

# Efecto de la Carbamilcolina y el veneno de escorpión *Tityus zulianus* en la secreción de proteínas de los acinos pancreáticos aislados de ratón NIH

Ernesto José Trejo <sup>1</sup>.

Itala Lippo de Bécemberg <sup>2</sup>.

Katiuska María Saravia Cruces <sup>3</sup>.

Andrés Eloy Rodríguez <sup>4</sup>.

Marcelo José Alfonzo Rosas † <sup>5</sup>.

<sup>1</sup>PhD Profesor e Investigador Agregado Cátedra de Fisiopatología, Escuela Luis Razzetti, Facultad de Medicina, Universidad Central de Venezuela (UCV)

<sup>2</sup>Doctora en Ciencias Médicas Profesora e Investigadora Titular Jubilada de la Cátedra de Fisiopatología, Escuela Luis Razzetti, Facultad de Medicina, UCV. Exdirectora del IME. Actualmente Jefa de la Sección de Biomembranas del IME.

<sup>3</sup>Farmacéutica Profesora e Investigadora Instructora de la Sección de

Biomembranas del IME, Facultad de Medicina, UCV.

<sup>4</sup>Médico Veterinario Profesor e Investigador Asistente. Cátedra de Fisiología.

Facultad de Ciencias Veterinarias, UCV.

<sup>5</sup>PhD Profesor e Investigador Titular de la Cátedra de Fisiopatología.

Escuela Luis Razzetti, UCV. Exdirector del IME

Correspondencia: Instituto de Medicina Tropical - Facultad de Medicina - Universidad Central de Venezuela.

Consignado el 22 de Julio del 2018 a la Revista Vitae Academia Biomédica Digital.

## RESUMEN

El envenenamiento accidental con el escorpión *Tityus zulianus* (Tz) produce manifestaciones clínicas principalmente cardiopulmonares. Sin embargo, en modelos experimentales con ratones BALB/c se ha demostrado que el veneno de Tz (TzV) produce daño pancreático y aumento de las concentraciones séricas de catecolaminas. El objetivo de este estudio es determinar los mecanismos fisiopatológicos asociados a la hiperestimulación autonómica que conduce al desarrollo de la pancreatitis en un modelo experimental de acinos pancreáticos aislados. Los acinos pancreáticos se obtuvieron a partir de pancreata de ratón sometida a la digestión con collagenasa, con lo cual se separan los acinos que posteriormente se mantienen en baño térmico. Una vez estabilizados los acinos, se aplicaron tratamientos con carbamilcolina (Cch) y/o TzV a diferentes concentraciones para evaluar la secreción de proteínas en una curva concentración respuesta. Los niveles de proteínas y tripsina se determinaron por espectrofotometría. Los resultados muestran que tanto la Cch (5-30 $\mu$ M) como el TzV (2,5-128,5 $\mu$ g/ml) incrementan significativamente de forma dependiente de la concentración la liberación de proteínas al medio extracelular. Adicionalmente, se observó que al administrar en forma conjunta, Cch 10  $\mu$ M y TzV 128,5  $\mu$ g/ml se produce un efecto sinérgico (180 $\pm$ 2%), el cual consiste en un incremento superior a lo observado cuando se aplican de manera individual. En conclusión, el TzV incrementa significativamente la secreción de proteínas ya sea de forma individual o en combinación con la Cch, con lo cual se mimetizan los efectos del neurotransmisor endógeno acetilcolina (Ach).

**PALABRAS CLAVE:** acinos pancreáticos, *Tityus zulianus*, carbamilcolina, veneno de escorpión, secreción de proteínas.

## SUMMARY

Accidental poisoning with the scorpion *Tityus zulianus* (Tz) produces mainly cardiopulmonary clinical manifestations. However, in experimental models with BALB/c mice it has been shown that the venom of Tz (TzV) causes pancreatic damage and increased serum catecholamines values. The objective of this study is to determine the pathophysiological mechanisms associated with autonomic hyperstimulation leading to the development of pancreatitis in an experimental model of isolated pancreatic acini. The pancreatic acini were obtained from mouse pancreata subjected with collagenase digestion, whereby the acini are separated and subsequently kept in a thermic bath. The stabilized acini were treated treatments with different concentration carbamylcholine (Cch) and / or TzV to evaluate the secretion of

proteins in a concentration response curve. Protein levels were determined by spectrophotometry. The results show that both the Cch (5-30 $\mu$ M) and the TzV (2.5-128.5 $\mu$ g / ml) significantly increase the release of proteins to the extracellular medium of concentration-dependent of Cch and TzV. Synergistic effect were observed with the combinations Cch 10  $\mu$ M and TzV 128.5  $\mu$ g/ml in this order with any increment of 180  $\pm$  2%proteins secretion. In conclusion, TzV significantly increases protein secretion either or in combination with Cch, which mimics the effects of the endogenous neurotransmitter acetylcholine (Ach).

