uno, a 4°C. Se transfirieron a óxido de propileno (Merck) haciendo dos cambios de 30 min., cada uno a temperatura ambiente. La infiltración de las muestras se efectuó en una mezcla 1:1 de Epon (Miller-Stephenson Chemical Co. Inc) con óxido de propileno durante 24 horas a temperatura ambiente en desecador sin vacío. Se transfirieron a cápsulas BEEM que contenían resina diluida y se polimerizaron a 60°C de 36 a 48 horas (Luft, 1961).

Los cortes ultrafinos (600-900 nm) se realizaron, con navaja de diamante (DuPont), en un ultramicrotomo Reichert UMO 3 y se colectaron en rejillas de cobre de 3 mm.

Se contrastaron con acetato de uranilo (Merck) al 2% en agua, 10 min. a 60°C y citrato de plomo al 2% durante 10 min.

Los cortes fueron observados al microscopio electrónico JEOL 100 B operado a 60 KV y con apertura de 100 μ en el condensador.

RESULTADOS

Caracterización del veneno soluble

Se obtuvo un promedio de 200 μg de veneno soluble por alacrán (300 alacranes dieron 57.517 mg).

La dosis letal media (DL_{50}) sobre ratones albinos de 15 a 20 grs fue de 0.26 $\mu\text{g}/\text{gr}$ de peso. La electroforesis en gel de poliácridamida del veneno soluble (sobrenadante) reveló la presencia, de al menos 12 bandas de proteína (Fig. 3).

Al veneno soluble se le determinó la actividad de tres enzimas, la hialuronidasa probada con 10 μg de proteína fue la única positiva, en tanto la fosfolipasa y la proteasa resultaron negativas, con concentraciones hasta de 2 mg y 50 μg de proteína respectivamente.

Fraccionamiento del veneno soluble

Del veneno soluble cromatografiado inicialmente en la columna de Bio-Gel P-10, se obtuvieron siete fracciones de diferente peso molecular. El veneno se aplicó independientemente por duplicado, mostrando el mismo patrón que se observa en la Fig. 4. Las fracciones III, IV, V y VI, resultaron tóxicas al efectuarse un ensayo cualitativo sobre ratones albinos de 20 grs. y se obtuvo una recuperación del 98%.

Las fracciones tóxicas se recromatografiaron por separado en una columna de CM-Sepharosa 6B Cl, dando un número variable de subfracciones, como se aprecia en las Figuras 5, 6, 7 y 8. Resultaron letales, sobre ratones albinos, las fracciones III.4, IV.2, V.2 y VI.1, siendo las dos primeras toxinas las más abundantes como lo muestran los perfiles de los cromatogramas de las

1 2

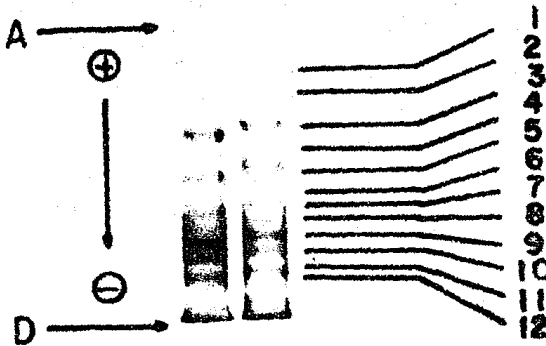


Fig. 3. Electroforesis del veneno soluble

El veneno (1=100 μg de protefna; 2=80 μg de protefna) se corri3 en geles cilindr3cos de poliacrilamida (5.5 cm. 4 mA) conteniendo 8 M de urea en amortiguador de β -alanina-acetato y teñidos con azul brillante de Coomassie G-250. Las protefnas corrieron hacia el c3todo. Inicialmente fueron visibles 12 bandas discretas: cinco fuertes (3, 5, 9, 10, 11), tres moderadas (4, 7, 8) y cuatro d3biles (1, 2, 6, 12). A significa punto de aplicaci3n y D significa colorante indicador de la fuente de migraci3n.

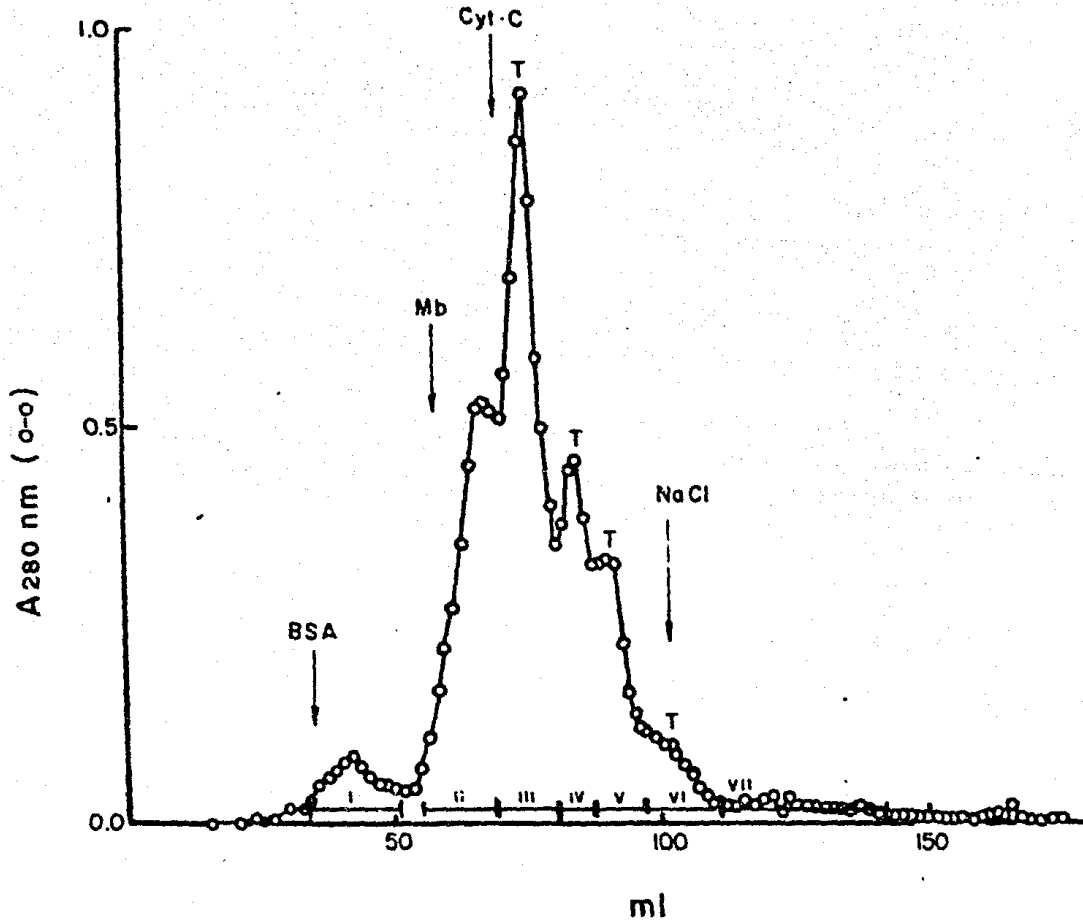


Fig. 4. Cromatografía en Bio-Gel P-10 del veneno soluble.

Una solución de 1 ml, conteniendo 20.6 μ g de veneno se aplicó en una columna de Bio-Gel P-10 (1.25 x 92.0 cm), se equilibró y eluyó en amortiguador de acetato de amonio 20 mM, pH 4.7. Se colectaron fracciones de 1 ml a una velocidad de flujo de 10.8 ml/hr y se clasificaron como fracciones de I a VII, basado sobre la absorbancia a 280 nm. Las recuperaciones y los datos de toxicidad se dan en la Tabla I.

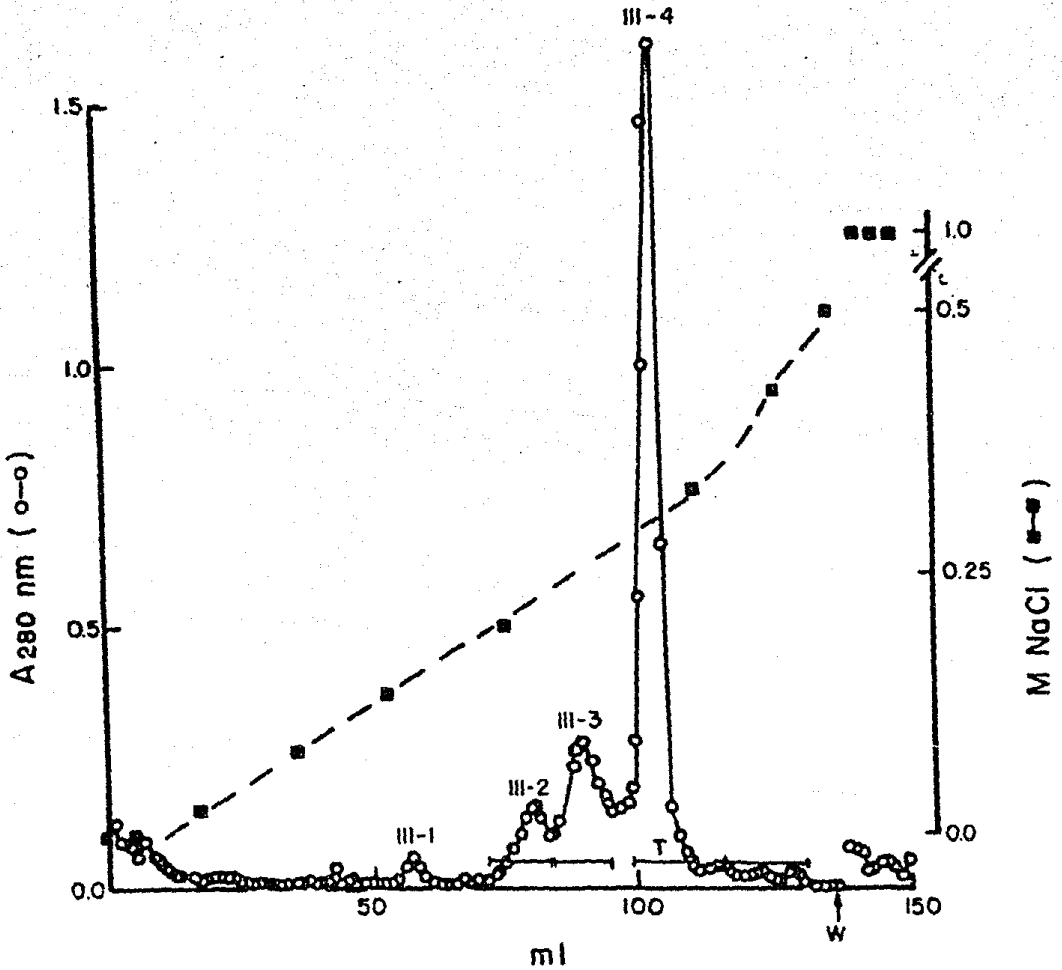


Fig. 5. Cromatografía de Intercambio Iónico de los componentes tóxicos.