**KEY WORDS:** Pancreatic acini, *Tityus zulianus*, carbamylcholine, scorpion venom, protein secretion.

## **EFFECTO DE LA CARBAMILCOLINA Y EL VENENO DE ESCORPIÓN *TITYUS ZULIANUS* EN LA SECRECIÓN DE PROTEÍNAS DE LOS ACINOS PANCREÁTICOS AISLADOS DE RATÓN NIH**

### **INTRODUCCIÓN**

p.p1 {margin: 0.0px 0.0px 0.0px 0.0px; font: 11.5px Arial} span.s1 {font: 8.0px Arial}

La evolución del envenenamiento escorpiónico puede cursar con el desarrollo de una variedad de síntomas que desencadenan síndromes que pueden comprometer la vida de los pacientes cuando no se administra el tratamiento adecuado. En Venezuela, la mayoría de los escorpiones del género *Tityus* (familia Buthidae) producen cuadros sintomáticos severos (1,2). El *Tityus zulianus* (Tz), que habita regiones del Sur del Lago de Maracaibo y el Norte del estado Mérida(3) produce envenenamientos con síntomas principalmente cardiorespiratorios que se asocian a una hiperestimulación autonómica (4).

En modelos experimentales *in vivo*, con ratones BALB/c, se ha demostrado que el veneno de Tz (TzV) es capaz de producir hiperestimulación autonómica: sialorrea; diarrea; parálisis espásticas en miembros posteriores a lo cual se suma el desarrollo de pancreatitis aguda (5).

El objetivo del presente estudio es determinar la secreción de proteínas al medio extracelular en un modelo experimental *in vitro* constituido por la suspensión de acinos pancreáticos de ratones provenientes del National Institutes of Health (NIH). Esta secreción será inducida por un análogo de neurotransmisor endógeno denominado carbamilcolina (Cch) y por el TzV en curvas concentración - respuestas. Además, se determinará si existen efectos sinérgicos o potenciadores cuando ambos componentes se administran en conjunto.

### **MÉTODOS**

p.p1 {margin: 0.0px 0.0px 0.0px 0.0px; font: 11.5px Arial} p.p2 {margin: 0.0px 0.0px 0.0px 0.0px; font: 12.0px Arial; min-height: 14.0px} span.s1 {font: 8.0px Arial} span.s2 {font: 11.0px Helvetica} span.s3 {font: 11.5px 'Times New Roman'} span.s4 {font: 11.5px Wingdings}

#### **Obtención del TzV**

Los escorpiones Tz, fueron colectados en el pueblo de Santa Cruz de Mora, y Mesa de Bolívar, Edo. Mérida, al oeste de Venezuela. Se clasificaron de acuerdo a los criterios planteados por González - Sponga (6). Los venenos fueron obtenidos por estimulación manual del telsón según el método de Zlotkin E. & Shulov A. (7) y liofilizado a -50°C y 35 mBar de presión (Virtes, modelo 10-010). Se liofilizó el TzV de un pool de 35 escorpiones y se reconstituyó en NaCl al 0,9% (Sigma Aldrich S7653). Posteriormente, se centrifugó a 12000g por 10 minutos para eliminar el material insoluble (Eppendorf®, Modelo-5804R). Se determinaron las proteínas contenidas en el sobrenadante mediante el método de Lowry, con el uso de BSA (Armour Pharmaceutical Co.) como estándar (8). Finalmente, se congeló en nitrógeno líquido y se almacenó a -20°C hasta el momento del ensayo.

### Obtención de los acinos pancreáticos

Los acinos se obtuvieron de acuerdo al método descrito por Bruzzone *et al.* (9) y Williams J. (10). El estudio se realizó en ratones NIH con peso comprendido entre 20-30g, mantenidos con alimento comercial, el cual fue suspendido 12 horas previo al sacrificio, y agua *ad libitum*.

Se sacrificaron por dislocación cervical y se extrajo la pancreata por laparotomía medial. Una vez extraída se colocó en solución amortiguadora de fosfato 0,2M (PBS: NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> H<sub>2</sub>O; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O) con cóctel inhibidor constituido por: 5,5 µl de cada uno de los siguientes inhibidores de proteasas: aprotinina 2mg/ml (Roche, ROAPRO); pepstanina 1mg/ml (Roche PEP-RO); PMSF 10 mg/ml (Sigma 78830) y leupeptina 1mg/ml (Sigma L-5793). Se burbujeó con carbógeno 95% O<sub>2</sub> y 5% CO<sub>2</sub> (BOC Gases de Venezuela C.A.) durante todo el ensayo. La pancreata fue seccionada con tijeras de disección y el tejido adiposo fue removido de la superficie del PBS con pipetas Pasteur®. Se realizó un mínimo de tres lavados con PBS sin inhibidores en hielo.

### Aislamiento de los acinos

Los acinos se separaron por digestión con colagenasa tipo I (SIGMA C0130). Posteriormente, se incubaron en baño de agua (Precision Scientific modelo 25) con agitación constante durante 10 minutos a 37°C. La suspensión de acinos fue pasada suavemente a través de una aguja de 18G con una inyectadora estéril para ser devuelta al envase, procedimiento que se repite una vez más desde la incubación. A continuación se adiciona el medio de lavado frío KRB-HEPES modificado: NaCl 135,0 mM (Sigma Aldrich S7653), KCl 4,8 mM (Hopkin & Williams); CaCl<sub>2</sub>, 1,0 mM (Merck 2382); KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,2 mM (Merck 4873); MgSO<sub>4</sub> 1,2 mM (Merck); NaHCO<sub>3</sub> 5,0 mM (Hopkin & Williams); glucosa 5,0 mM (Merck 8342); HEPES 12,5 mM (Promega H5303); 80 mg de BSA (Armour Pharmaceutical Co); 30 mg de glicina (Sigma G7176); a pH 7,6 y se deja en reposo sobre hielo por 15 minutos. Posteriormente, se removió un tercio de la solución superficial para eliminar restos del tejido graso y el exceso de colagenasa y luego se repuso el volumen removido con solución de lavado, este procedimiento fue repetido dos veces.

Esta suspensión de acinos pancreáticos se pasó a través de una malla de nylon de 100 µm (Millipore) con la finalidad de remover el resto de los componentes no deseados. Posteriormente, se transvasaron los acinos a un vaso de precipitado de 10mL, se añaden 5 mL de medio de suspensión 1 (10 ml de medio de lavado; 10 mg de BSA) a 5°C y se deja en reposo por 15 min sobre hielo para separar los acinos (precipitados) del componente graso

(superficial).

Finalizado este procedimiento se removió el componente graso hasta un tercio del volumen total, se lavaron los acinos con dos tercios de solución de lavado para eliminar el exceso de BSA. Luego, se añadieron 5 ml de medio de suspensión 2 (10 ml de medio de lavado con 5,5  $\mu$ l de cada uno de los siguientes inhibidores de proteasas: aprotinina 2mg/ml; pepstanina 1mg/ml; PMSF 10 mg/ml y leupeptina 1mg/ml) a 5°C, se repite el procedimiento aplicado con la solución 1, y se ajustó a un volumen final de 2,5 ml de medio de suspensión 2. La suspensión de acinos obtenida finalmente fue distribuida en una placa para ELISA, 90  $\mu$ l en cada pozo y se incubó en el baño térmico con agitación constante a 37°C durante 30 minutos.

Luego de la estabilización, se adicionaron diferentes concentraciones de Cch 0,1 $\mu$ M - 30  $\mu$ M/pozo (0,0018-5,47  $\mu$ g/ml) y TzV 10-4  $\mu$ g - 30 $\mu$ g/pozo. Cada tratamiento se realizó por duplicado. Adicionalmente, se hizo una combinación de la Cch más el TzV y se realizó una curva concentración respuesta. El tiempo de incubación fue de 15 minutos para todos los ensayos.

Terminado el tiempo de incubación se retiró la suspensión de acinos de cada pozo y se colocó en tubos Eppendorf® de 500  $\mu$ l. La suspensión fue centrifugada a 20854G por 10 minutos a 4°C. Se separó el sobrenadante y se resuspendió el sedimento en 20  $\mu$ l de solución de lisis: Tris base 50mM (Promega H-5131); NaCl 0,25M; EDTA 5mM (Sigma ED 2SS); NaF 4mM (Mallinckrodt Chemical Works); Triton X-100 al 1% (Sharlau TR0444). El sobrenadante y el sedimento fueron almacenados a -20°C hasta el momento del ensayo.

Paralelamente, se tomó una alícuota para verificar la morfología acinar en microscopio a 40x sin tinción. Una vez transcurridos los 30 minutos de estabilización se determina la viabilidad celular con azul de tripano y el número de acinos por ml en cámara de Newbauer.

### **Determinación de proteínas secretadas al medio extracelular**

La concentración de proteínas secretadas al medio extracelular en el sobrenadante se determinó según el método de Lowry modificado por Peterson (11). En resumen, se precipitaron las proteínas con deoxicolato de sodio (DOC) al 0,15% y ácido tricloroacético (TCA) al 72%, posteriormente se aplicó el método de Lowry y la concentración de proteínas se determinó con base a una curva estándar de albumina (0-10 $\mu$ g/ml) en un espectrofotómetro (Beckman, DU 640B) a 750 nm. A los acinos precipitados con solución de lisis se le aplicó el mismo procedimiento con la finalidad de determinar las proteínas totales.

### **Determinación de la secreción de tripsina**

La actividad de tripsina se determinó mediante el método descrito por Bergmeyer *et al.* (12). En resumen, se determinó por espectrofotometría a una longitud de onda de 253 nm, con cinco lecturas continuas cada minuto, donde se utilizó el N-  $\alpha$ - Benzoil-L- Arginina etil éster (BAEE) como sustrato. La reacción se basó en la siguiente ecuación:



Una unidad BAEE de actividad de tripsina a 253 nm con BAEE como sustrato a pH 7,6 y 25 °C produce 0,001U x min, en un volumen final de 3,20 ml. Además, se realizó una curva patrón

en función del tiempo con una concentración estándar de tripsina (T4019 Sigma). Las concentraciones del patrón de tripsina utilizada comprendían valores entre 425-575 U/mL.

### **Determinación de la secreción de amilasa**

El principio del método utilizado se basa en el procedimiento descrito por Caraway W. (13). En resumen, consiste en colocar 250µL de sustrato (almidón 0,4g/L; solución de fosfato a pH 7 y estabilizador) en el tubo control y en los tubos que contienen las muestras. Se incubó en baño térmico a 37°C por 2 minutos. A cada tubo se agregó 50 µL de muestra problema y el equivalente en agua en el tubo control. Posteriormente se incubó en baño térmico a 37°C durante 7,5 minutos. Seguidamente, se añadieron en todos los tubos 250µL de reactivo indicador (yodato de potasio 16,7mmol/L; yoduro de potasio 271mmol/L y HCl 112 mmol/L) más 2 mL de agua destilada, se mezcló y luego de 5 minutos se determina la absorbancia a una longitud de onda de 660nm.

**Aspectos éticos:** Este estudio fue evaluado por el Comité de Bioética del Instituto de Medicina Experimental, Facultad de Medicina de la Universidad Central de Venezuela.