La fracción III de la Fig. 4 (15.5 mg) se aplicó a una columna de CM-Sepharosa 6 Cl B (0.5 x 24 cm) equilibrada en amortiguador de acetato de amonio 20 mM, pH 4.7 y eluida con un gradiente lineal de cloruro de sodio de 0 a 0.5 M (75 ml cada uno) en el mismo amortiguador. Se colectaron fracciones de 1.2 ml a una velocidad de flujo de 9.3 ml/hr. Las barras horizontales indican las fracciones que se juntaron, cuyas recuperaciones y toxicidad se presentan en la Tabla I. W significa lavado de la columna con 1 M de cloruro de sodio.

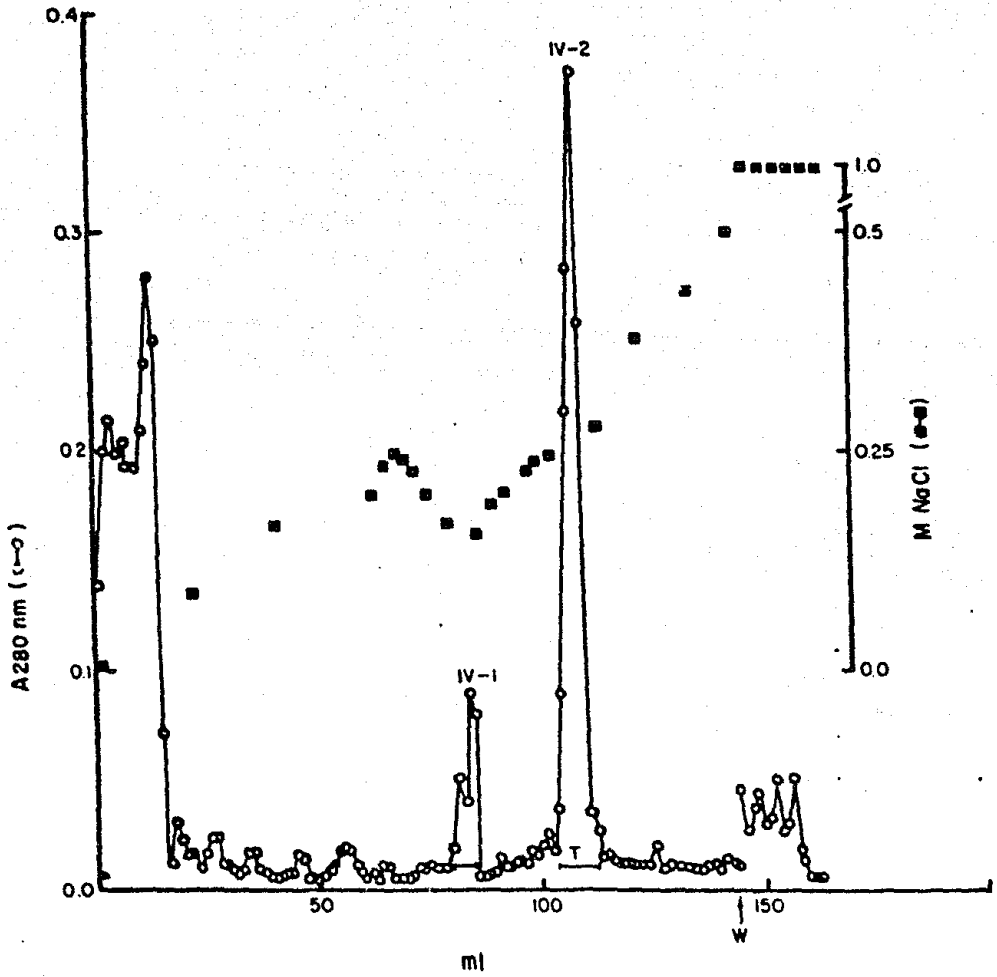


Fig 6. Cromatografía de intercambio iónico de los componentes tóxicos.

La fracción IV de la Fig. 4 (6.7 mg) se aplicó y corrió en una columna de CM-Sepharosa 6 CL B, bajo las mismas condiciones de la Fig. 5.

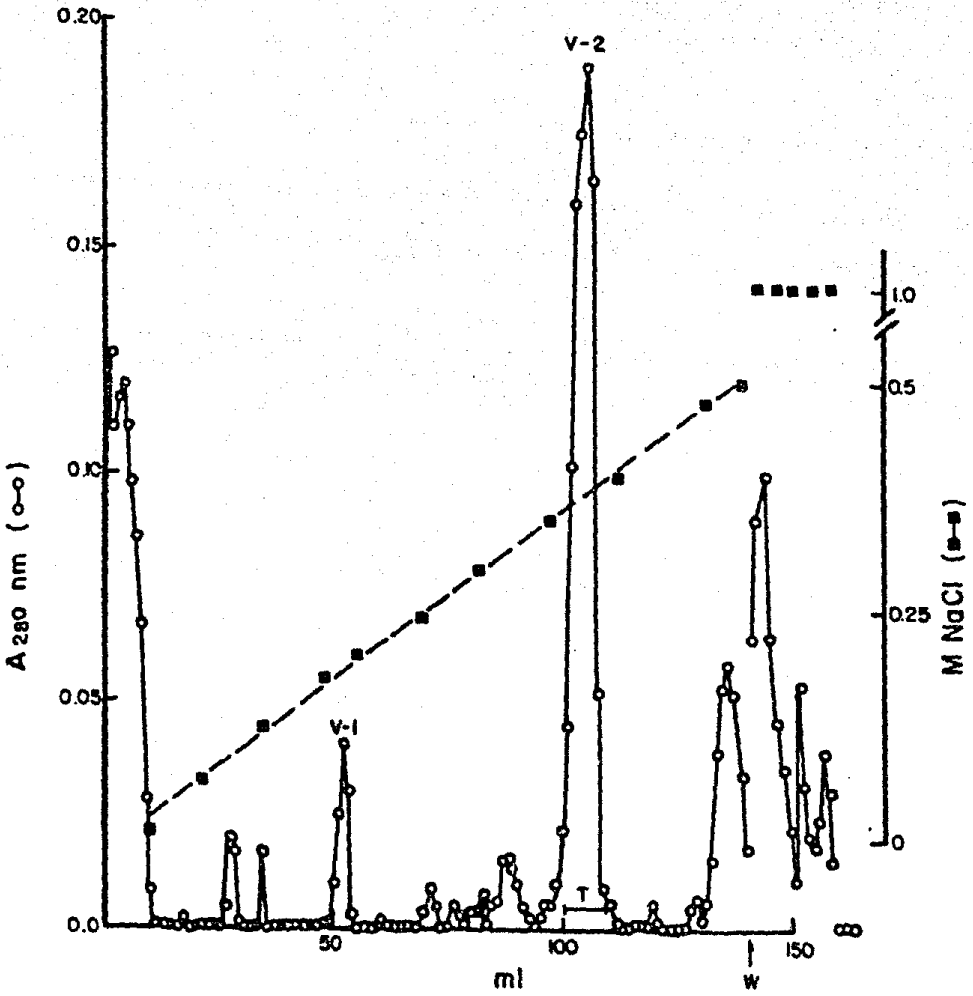


Fig. 7. Cromatografía de intercambio iónico de los componentes tóxicos.

La fracción V de la Fig. 4 (4.946 mg) se aplicó y corrió en una columna de CM-Sepharosa 6CL B, bajo las mismas condiciones de la Fig. 5.

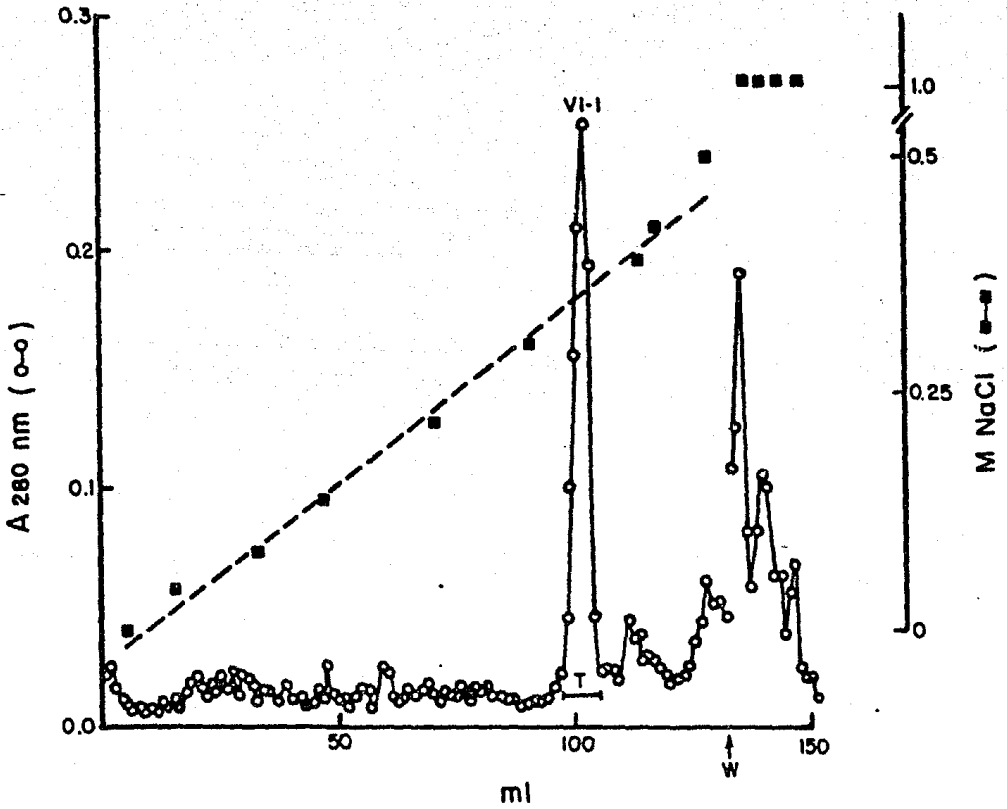


Fig. 8. Cromatografía de intercambio iónico de los componentes tóxicos.