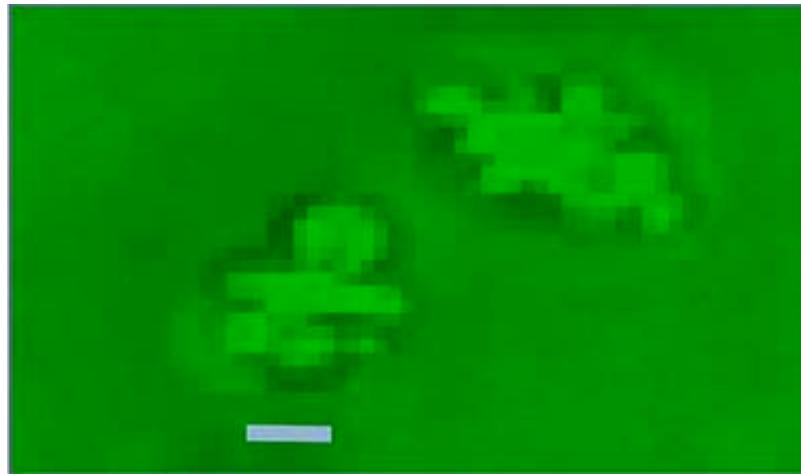
**Análisis de datos:** Los resultados se expresaron como la media aritmética ± el error estándar de la media (EEM). El análisis estadístico de las diferencias fue realizado mediante el uso de la Prueba “t” de Student o el análisis de varianza de una vía (ANOVA). Los valores de  $p < 0,05$  fueron considerados estadísticamente significativos. El análisis y la elaboración de los gráficos se realizaron con el software de Microsoft® Office Excel 2003 y el programa GraphPad Prism® versión 5.0.3.

## **RESULTADOS**

p.p1 {margin: 0.0px 0.0px 0.0px 0.0px; font: 11.5px Arial} p.p2 {margin: 0.0px 0.0px 0.0px 0.0px; font: 10.0px Arial} p.p3 {margin: 0.0px 0.0px 0.0px 0.0px; font: 12.0px Arial; min-height: 14.0px} p.p4 {margin: 0.0px 0.0px 0.0px 0.0px; font: 11.5px Arial; min-height: 12.0px} span.s1 {font: 8.0px Arial} span.s2 {font: 11.0px Helvetica}

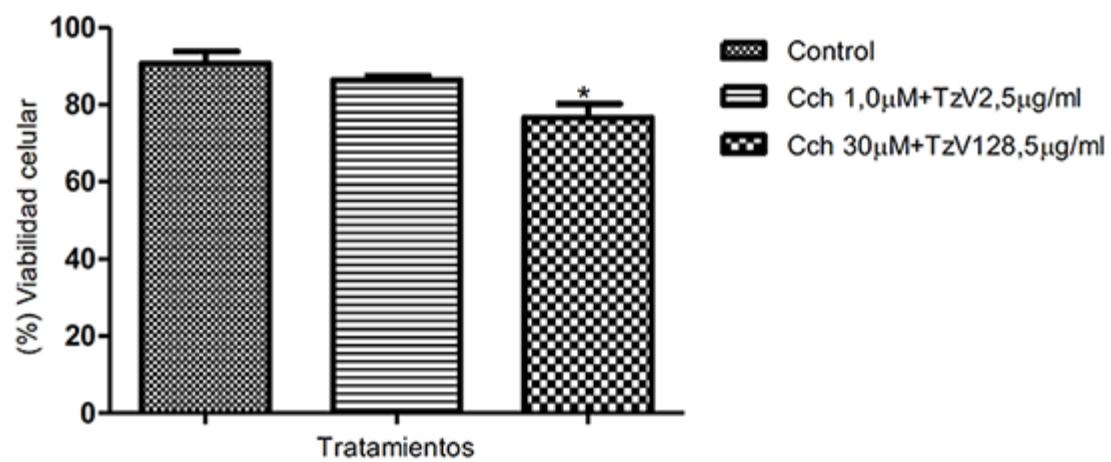
### **Aislamiento e Identificación de los acinos pancreáticos**

Una vez aplicado el método descrito para la obtención de acinos, éstos fueron identificados mediante microscopía de contraste a 40x. La concentración obtenida de la suspensión de acinos pancreáticos aislados de ratón fue de  $3 \times 10^4$  células/ ml y el número de células acinares en cada pozo fue  $2,7 \times 10^3$  células.



**Figura 1.** Identificación de las células acinares aisladas de pancreata de ratón NIH. Microscopio de contraste 40x, sin tinción. Escala aproximada de la barra (10μm)

La viabilidad celular se determinó en cada punto de la curva dosis respuesta. El porcentaje de viabilidad obtenido fue  $90,6 \pm 3,14\%$ , sólo se observó una disminución significativa en este parámetro cuando se comparó el control vs Cch 30μM más TzV 128,5 μg/mL (figura 2).



**Figura 2.**

**Porcentaje de Viabilidad celular en controles y bajo los diferentes tratamientos.** Los resultados se expresan como el porcentaje de viabilidad, cada barra representa el promedio  $\pm$  EE  $n=5$  experimentos individuales por duplicado. ANOVA ( $F=6.534$ ).

#### **Efecto de la Cch y el TzV sobre la secreción de proteínas totales al medio extracelular en acinos pancreáticos aislados**

Los resultados obtenidos en este estudio muestran que la Cch produce un incremento de la secreción de proteínas en acinos pancreáticos aislados que siguen una tendencia lineal, la cual se hace significativa a partir de 0,91 μg/ml con respecto al basal. Así mismo, el TzV también posee un efecto que depende de la concentración a partir de 2,5μg/mL y resultó

significativo a partir de 128,5 µg/ml (ver figura 3).

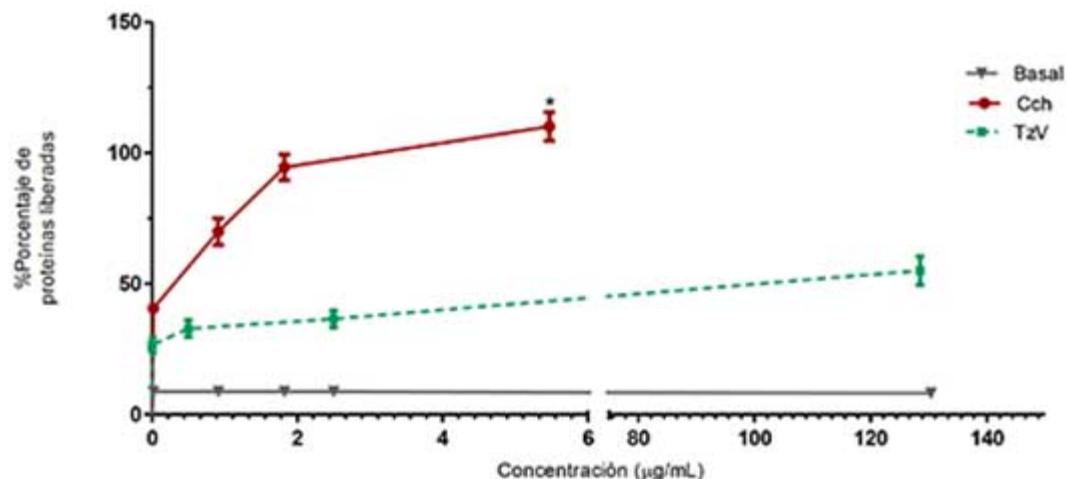


Figura 3.

**Secreción de Proteínas de los acinos pancreáticos aislados inducida por Cch y TzV.** Cada punto representa el promedio  $\pm$  EE de  $n=3$  experimentos individuales por duplicado. Para Cch:  $r=0,87$ ;  $P=0,0021$  y para TzV:  $r=0,84$ ;  $P=0,0006$ .

#### Efecto de la Cch y el TzV sobre la secreción de enzimas (amilasa y tripsina) al medio extracelular en acinos pancreáticos aislados 8

La figura 4 muestra la cinética dosis respuesta de la liberación de amilasa a concentraciones crecientes de Cch y TzV, donde se puede observar que la liberación de amilasa es concentración dependiente tanto para la Cch como para el TzV.

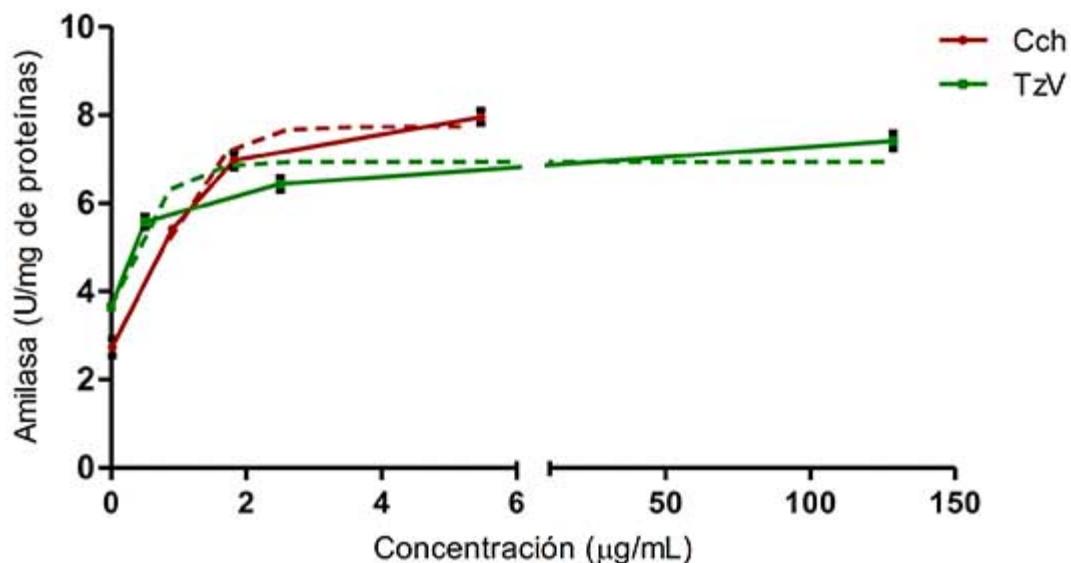
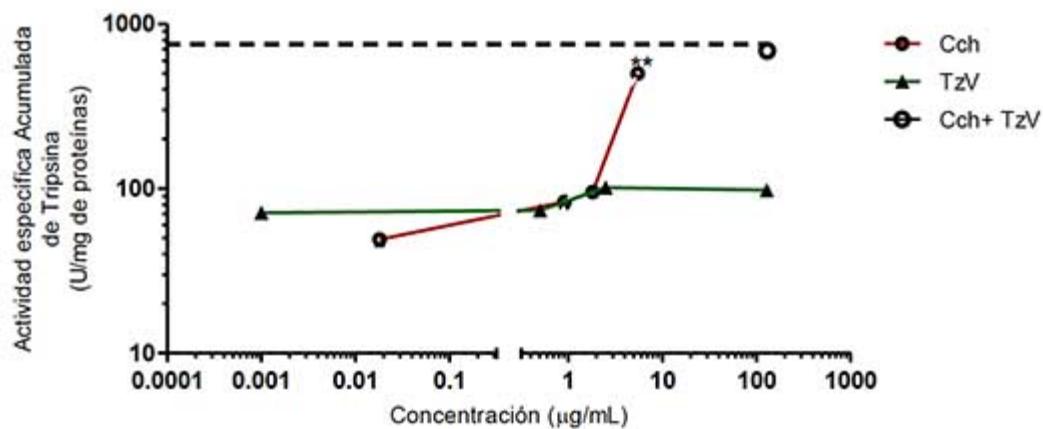


Figura 4.