La fracción VI de la Fig. 4 (2.74 mg) se aplicó y corrió en una columna de CM-Sephurasa 6 CL B, bajo las mismas condiciones de la Fig. 5.

Figuras 5 y 6. Se obtuvo una recuperación del 93, 92, 100 y 85% respectivamente. La Tabla I sintetiza las recuperaciones y los datos de toxicidad de los cromatogramas previos.

En electroforesis discontinua, en gel de poliacrilamida, las fracciones tóxicas mostraron más de una banda de proteína. Por lo que se efectuó una separación posterior de las fracciones más abundantes, III.4 y IV.2, cada una por separado, en una columna de Carboxi-metil-celulosa, obteniéndose siete y tres subfracciones respectivamente. Los componentes III.4.6 (Fig 9) y IV.2.3 (Fig 10) resultaron tóxicos sobre ratones albinos, mostrando una sola banda de proteína en electroforesis en gel de poliacrilamida, considerándolas por lo tanto homogéneas. Los componentes fueron denominados toxina III.4.6 y toxina IV.2.3 respectivamente. Los dos últimos cromatogramas dieron recuperaciones cuantitativas.

Caracterización de las toxinas puras.

Las toxinas puras fueron letales a concentraciones de 15 a 30 μg por 20 gramos de ratón, matando a los animales dentro de los primeros 30 minutos después de la inyección. Las toxinas III.4.6 y IV.2.3 son proteínas básicas y aparentemente corresponden, sobre el patrón de la electroforesis en gel, a las proteínas 10 y 11 respectivamente, como lo muestra la Fig. 3. La composición de aminoácidos se aprecia en la Tabla 2, donde se observan la presencia de ocho cisteínas. Los datos indican que la toxina III.4.6 contiene 60-61 residuos de aminoácidos, en tanto la toxina IV.2.3 contiene 52 aminoácidos, más las cisteínas que no fueron determinadas. El peso molecular calculado para estas toxinas fluctúa alrededor de 7000, que es semejante a otras toxinas aisladas del género Centruroides, como se observa en la Tabla 2, para fines comparativos.

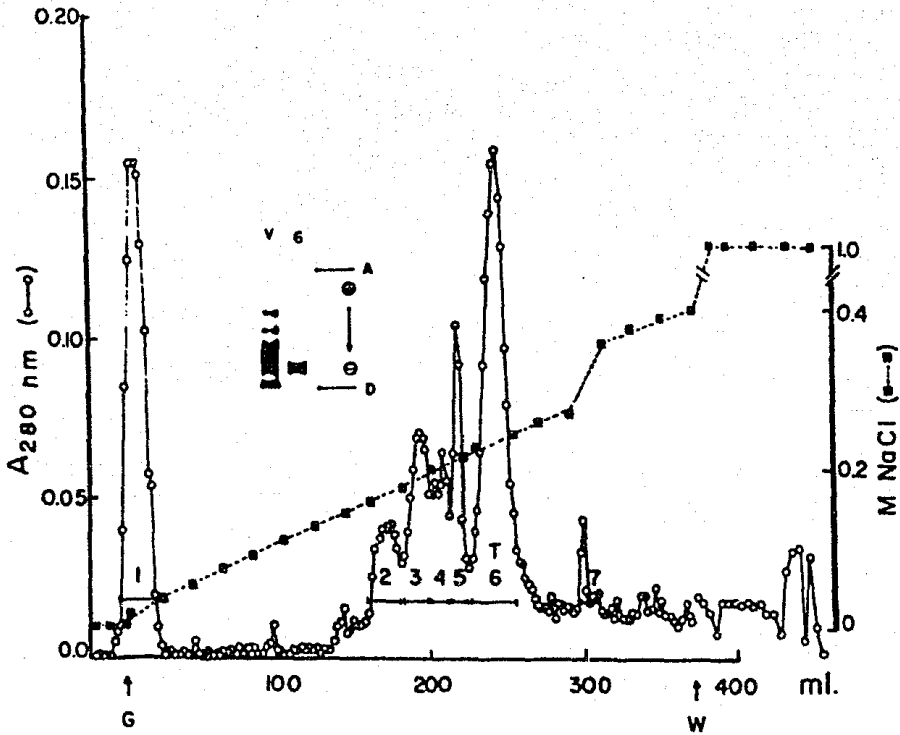


Fig. 9. Purificación de la toxina III.4.6

La fracción III.4 de la Fig. 5 (7.5 mg de proteína) se dializó y se aplicó a una columna de Carboxi-metil celulosa (0.65 x 42 cm). La columna se eluyó con un gradiente lineal (200 ml en cada compartimento), de 0 a 0.4 M de cloruro de sodio en amortiguador de acetato de amonio 20 mM, pH 4.7. La velocidad de flujo fue de 30 ml/hr y se colectaron fracciones de 2 ml. La columna se lavó con alta fuerza iónica 1 M de cloruro de sodio. Las barras horizontales indican las fracciones que se juntaron para caracterizarlas. T significa fracción tóxica, G significa principio del gradiente y W significa lavado con 1 M de cloruro de sodio.

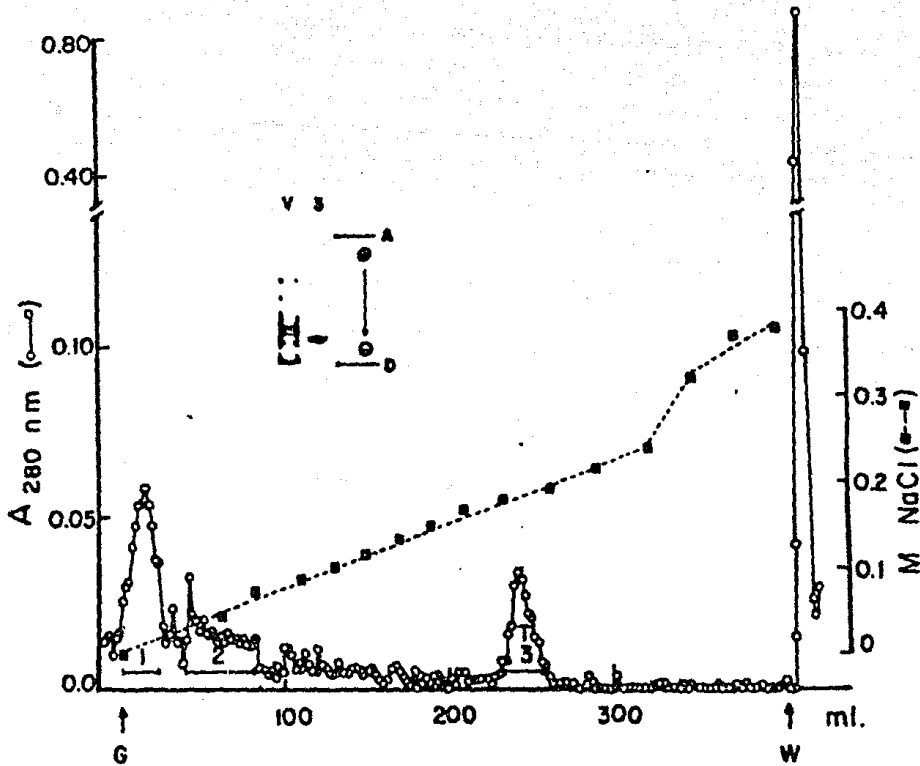


Fig. 10. Purificación de la toxina IV.2.3

La fracción IV.2 de la Fig. 6 (1.5 mg de proteína) se dializó y aplicó a una columna de Carboxi-metil celulosa, bajo las mismas condiciones de la Fig. 9. Inserto: los gels cilíndricos discontinuos de poli-acrilamida, v significa veneno soluble (80 µg proteína), 3 significa toxina IV.2.3 (20 µg de proteína), A y D se definen en la Fig. 2.

TABLA I

RECUPERACIONES Y TOXICIDAD DE LOS COMPONENTES CROMATOGRÁFICOS

Columna empleada	Componente Proteínico	Unidades de absor- bancia a 280 nm	Toxicidad*
Bio-Gel P-10 (Fig. 4)	Veneno soluble	20.6	0.26
	Fracción I	1.22	No-tóxico
	Fracción II	4.70	No-tóxico
	Fracción III	7.32	Letal
	Fracción IV	2.52	Letal
	Fracción V	2.52	Letal
	Fracción VI	1.32	Letal
	Fracción VII	0.64	No-probada
	Proteína recuperada	20.24 (98%)	
CM-Sepharosa 6 CL (Fig. 5)	Fracción III cargada	15.5	Letal
	Proteína no-unida	1.69	No-tóxico
	Fracción III.1	0.58	No-tóxico
	Fracción III.2	1.27	No-tóxico
	Fracción III.3	2.19	No-tóxico
	Fracción III.4	7.60	Letal
	Fracción III.5	0.49	No-probada
	Tubos remanentes [†]	0.68	No-probada
	Proteína recuperada	14.36 (93%)	
CM-Sepharosa 6 CL (Fig. 6)	Fracción IV cargada	6.7	Letal
	Proteína no-unida	2.40	No-tóxico
	Fracción IV.1	0.34	No-tóxico
	Fracción IV.2	1.60	Letal
	Tubos remanentes [†]	1.82	No-probada
	Proteína recuperada	6.16 (92%)	
CM-Sepharosa 6 CL (Fig. 7)	Fracción V cargada	4.946	Letal
	Proteína no-unida	0.7836	No-tóxico
	Fracción V.1	0.871	No-tóxico
	Fracción V.2	2.2176	Letal
	Fracción V.3	1.0932	No-tóxico
	Proteína recuperada	4.9 (100%)	
CM-Sepharosa 6 CL (Fig. 8)	Fracción VI cargada	2.743	Letal
	Proteína no-unida	0.907	No-tóxico
	Fracción VI.1	1.067	Letal
	Proteína recuperada	1.974 (85%)	

* La proteína se inyectó intraperitonealmente sobre ratones de 20 grs. El valor numérico en microgramos de proteína por gramo de peso de ratón (LD₅₀). Cuando se requirieron pequeñas cantidades de toxina para efectuar un ensayo cualitativo, se utilizaron 50 a 70 μ g de proteína en uno o dos ratones.

"No-tóxico" significa un comportamiento normal, semejante al inyectado con salina; "Tóxico" indica salivación, excitabilidad y disnea; y "Letal" significa parálisis respiratoria y muerte.

+ Proteína de tubos localizados fuera de los picos claros de toxina

TABLA 2

TABLA COMPARATIVA DE LA COMPOSICION DE AMINOACIDOS DE ALGUNAS DE LAS PROTEINAS TOXICAS AISLADAS DEL VENENO DE LOS ALACRANES PERTENECIENTES AL GENERO CENTRUROIDES

Aminoácidos	Especies de Alacranes*						
	C.n.III	C.n.IV	C.l.t.II	C.e.III	C.e.IV	C.s.I	C.s.s.II
ASP	5	4	5	5	5	6	5
THR	2	2	3	3	2	5	3
SER	5	9	2	2	5	2	4
GLU	8	8	7	8	5	5	7
PRO	1	1	2	2	1	3	2
GLY	8	11	8	8	6	9	6
ALA	4	4	3	3	4	0	3
1/2 CYS	5-6	- f	8	- f	4-5	8	8
VAL	2	2	3	3	2	1	3
MET	0	0	0	0	0	0	0
ILE	1	1	1	0	1	1	0
LEU	4	2	4	4-5	3	4	6
TYR	5	2	6	6	5	6	7
PHE	1	1	2	2	1	2	1
HIS	1	1	2	2	2	1	1
LYS	5	2	6	6	4	8	7
TRP	1	1	1	- f	1	2	2
ARG	2	1	2	2	2	1	1
Total	60-61	- f	65	- f	53-54	64	66
Peso							
Molecular	6,623-		7335		6378-	7285	7545
Calculado	6,725				6480		

* C.n.III = Toxina III.4.6 y C.n.IV = Toxina IV.2.3 de este trabajo;
 C.l.t.II = Toxina II.9.3 (Possani, et al, comunicación personal);
 C.e.III y C.e.IV = Toxinas III.3 y III.4 (Possani, et al 1978);
 C.s.I = neurotoxina I (Babin, et al 1975);
 C.s.s.II = Toxina II (Rochat, et al 1976).

f significa que no fue determinado.

Microscopía electrónica del telson

Se observó por microscopía electrónica un corte de aguijón donde se muestran dos de las capas de la cutícula, la exocutícula y la endocutícula, así como una capa de células cuboidales que se adhiere a la cutícula y el aculeo o conducto por donde atraviesa el veneno para ser inyectado.

Las glándulas presentan una túnica muscular estriada que se une a los apodemas de la cutícula, en el espacio intermuscular se aprecia material paracrystalino amorfo no identificado (Fig. 12 y 13). Entre el músculo y el epitelio secretor existe la matriz de tejido conectivo, la cual se encuentra compuesta por fibras de colágena, células tipo fibroblasto y núcleos de forma irregular. Estas células tienen apariencia aplanada (Fig. 14).

Se localizan entre el epitelio glandular y la cutícula una capa de células cuboidales. En la Fig. 15 se observa una de ellas y se aprecian los elementos intracelulares como núcleo, complejo de golgi y mitocondrias. Las células se interdigitan una con la otra formando una capa continua.

Existe otro tipo de células con dos tipos de cuerpos nerviosos celulares. En la Fig. 16 se muestra el tipo I con numerosas vesículas sinápticas, algunas en forma de gota, pocas mitocondrias, el complejo de golgi, así como numerosas membranas.

Dentro del epitelio secretor o glandular se pueden observar las células secretoras de veneno (Fig. 19), algunas fibras tipo-colágena o tipo-fibrina, algunos axones no mielínicos, pocas vesículas sinápticas, así como el retículo endoplásmico rugoso que es extenso y en algunos casos se encuentra altamente distendido formando una espiral. Existe también una capa de núcleos que corre a lo largo del epitelio secretor (Fig. 17 y 18).

El epitelio glandular se encuentra limitado por pliegues a manera de vello-

sidades. En la Fig. 20 se muestran las células secretoras de veneno formando los pliegues y algunos organelos, como núcleos, mitocondrias y complejo de golgi. Este epitelio termina en una cavidad amplia donde se vierte el veneno, con una capa de microvellosidades, seguido del epitelio (Fig. 21).

Los productos de secreción exhiben diferentes densidades, estructuras y tamaños; pueden ser homogéneos, granulares o reticulados. Dentro de las células secretoras los gránulos de veneno presentan membranas y una forma más homogénea (Fig. 20) a diferencia del veneno encontrado en el lumen, donde se muestra con y sin membrana, así como de diferentes formas.

A PARTIR
DE ESTA
PAGINA
FALTA DE ORIGEN

SERVICIOS DE
MICROFILMA-
CIÓN.

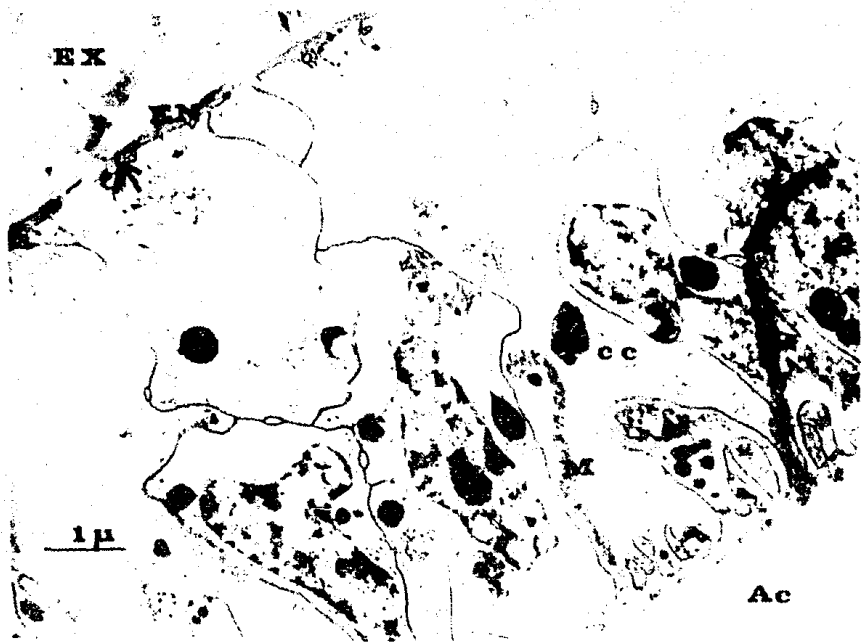


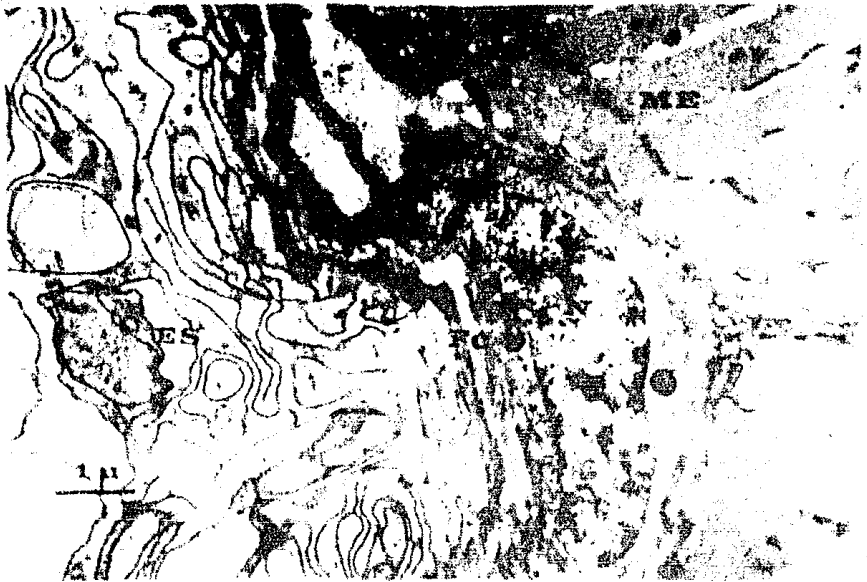
Fig. 11. Corte de Aguijón. Muestra la cutícula del telson, constituida por la exocutícula (EX) y la endocutícula (EN) formada por capas alternas de quitina y proteína. En la parte inferior se localiza una capa de células cuboidales (cc), el aculeus (Ac) y mitocondrias (M). La flecha señala una indentación de las células cuboidales con la endocutícula. De 900 x. Barra = 1 μ.



Fig. 12. Músculos estriados (Ms) y material paracristalino (PC) no identificado.