**Efecto de Cch y TzV sobre la actividad de amilasa secretada.** Cada punto representa el promedio  $\pm$  EE,  $n=5$  experimentos individuales por duplicado. Valor basal (1,97U/mg de proteína). Ajuste de la curva (líneas punteadas)  $r=0,98$  para Cch y  $r=0,94$  para TzV. LogCE50=0,56 para Cch y Log CE50=0,54 para TzV. Emax=7,74 para Cch y Emax=6,94 para TzV.

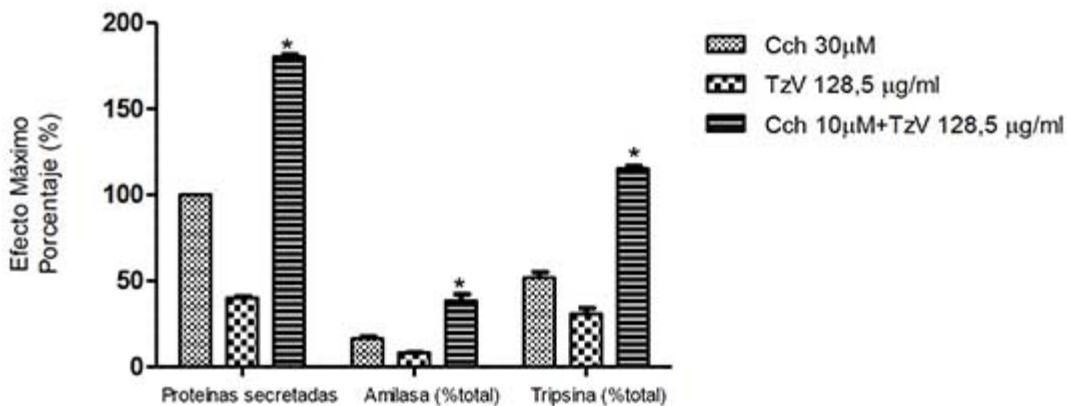
Con relación al efecto de la Cch sobre la actividad específica acumulada de la tripsina se observó que ésta es dependiente de su concentración como se muestra en la figura 5. El efecto de TzV sobre la actividad específica acumulada de tripsina no es dependiente de la concentración de veneno ya que un incremento en la concentración de veneno no produce variaciones significativas en la actividad de la enzima (ver figura 5).

Al combinar el análogo del secretagogo endógeno más el veneno (Cch10 $\mu$ M+TzV 128,5  $\mu$ g/ml) se observa la máxima actividad de tripsina (figura 5, línea punteada).



**Figura 5. Efecto de la administración de Cch, TzV y su combinación sobre la actividad específica acumulada de tripsina.** Cada punto representa el promedio  $\pm$  EE de la actividad acumulada de tripsina. n=3 experimentos por duplicado. Control-basal=47,03U/mg de proteína. r=0,99 para Cch y r=0,94 para TzV. CE50= 2,88 para Cch y CE50 =1,10 para TzV. \*\*P<0,01. La línea punteada indica la actividad específica acumulada de tripsina cuando se realizó la combinación Cch 10 $\mu$ M y TzV 128,5  $\mu$ g/ml.

En la figura 6 se muestran los efectos máximos en porcentaje sobre el basal de los tratamientos administrados. Los parámetros estandarizados fueron la secreción de proteínas, la actividad de amilasa y de tripsina. Se puede observar que la Cch y el veneno superan significativamente el valor basal y la combinación de Cch + TzV es significativamente superior a la de los tratamientos individuales, lo que sugiere un efecto potenciador de dicha combinación. Así mismo la secreción de proteínas totales liberadas al medio extracelular sigue el mismo comportamiento del componente enzimático.



**Figura 6. Efecto de Cch, TzV y la combinación sobre la actividad enzimática y la secreción de proteínas estandarizada del porcentaje sobre el basal al medio extracelular (% sobre el basal).** Cada barra representa el promedio  $\pm$ EE, n=3 experimentos por duplicado. Anova F=7.190. \*P<0,05. r=0,99 para Cch y r=0,94 para TzV.

## DISCUSIÓN

p.p1 {margin: 0.0px 0.0px 0.0px 0.0px; font: 11.5px Arial} p.p2 {margin: 0.0px 0.0px 0.0px 0.0px; font: 12.0px Arial; min-height: 14.0px} span.s1 {font: 8.0px Arial} span.s2 {font: 11.0px Helvetica}

La viabilidad celular en la suspensión de acinos pancreáticos aislados fue superior al 90% y sólo se observó una disminución significativa cuando se combinaron las concentraciones más elevadas de Cch y TzV (30µM y 128,5 µg/ml, respectivamente). Es posible que esta combinación descrita ejerza un efecto tóxico a las concentraciones descritas, debido a que se produce una mayor liberación de enzimas proteolíticas por Cch. Éste tiene un efecto inductor que al adicionarse junto al TzV produce un efecto potenciador en cuanto a la liberación de proteínas. Por consiguiente, las enzimas así liberadas pueden generar autodigestión de proteínas estructurales, la liberación de enzimas lisosomales, lo cual puede conducir a fenómenos apoptóticos, y daños por procesos inflamatorios (14,15). El efecto pancreatotóxico inducido por el veneno de escorpión ha sido descrito anteriormente en lóbulos pancreáticos (16) y en estudios de histopatologías (17).