Fig. 12. Ampliación de la zona donde se localizan las estructuras paracrystalinas (PC). El inserto muestra con más detalle este material. 26,000 x. Barra = 1 μ.



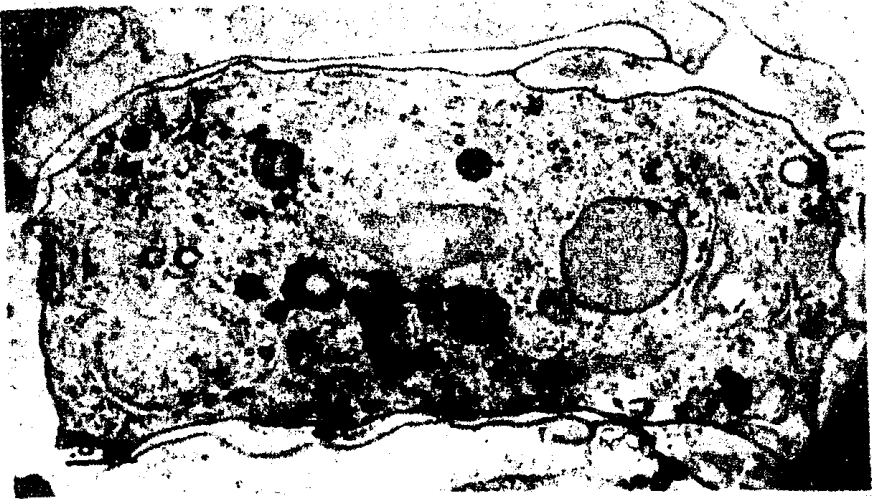


Fig. 15. célula subcelular (c.c.). Se aprecian los elementos intracelulares característicos. 27,000 x. Barra = 0.5 μ .

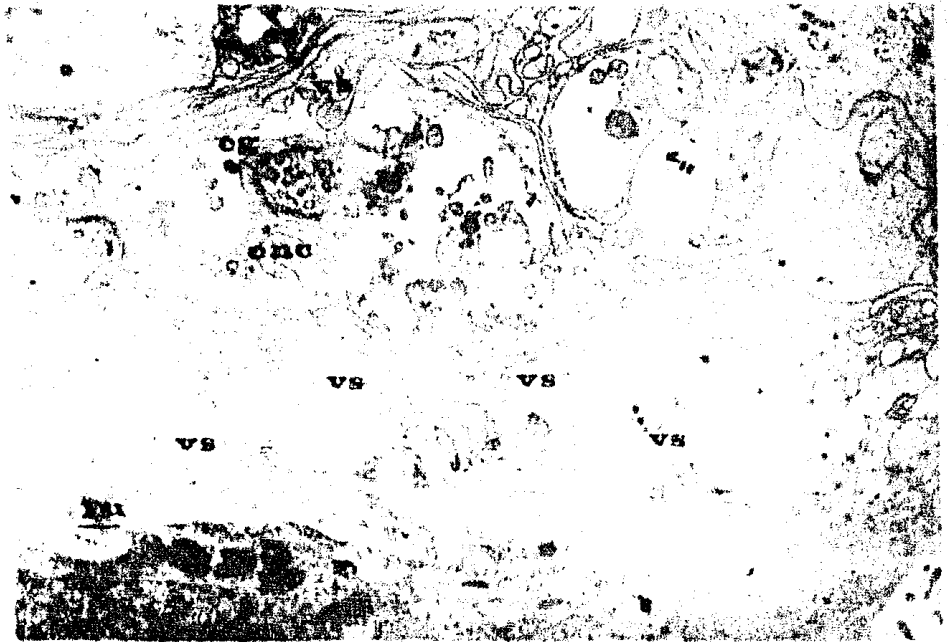


Fig. 16. Célula subcelular (c.c.) de la zona de células vivas. Se aprecian los elementos intracelulares característicos: (CG) centriolos, (CNC) nucleolo, (VS) vacuolas. Barra = 0.5 μ .

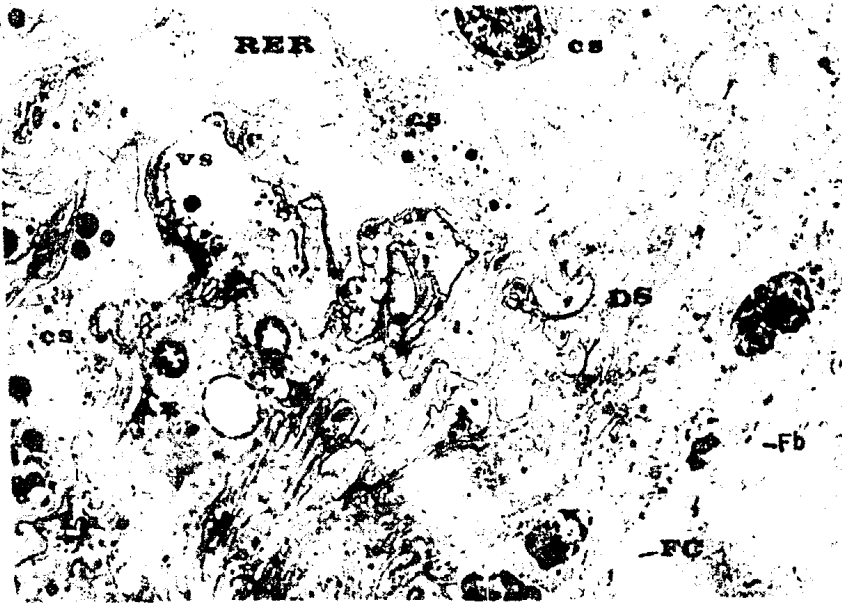


Fig. 17. Epitelio secretor. Se aprecia una célula secretora (CS), el retículo endoplasmico rugoso (RER), algunos axones nerviosos no mielínicos (Ax), vesículas sinápticas (VS), dobleces de células secretoras (DS), fibras tipo-colágena (FC), así como fibroblastos (Fb). (12,200 x - barra = 1 μ m).



Fig. 18. Lapa de núcleo (NI) dentro del epitelio secretor, cerca del lumen, de formas irregulares, con citoplasma esparcido. Se aprecian dobleces de células secretoras (DS), vesículas sinápticas (VS), axones no mielínicos (Ax), mitocondrias (M) y algunos gránulos de veneno vacuolas (GVV). (12,200 x - barra = 1 μ m).



Fig. 19. Célula secretora con núcleo redondo (NI) y granulos de veneno (GV) en el citoplasma. 16,600 x Barra = 1 μ .

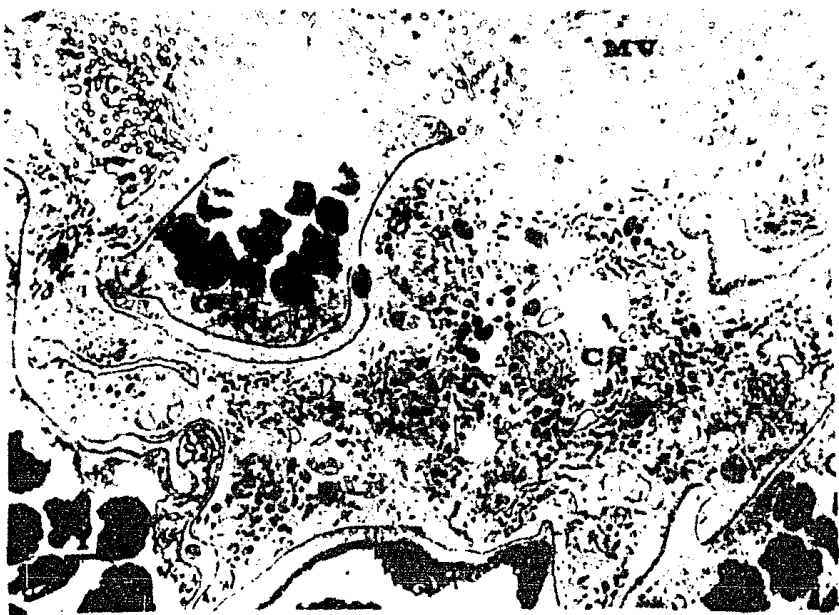


Fig. 20. Células secretoras (CS), formando grandes pliegues en toda la superficie, rodeada de microvellosidades (MV). En la parte basal existen núcleos (N) y aparatos de Golgi (CG), así como grandes granulos secretorios (GV) rodeados por membranas. 12,000 x Barra = 1 μ .

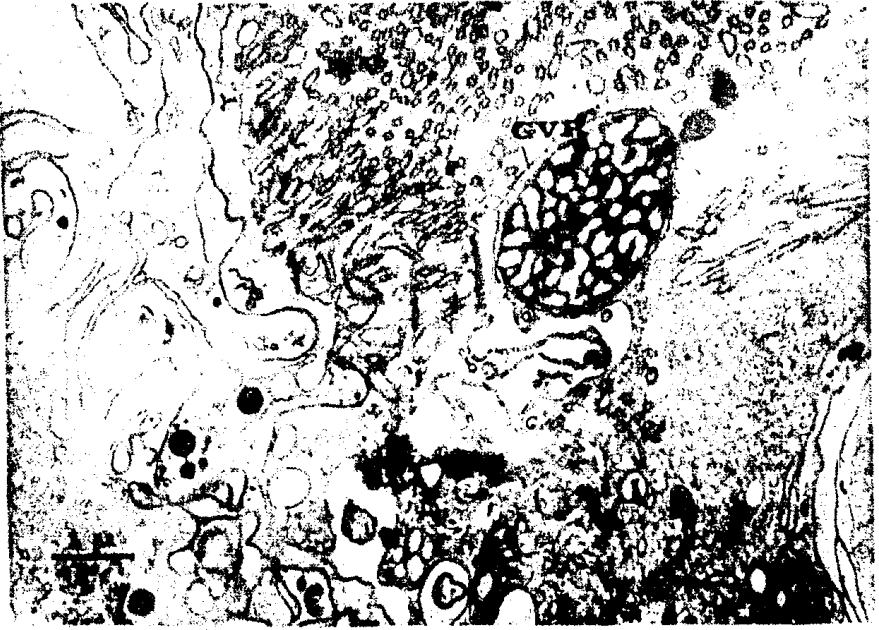


Fig. 21. Borde del epitelio secretor. Se muestran las microvellosidades (MV) y un gránulo de veneno reticulado (GVR). 16,600 x Barra = 1 u.

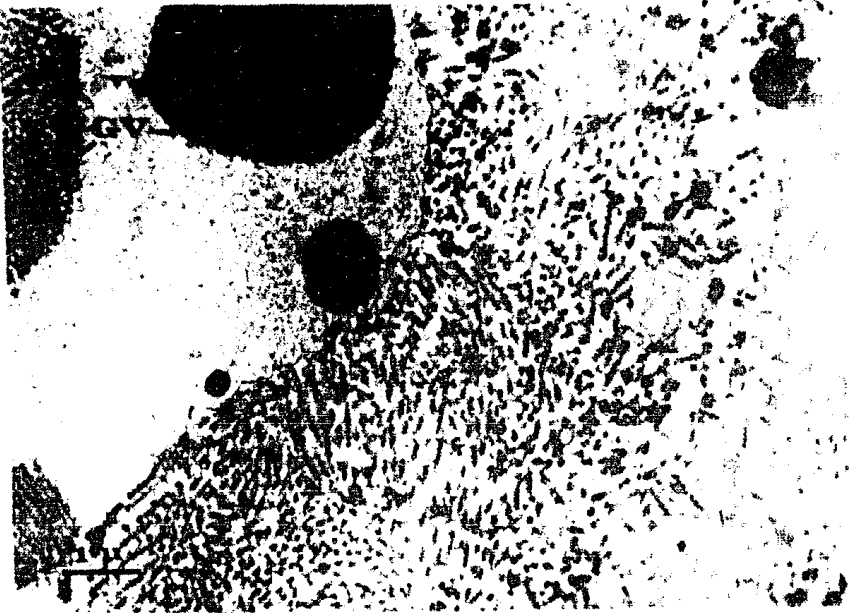


Fig. 22. Otro tipo de gránulos de veneno. (GVR) de estructura diferente a la del tipo anterior. 16,000 x Barra = 1 u.

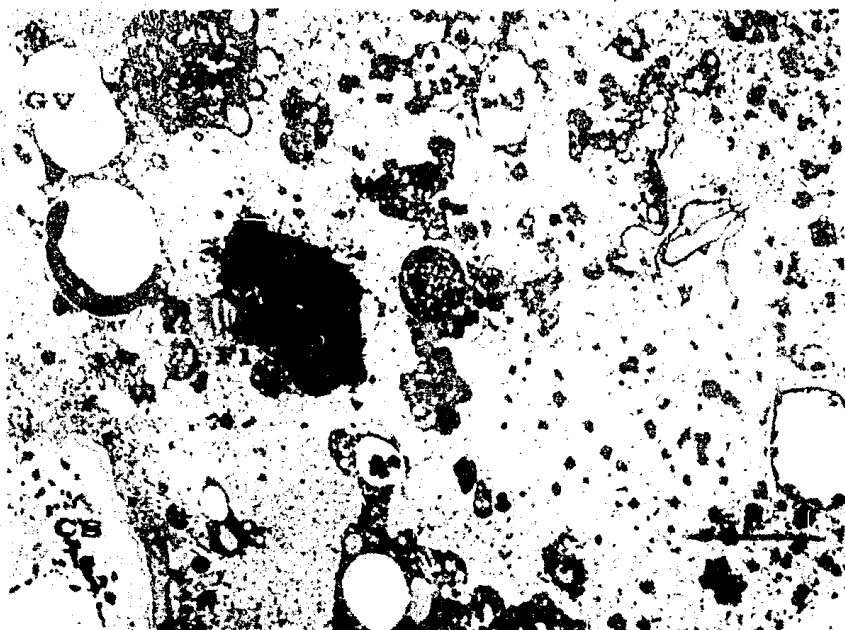


Fig. 23. Producto de secreción. Se aprecian los gránulos de veneno en formas variables y de diferentes densidades y estructuras, algunos homogéneos, granulosos o reticulados, algunos se encuentran vacíos. Se aprecian fosfolípidos (FI) mezclados con veneno formando lípidos. En la parte inferior izquierda se localiza una célula secretora sin romper (CS). 52,000 x Barra = .5 μ .

DISCUSION

El alacrán Centruroides noxius es un animal de 5 a 8 cms. de largo, es el más pequeño de los alacranes peligrosos pertenecientes al género Centruroides. Su tamaño se encuentra en relación directa con la cantidad de veneno que se obtiene en el laboratorio por alacrán (200 µg), que en comparación con las otras especies de éste género estudiados, es el que menor cantidad de veneno produce. Así, del Centruroides limpidus tecomanus se obtiene del orden de 580 µg/alacrán (Possani, et al comunicación personal), y del Centruroides elegans, que es el mayor de los tres, se obtiene del orden de 740 µg/ alacrán (Possani, et al 1978). La primera ordeña, realizada tan pronto como son capturados los alacranes en el campo, es la que se utiliza para obtener el valor del veneno producido por alacrán y se emplea para fines comparativos; dado que en cautiverio existen una serie de variables imposibles de controlar en el laboratorio, como el habitat, alimento y agua requerida por los animales en condiciones apropiadas. Esto origina un decremento en la cantidad de veneno obtenido en las subsecuentes ordeñas.

Sin embargo, a pesar de ser el Centruroides noxius, el más pequeño de los alacranes peligrosos, posee la DL₅₀ más baja, de 0.26 µg/gr de ratón, en tanto en el C. limpidus tecomanus es de 0.65 µg/gr de ratón. El veneno de ambas especies, bajo las mismas condiciones, es más tóxico que el veneno del alacrán brasileño Tytlus serrulatus Lutz & Mello, que presenta una DL₅₀ = 1.25 µg/gr de ratón (Possani, et al 1977). Estos datos apoyan el considerar al C. noxius como el más venenoso de los alacranes mexicanos (Hoffmann, 1935), dado que a menor valor de la DL₅₀, mayor es la toxicidad del veneno.

La hialuronidasa que actúa como factor dispersante, fue positiva en el veneno de C. noxius, pero la fosfolipasa y proteasa fueron negativas.

El patrón electroforético obtenido en los geles de poliacrilamida, es diferente en las tres especies estudiadas: C. noxius (12 bandas), C. limpidus tecomanus (15 bandas) y T. serrulatus (16 bandas).

De la cromatografía del veneno en Bio-Gel P-10, se obtuvieron siete fracciones, a diferencia del C. elegans donde se aprecian 4 fracciones con la misma resina (Possani, et al 1978). Sin embargo, la resolución es mayor en el veneno de C. elegans comparado con el de C. noxius, donde las fracciones se encuentran muy sobrepuestas. Esta baja resolución dificulta la interpretación en cuanto al número de toxinas presentes en el veneno total.

Cada una de las fracciones recromatografiadas por separado en CM-Sepharosa mostraron al menos un componente tóxico, III.4, IV.2, V.2 y VI.1, como se aprecia en los perfiles de los cromatogramas de las figuras 5, 6, 7 y 8 respectivamente. Las fracciones V.2 y VI.1 no se obtuvieron en forma homogénea, dada la poca cantidad de veneno disponible en cada una de ellas, en tanto las fracciones III.4 y IV.2 se purificaron hasta homogeneidad, recromatografiándolas en Carboxi-metil-celulosa. Se obtuvo un componente tóxico homogéneo de cada una, III.4.6 y IV.2.3.

La composición de aminoácidos de las toxinas III.4.6 y IV.2.3 (Tabla 2) muestra la diferencia de ambas proteínas, presentando de 60 a 61 aminoácidos y 52 aminoácidos más cisteínas respectivamente. No se tiene indicaciones de la composición de aminoácidos de las otras dos toxinas impuras V.2 y VI.1. El patrón electroforético de las toxinas puras indica que son proteínas básicas y sugiere que la toxina III.4.6 puede corresponder a la banda 10 de proteína y la toxina IV.2.3 a la banda de proteína 11 de la Fig. 3. La composición de aminoácidos muestra la ausencia de metionina en ambas toxinas, siendo consistente con las toxinas de alacranes estudiadas del género Centruroides. La presencia

de cinco o seis residuos de cisteínas en la toxina III.4.6, representa la posible existencia de tres puentes de disulfuro, a diferencia de las ocho cisteínas encontradas en la mayoría de las toxinas de alacranes. La secuencia de aminoácidos determinará el número exacto de aminoácidos. De la toxina IV.2.3 no hubo material suficiente para la determinación de cisteínas.

Comparando estos análisis con la composición de otras toxinas del mismo género (Tabla 2), existe una clara semejanza entre todas las toxinas analizadas hasta el momento. La toxina III.4.6 presenta una estrecha relación con la toxina II.9.3 del C. limpidus tecomanus y la toxina III.3 del C. elegans. La toxina IV.2.3 presenta un mayor número de serinas y glicinas y un menor número de residuos de lisina y tirosina en comparación con las otras toxinas caracterizadas.

Sin embargo, el análisis de aminoácidos de todas las toxinas del veneno del C. noxius, y eventualmente la determinación de las secuencias de éstas deben de ser obtenidas antes de establecer el número exacto de toxinas para mamíferos presentes en este veneno.

La simetría de los picos de toxicidad obtenidos por cromatografía y la presencia de una sola banda de proteína en electroforesis discontinua, son elementos fisicoquímicos utilizados como criterios necesarios, pero no suficientes, para asegurar la homogeneidad de dichas toxinas. Si bien, el análisis de aminoácidos proporciona los elementos necesarios para establecer la homogeneidad de las proteínas como son: el número de aminoácidos de cada toxina alrededor del entero y ausencia de algunos aminoácidos como la metionina. La ausencia de uno o varios aminoácidos se considera como un buen criterio de pureza de la proteína, dado que en preparaciones de toxinas impuras se encuentran presentes todos los aminoácidos. Sin embargo, el análisis de la se-

cuencia de aminoácidos es el que confirma la pureza de estas proteínas.