Adicionalmente, los mecanismos propuestos se soportan con los ensayos que evalúan la secreción de proteínas del acino pancreático al medio extracelular, como se describe en la figura 3. La secreción de proteínas inducida por la Cch sigue una tendencia exponencial característica de una curva dosis respuesta, a diferencia del TzV que parece inducir una liberación significativa de proteínas sólo a 128,5 µg/mL y se mantienen estables a concentraciones menores. Este efecto de la Cch sobre la secreción de proteínas en acinos pancreáticos ha sido descrita por varios autores (18, 19, 20, 21, 22) y ésta se explica debido a la respuesta que ejerce la acetilcolina sobre los receptores muscarínicos (M1 y M3) los cuales promueven los mecanismos de liberación asociados al incremento intracelular de calcio inducidos por la activación de proteínas G y la generación de segundos mensajeros (23, 24, 25, 26, 27).

Por otra parte, las toxinas  $\alpha$  y  $\beta$  presentes en TzV (28) aumentan la conductancia de los canales

de sodio, los cuales pueden asociarse a los canales de calcio, que en tejido no excitable incrementan la concentración intracelular de este ion y en consecuencia tiene lugar la migración de las vesículas con alto contenido proteico, su fusión con la membrana celular y la posterior liberación de las proteínas al medio extracelular. Resultados similares han sido obtenidos en investigaciones que estudiaron la caracterización de receptores implicados en la secreción de proteínas de los acinos pancreáticos aislados con el uso de Cch (22).

El marcador más frecuente utilizado para medir daño pancreático es el aumento en la actividad de amilasa sérica (29,30). Bajo esta premisa se evaluaron los efectos de la Cch, el TzV y la combinación de ambos sobre este parámetro. Al evaluar la curva dosis respuesta los resultados para Cch fueron similares a los obtenidos en la secreción de proteínas secretadas al medio extracelular, o sea siguen una tendencia exponencial con un  $\text{LogCE50} = 0,56\mu\text{g/ml}$  y  $\text{Emax} = 7,74 \text{ U/mg}$  de proteínas. Estos resultados son comparables a los obtenidos por Williams y Gautam (22,31) quienes describen una actividad máxima de alrededor de 7 U/mg de proteínas cuando se administró Cch 10-6 M, en un modelo similar al de este estudio. El TzV produce un patrón de secreción de amilasa similar al obtenido con la Cch y una  $\text{CE50} = 0,54 \mu\text{g/ml}$  y  $\text{Emax} = 6,94 \text{ U/mg}$  de proteína. Esto sugiere que la secreción de esta enzima sí responde a un patrón de efecto dosis respuesta. No se encontró en la base de datos estudiada algún resultado que pudiera compararse con el obtenido en este estudio. Por otra parte, el efecto del veneno de escorpión sobre la secreción pancreática ha sido evaluado en otros modelos. En este sentido, Novaes en un estudio donde recolectó jugo pancreático por canulación del conducto en ratas, demostró un aumento en la actividad de amilasa inducida por efecto del veneno de *Tityus serrulatus* (21).

Con respecto a la actividad específica acumulada de tripsina se observó que la determinación de ésta en el medio extracelular de la suspensión de los acinos es independiente de la concentración de TzV administrada. No se encontró en la literatura consultada resultados que permitieran realizar una comparación del efecto del veneno de escorpión sobre la actividad de esta enzima. Este es uno de los motivos por lo cual la determinación de tripsina liberada se hace importante, además, tanto los estudios *in vivo* como *in vitro* la involucran en el desarrollo de pancreatitis porque ejerce un efecto activador sobre la liberación citosólica de catepsina B y el consiguiente desarrollo del proceso inflamatorio (32). Adicionalmente, la liberación inicial de tripsina de unas pocas células acinares puede estar asociada a mecanismos que involucran el aumento intracelular de calcio y la consecuente activación de células estrelladas pancreáticas que inducen, a su vez, la liberación y activación de enzimas pancreáticas que incluyen a la tripsina.

En conclusión, estas evidencias conllevan a sugerir que el veneno de Tz conduce al desarrollo de mecanismos que incluyen fenómenos proteolíticos asociados a una hiperestimulación del receptor colinérgico por una excesiva liberación de Ach, la cual conduce a un aumento en la liberación y activación *in situ* de las enzimas pancreáticas (33, 34, 35), las cuales pueden pasar a circulación sistémica y servir como marcadores diagnósticos (amilasa y lipasa). Paralelamente podría tener lugar un proceso de autodigestión producto de la liberación de enzimas proteolíticas desde los acinos. Si esta liberación se hace progresiva se activarían otros mediadores proinflamatorios que al pasar a la circulación sistémica podrían inducir cuadros cardiorrespiratorios ya demostrados en modelos *in vivo* y finalmente un síndrome de falla de

múltiple órganos ya descritos en la evolución de la pancreatitis (4,15).

Agradecimientos por apoyo técnico a: Eglys Chirinos.