Así, un estudio posterior sobre la secuencia de aminoácidos de las toxinas corroborará la homogeneidad de las toxinas; mostrará las posibles homologías existentes entre las diferentes especies del género Centruroides y la comparación con otros géneros, su utilización para estudios sobre la relación entre la estructura y la función de estos polipéptidos, así como su posible utilización como herramientas para estudios sobre filogenia, zoogeografía y taxonomía.

El veneno del alacrán se localiza en un par de glándulas en el interior del telson. La cutícula del telson se compone de tres capas superpuestas: la epicutícula o capa más externa que es laxa, la exocutícula o capa media que es homogénea en cuanto a su estructura y composición y la endocutícula o capa interna formada por capas alternas de quitina y proteína (Sámano y Gómez, 1964). Sólo las dos últimas se aprecian en la Fig. 11.

La túnica muscular estriada corresponde con la observada en C. sculpturatus (Mazurkiewicz y Bertke, 1972), pero el material paracrystalino del espacio intermuscular no lo mencionan, probablemente sea material proteínico.

La glándula del veneno del C. noxius (Hoffmann) presenta pliegues en forma de saco en el lado opuesto a la cutícula (Fig. 20), en tanto que el epitelio sobre la cutícula forma una capa sencilla (Fig. 11).

En C. sculpturatus se localizan entre las células cuboidales y el epitelio secretor, vasos de hemolinfa, delimitados por células planas y por una capa de estructuras filamentosas que cubren los vasos. Ninguna estructura igual o semejante se encontró en C. noxius.

Los axones nerviosos no mielínicos asociados a las células epiteliales concuerda con las observaciones sobre las glándulas del veneno de C. sculptu-

ratus y Latrodectus mactans (Jirifors, et al 1969), las cuales posiblemente actúan como un sistema efector inervado con respecto a la fuente nerviosa motora.

Los diferentes tipos estructurales de veneno, que difieren tanto en densidad como en estructura, probablemente se mezclen cuando el veneno es inyectado. Como se observa en las Figuras 22 y 23 en el sitio de almacén extracelular para el veneno o lumen, no se localizan organelos celulares, esto significa que no es un mecanismo de secreción holócrina.

En C. sculpturatus (Mazurkiewics y Bertke, 1972) se encontró que el veneno extraído y fijado inmediatamente presenta la misma forma y estructura que el que se encuentra en las células secretoras.

BIBLIOGRAFIA

1. Babin, D.R., Watt, D.D., Goos, S.M. y Mlejnek, R.V. (1974) Amino Acid Sequence of Neurotoxic Protein Variants from the Venom of Centruroides sculpturatus Ewing. Arch. Bioch. Bioph. 164: 694-706.
2. Babin, D.R. Watt, D.D., Goos, S.M. y Mlejnek, R.V. (1975) Amino Acid Sequence of Neurotoxin I from Centruroides sculpturatus Ewing. Arch. Bioch. Bioph. 166: 125-134.
3. Baerg, W.J. (1928) Some Poisonous Arthropods of North and Central America Transaction of IV International Congress of Entomology Vol 11: 418-438.
4. Balozet, L (1971) "Scorpionism in the old world", In Venomous Animals and their Venoms. Eds. W. Bücherl and E. Buckley. Vol III Academic Press, New York, pp 349-371.
5. Benoit, P.R. y Mambrini, J. (1967) Action of scorpion venom on the Neuromuscular junction of frogs. J. Physiol. (Paris) 59: 348.
6. Bravo-Becherelle, M.A. y Mazzotti, L. (1961) Distribución Geográfica de la Mortalidad por Picadura de Alacrán en México. Rev. Inst. Sal. Enf. Trop. (Méx.) 21 (3-4): 129-140.
7. Bücherl, V. (1971) "Classification, Biology and Venom Extraction of Scorpions", in Venomous Animals and their Venoms. Eds. W. Bücherl and E. Buckley, Vol III. Academic Press, New York, pp 317-347.
8. Cahalan, M.D. (1975) Modification of Sodium Channel Gating in Frog Myelinated Nerve Fibres by Centruroides sculpturatus Scorpion Venom. J. Physiol 244: 511-534.
9. Catterall, W.A. y Morrow, C.S. (1978) Binding of Saxitoxin to Electrically Excitable Neuroblastoma Cells. Prox. Natl. Acad. Sci. USA 75 (1): 218-222.
10. Celeste H. M., Gazzinelli, G., Diniz, C.R. y Gómez, M.V. (1968) Effect of the Venom of the Scorpion Tityus serrulatus on Adrenal Gland Catecholamines. Toxicon 5: 175-179.
11. Claude, A. y Fullam, E.F. (1946) The Preparation of Sections of Guinea Pig Liver for Electron Microscopy. J. Exp. Med. 83: 499-503.
12. Clavijero, F.J. (1780) Historia Antigua de México. Publicado por Editorial Porrúa, S.A., México. 5a. ed. pp 41 (1976).
13. Corrado, A.P., Riccio Netto, F. y Antonio, A. (1974) The Mechanism of the Hypertensive effect of Brazilian Scorpion Venom (Tytlus serrulatus Lutz & Mello). Toxicon 12: 145-150.

14. Cunha Melo, J.R., Freire-Maia, L., Tafuri, W.L. y Maria, T.A. (1973) Mechanism of Action of Purified Scorpion Toxin on the Isolated Rat Intestine. *Toxicon* 11: 81-84.
15. Del Pozo, E.C., Anguiano, G. y González, J. (1944) Acciones del Veneno de Alacrán sobre el Sistema Vaso-Motor. *Rev. Inst. Sal. Enf. Trop. (Méx)* 5 (4): 227-240.
16. Del Pozo, E.C., González, Q. y Méndez, T.H. (1945) Acciones del Veneno del Alacrán sobre el Aparato Respiratorio. *Rev. Inst. Sal. Enf. Trop. (Méx)* 6 (2): 77-84.
17. Del Pozo, E.C. (1962) Estudios experimentales sobre las acciones del Veneno del Alacrán. *Rev. Inst. Sal. Enf. Trop. (Méx)* 22 (3-4): 173-178.
18. Díaz Nájera, A. (1970) Contribución al conocimiento de los Alacranes de México (Scorpionida). *Rev. Inv. Sal. Publ. (Méx)* 30 (2): 111-122.
19. Diniz, C.R.; Pimenta, A.F., Coutinho Netto, J., Pompolo, S., Gómez, M.V. y Bohm, G.M. (1974) Effect of Scorpion Venom from Tityus serrulatus (Tityustoxin) on the Acetylcholine Release and Fine Structure of the Nerve Terminals. *Experientia* 30: 1304-1305.
20. Erickson, B.W. (1978) "Sequence Homology of Snake, Scorpion and Bee Toxins" *in* *Toxins: Animal, Plant and Microbial* (Proceed V Intern. Sym) Ed. P. Rosenberg. Pergamon Press, Oxford, New York.
21. Flores, R. (1963) Observaciones sobre la Sintomatología y Tratamiento de la Intoxicación por Picadura de Alacrán. *Rev. Ins. Sal. Enf. Trop. (Méx)* 23 (3,4): 175-178.
22. Freire-Maia, L., Azevedo, A.D. y Costa Val, V.P. (1973) Respiratory Arrhythmias produced by Purified Scorpion Toxin. *Toxicon* 11: 255-257.
23. Furst, P. y Nahmad, S. (1972) Mitos y arte Hulcholes. Sep Setentas, Méx.
24. Ghazal, A., Ismail, M y Abdel-Rahman, A.A. (1975) Pharmacological Studies of Scorpion (Androctonus amoreuxi Aud & Sav) Venom. *Toxicon* 13: 252-259
25. Glenn, A., Both, G., McInness, J., May, B. y Elliot, W. (1973) Dynamic State of the Messenger RNA pool Specific for Extracellular Protease in Bacillus amyloliquefaciens: Its relevance to the Mechanism of Enzyme Secretion. *J. Mol Biol.* 73: 221.
26. Gómez, M.V. y Diniz, C.R. (1966) Separation of Toxic Components from the Brazilian Scorpion -Tytius serrulatus- Venom. *Mem Inst. Butantan Simp. Internac.* 33 (3): 899-902.
27. Gómez, M.V., Dai, M.E. y Diniz, C.R. (1973) Effect of Scorpion Venom, Tytiustoxin, on the Release of Acetylcholine form Incubated Slices of Rat Brain. *J. Neur.* 20: 1051-1961.

28. González, M.M. (1945) Notas sobre los Alacranes más Venenosos de la República. Rev. Mex. Cienc. Med. Biol. 3 (21): 41-45.
29. Habermann, E. (1972) Bee and Wasp Venoms. Science 177: 314-322.
30. Hoffmann, C. y Vargas, R. (1935) Contribuciones al conocimiento de los Venenos de los Alacranes Mexicanos. Ins Hig. 2 (4): 182-193.
31. Hoffmann, C. (1938) Nuevas Consideraciones acerca de los Alacranes Mexicanos. An. Inst. Biol. 9 (1,2): 318-337.
32. Hoffmann, C. y Nieto Roaro, D. (1939) Segunda Contribución al Conocimiento de los Venenos de los Alacranes Mexicanos. An. Ins. Biol. 10: 83-92.
33. Hugli, T.E. y Moore, S. (1972) Determination of the Tryptophan Content of Proteins by Ion Exchange Chromatography of Alkaline Hydrolysates. J. Biol. Chem. 247: 2828.
34. Ismail, M., Kertesz, G., Osman O.H. y Sidra, M.S. (1974a) Distribution of ¹²⁵I Labelled Scorpion (Leiurus quinquestriatus H & E) Venom in Rat Tissues. Toxicol 12: 209-211.
35. Ismail, M., Osman, O.H., Gumaa, K.A. y Darrar, M.A. (1974b) Some Pharmacological Studies with Scorpion (Pandinus exultans) Venom. Toxicol 12: 75-82.
36. Jirifors, U., Smith, D. y Russel, F. (1969) Nerve endings in the Venom Gland of the Spider Latrodectus mactans. Toxicol 7: 263-265.
37. Karlsson, E. (1973) Chemistry of Some Potent Animal Toxins. Experientia 29: 1319-1327.
38. Katz, N.L. y Edwards, C. (1972) The effect of Scorpion Venom on the Neuromuscular Junction of the Frog. Toxicol 10: 133-137.
39. Kopeyan, Ch., Martfnez, G., Lissitzky, S., Miranda, F. y Rochat, H. (1974) Disulfide Bonds of Toxin II of the Scorpion Androctonus australis Hector Eur. J. Biochem. 47: 483-489.
40. Koppenhofer, E. y Schmidt, H. (1968) Incomplete Sodium Inactivation in Nodes of Ranvier Treated with Scorpion Venom. Experientia 24: 41-42.
41. Lima, E.G., Almeida, H.O., Gómez, M.V. y Freire-Maia, L (1975) Acute Pulmonary Edema Induced by Injection of Tityustoxin into the Lateral Ventricles of Rats. Toxicol 13: 205-206.
42. Linden, C.F. y Raftery, M.A. (1976) Isolation of a Scorpion Toxin for use as a Probe of Electrically Excitable Sodium Channel. Bloch. and Bioph. Res. Comm. 72 (2): 646-653.

43. Luft, J.H. (1961) Improvements in Epoxy Resin Embedding Methods. J. Bioph. Biochem. Cytol. 9: 409-414.
44. Mazurkiewics, J. y Berthe, E. (1972) Ultrastructure of the Venom Gland of the Scorpion Centruroides sculpturatus (Ewing). J. Morph. 137: 365-384.
45. Mazzoti, L. y Bravo-Becherelle, M.A. (1961) Escorpionismo en la República Mexicana. Rev. Ins. Sal. Enf. Trop. (Méx) 21 (1-2): 3-19.
46. McInstosh, M y Watt, D. (1973) "Purification of toxins from the North American scorpion Centruroides sculpturatus", in Toxins of Animal and Plant Origin. Eds. A. DeVries and E. Kochva, Vol 2, Gordon and Breach, New York pp. 529-544.
47. Miranda, F., Kupeyan, Ch., Rochat, H., Rochat, C. y Lissitzky, S. (1970) Purification of Animal Neurotoxins. Isolation and Characterization of Eleven Neurotoxins from the Venoms of the Scorpions Androctonus australis Hector, Buthus occitanus tunetanus and Leiurus quinquestriatus quinquestriatus. Eur. J. Biochem. 16: 514-523.
48. Mohamed, A.H., Kamel, A. y Ayobe, M.H. (1969a) Studies of Phospholipase A and B Activities of Egyptian Snake Venoms and a Scorpion Toxin. Toxicon 6: 293-298.
49. Mohamed, A.L.H., Kamel, A. y Ayobe, M.H. (1969b) Some Enzymatic activities of Egyptian Snake Venoms and a Scorpion Venom. Toxicon 7: 185-188.
50. Moore, L. y Fischer, A. (1952) Invertebrate Fossils. Mc Graw-Hill.
51. Moore, S. (1963) On the Determination of Cystine and Cistic Acid. Biol. Chem. 238: 235.
52. Moss, J., Thoa, N.B. y Kopin, I.J. (1974) On the Mechanism of Scorpion Toxin Induce release of Norepinephrine from Peripheral Adrenergic Neurons. J. Pharm. Exp. Ther. 190 (1): 39-48.
53. Navarro, D.G., Guzmán, O.R., Campillo, S.C. y Vizcalno, M.F. (1975) Control de Enfermedades Transmisibles. Intoxicaciones por animales ponzoñosos terrestres. Subsecretaría de Salubridad, México. pp. 477-481.
54. Patterson, R.A. (1960) Physiological action of Scorpion Venom. Am. J. Trop. Med. Hyg. 9: 410.
55. Possani, L.D., Alagón, A.C., Fletcher, P.L. Jr y Erickson, B.W. (1977) Purification and Properties of Mammalian Toxins from the Venom of the Brazilian Scorpion Tityus serrulatus Lutz and Mello. Arch. Bioch. Bioph. 180: 394-403.
56. Possani, L.D., Ramírez, G.A., Fletcher, P.L. Jr y Gurrola, M.A. (1978) Isolation of two Mammalian Toxins from the Venom of the Mexican Scorpion Centruroides elegans (Thorell). FEBS Letters 91 (2): 261-264.

57. Rathmayer, W., Ruhland, M., Tintpolver, M., Walther, Ch y Zlotkin, E. (1978) "The Effect of Toxins derived from the Venom of the Scorpion Androctonus australis Hector on Neuromuscular Transmission", in Toxins Animal, Plant and Microbial. Ed. P. Rosenberg. Pergamon Press. pp 629-637.
58. Reisfeld, R.A., Lewis, U.J. y Williams, D.E. (1962) Disk Electrophoresis of Basic Proteins and Peptides on Polyacrylamide Gels. Nature, Lond. 195: 281.
59. Rochat, H., Rochat, C., Miranda, F., Lissitzky, S. y Edman, P. (1970a) The Amino Acid Sequence of Neurotoxin I of Androctonus australis Hector. Eur. J. Bioch. 17: 262-266.
60. Rochat, H., Rochat, C., Kopeyan, C., Miranda, F., Lissitzky, S. y Edman, P. (1970b) Scorpion Neurotoxins: a Family of Homologous Proteins. FEBS Letters 10 (5): 349-351.
61. Rochat, H., Rochat, C., Sampieri, F. y Mirnda, F. (1972) The Amino-Acid Sequence of Neurotoxin II of Androctonus australis Hector. Eur. J. Biochem. 28: 281-388.
62. Rochat, C. y Sampieri, F. (1976) Structure-Function Relationships of Scorpion Neurotoxins. Biochemistry 15 (11): 2254-2261.
63. Romey, G., Chicheportich, R. y Lazdinsky, M. (1975) Scorpion Neurotoxin - A Presynaptic Toxin which Affects both Na⁺ and K⁺ Channels in Axons. Bioch. Bioph. Res. Comm. 64 (1): 115-121.
64. Romey, G., Abita, J.P., Chicheportiche, R., Rochat, H. y Lazdunsky, M. (1976) Scorpion Neurotoxin Mode of Action on Neuromuscular Junctions and Synaptosomes. Bioch. Bioph. Acta 448: 607-619.
65. Rossi, MA.A, Ferreira, A.L., Paiva, S.M. y Santos, J.C.M. (1973) Myonecrosis Induced by Scorpion Venom. Experientia 29: 1272-1274.
66. Russel, F.E. (1966) Phosphodiesterase of some Snake and Arthropod Venoms. Toxicon 4: 153-154.
67. Sabatini, D.D., Bensch, K. y Barnett, R.J. (1963) Cytochemistry and Electron Microscopy. The Preservation of Cellular Ultrastructure and Enzymatic activity by Aldehyde Fization. J. Cell Biol. 17: 19-58.
68. Samano, A. y Gómez de Ferrez, M. (1964) Estudio Morfológico, Histológico e Histoquímico de la Glándula Venenosa de algunas Especies de Alacranes de los Géneros Vejovis C.L. Kock, Diplocentrus Peters y Centruroides Marx. An. Inst. Biol (Méx) 35: 139-155.
69. Selvarajan, V.R., Narayana Reddy, K. y Swami, K.S. (1975) Scorpion Venom Effects on Succinate Dehydrogenase Activity of Sheep Tissues. Toxicon 13: 143-144.

70. Shiloah, J., Klibansky, C., deVries, A. y Berger, A. (1973) Phospholipase B Activity of a Purified Phospholipase A from Vipera palestinae Venom. J. Lipid Res. 14: 267-278.
71. Smythies, J.R., Benington, F., Bradley, R.J., Bridgers, W.F. y Morin, R.D. (1974) On the Molecular Mechanism of Action of Scorpion Neurotoxin II from Androctonus australis Hector. J. Theor. Biol. 43: 65-72.
72. Tintpulver, M., Zerachia, T. y Zlotkin, E. (1976) The Action of Toxin derived from Scorpion Venom on the Ileal Smooth Muscle Preparation. Toxicon 14: 371-377.
73. Toledo, D. y Neves, A. (1976) Purification and Partial Characterization of a Second Toxin from the Scorpion Tityus serrulatus. Comp. Biochem. Physiol. 55b: 249-253.
74. Tolksdorf, S., McCready, M.H., McCullagh, D.R. y Schwenk, E. (1949) The Turbidimetric Assay of Hyaluronidase. J. Lab. Clin. Med. 34: 74-89.
75. Tu, A.T. (1977) "Scorpion Venoms" in Venoms Chemistry and Molecular Biology Ed. Tu, A.T. John Willey and Sons, New York. pp 459-483.
76. Vachon, M. (1953) La Biología de los Escorpiones. Endeavour 12 (46): 80-89.
77. Watt, D.D., Babin, D.R. y Jlejnek, R.V. (1974) The Protein Neurotoxins in Scorpion and Elapid Snake Venoms. J. Agr. Food Chem. 22 (1): 43-51.
78. Zlotkin, E., Rochat, H., Kopeyan, C., Miranda, F. y Lissitzky, S. (1971) Purification and Properties of the Insect Toxin from the Venom of the Scorpion Androctonus australis Hector. Bioch. 53: 1073-1078.
79. Zlotkin, E. (1973) Chemistry of Animal Venoms. Experientia 29 (12): 1453-1588.
80. Zlotkin, E. (1976) "A Protein from Scorpion Venom Toxic to Crustaceans" in Animal, Plant and Microbial Toxns. Ed. A. Ohsaka, K. Hayashi & Y. Sawai Plenum Press, New York and London. pp 73-79.