Agradecimientos por suministros de materiales y equipos: Dr. Manuel Moya y Dra. Fátima Torrico.

## REFERENCIAS

1. Arellano M., Princz C., González-Sponga M., Vildosola B. Escorpionismo en Venezuela. Rev Soc. Med. Quirurg. Hosp. Pérez de León 1981; 16:63-73.
2. Borges A. Escorpionismo en Venezuela. Acta Biol. Ven. 1996; 16(3):65-75.
3. Borges A., Vargas A., Arandia J., Colmenares Z., & Alfonzo M. Envenenamiento por *Tityus zulianus* en el Norte de los Estados Mérida y Táchira, Venezuela. Acta Cient. Ven. 1999; 50:354.
4. Mazzei C., Dávila D., Donis J., Arata G., Villareal V. & Barboza J. Sympathetic nervous system activation antivenin administration and cardiovascular manifestations of scorpion envenomation. Toxicon 2002; 40:1339-1346.
5. Trejo E. Mecanismos moleculares asociados a la pancreatitis producida por los venenos de los escorpiones *Tityus discrepans* y *Tityus zulianus*: Modelos experimentales [tesis doctoral] Caracas – Venezuela: Universidad Central de Venezuela; 2006.
6. González-Sponga Escorpiones de Venezuela. Cuadernos Lagoven. Caracas. Ediciones Lagoven 1984; p. 167.
7. Shulov A., Zlotkin E. A simple device for collecting scorpion venom. Toxicon. 1969; 2:169-170.
8. Lowry D., Risembourgh R., Tan L. & Randal R. Protein measurement with the folin phenol reagent. J. Biol Chem. 1951; 195:265-275.
9. Bruzzone R, Halban PA, Gjinovci A, Trimble. A new, rapid, method for preparation of dispersed pancreatic acini. *Biochem J.* 1985; 226(2):621-4.
10. ER.Wiiliams J. Isolation of rodent pancreatic acinar cell and acini by collagenase digestion. The Pancreapedia 2010; Exocrine pancreas knowledge base. [www.pancreapedia.org](http://www.pancreapedia.org)
11. Peterson G. . A simplification of the protein assay method of Lowry *et. al.* Which is more generally applicable. *Anal Biochem* 1977; 83 (2): 346-56.
12. Bergmeyer, H.V. Gawehn, K. & Grassl, M..In *Methods of Enzymatic Analysis*. 1974; 1(2):515-516. Academic Press, Inc. New York, NY.
13. Caraway W. A stable starch substrate for the determination of amylase in serum and other body fluids. *Am J Clin Pathol*. 1959; 32(1):97-9.
14. Steer M. Pathobiology of experimental acute pancreatitis. *The Yale J. Of Biol. And Med.*1992; 65: 421-430.
15. Grady T., Mah'moud M., Otani T., Rhee S., Lerch M., y Gorelick F. Zimogen proteolysis within the pancreatic acinar cell is associated with cellular injury. *Am. J. Physiol* 1998; 275(38): G1010-G1017.
16. Fletcher P. Jr., Fletcher M., Possani L. Characteristics of pancreatic exocrine secretion produced by venom from the Brazilian scorpion, *Tityus serrulatus*. *Eur. J. Cell. Biol.* 1991;

- 58(2): 259-270.
17. Borges A., Trejo E., Vargas A., Céspedes G., Hernández A. & Alfonzo M. Pancreatic Toxicity in mice elicited by *Tityus zulianus* and *Tityus discrepans* scorpion venoms. *Invest. Clin.* 2004; 45(3): 269-276.
18. Possani L., Marin B., Fletcher P., Discharge effect on pancreatic exocrine secretion produced by toxins purified from *Tityus serrulatus* scorpion venom. *J. Biol. Chem.* 1992; 266:3178-3186.
19. Leach S., Modlin I., Scheele G., y Gorelick F. Intracellular activation of digestive zymogens in rat pancreatic acini stimulation by high doses of cholecystokinin. *J. of Clinical Invet.* 1991; 87:362-366.
20. Martin-Eauclaire M. & Couraud F. Scorpion neurotoxins: Effects and mechanisms. In *Handbook of Neurotoxicology* (Chang L. & Dyer R.) New York. 1995; p. 638-716.
21. Novaes G., Catanzaro O., Beraldo T., Freire-Maia L. Effect of purified scorpion toxin (tytiustoxin) on the pancreatic secretion of the rat. *Toxicon* 1982; 20(5): 847-852.
22. Williams J., Korc M. y Dormer R. Action of secretagogues on a new preparation of functionally intact, isolated pancreatic acini. *Am. J. Physiol.* 1978; 235(s): E517-E524.
23. Gardner J., Jensen R. Receptor for secretagogues on pancreatic acinar cells. *Am J. Physiol* 1980; 238 (2): G63-6.
24. Gardner J. Regulation of pancreatic exocrine function in vitro: Initial steps in the actions of secretagogues. *Ann. Rev. Physiol* 1979; 41:55-66.
25. Gavaghan M., The Pancreas – Hermit of abdomen. *AORN J.* 2002; 75 (6): 1110-1130.
26. Hidalgo, O. Pancreatitis aguda y sus complicaciones. Universidad Central de Venezuela, Consejo de Desarrollo Humanístico, Caracas-Venezuela. 2006; p.55-165.
27. Iain L. O. Buxton. Farmacocinética y farmacodinamia. En: Brunton L., Lazo J., Parker K., editores. *Goodman & Gilman. Las bases farmacológicas de la Terapéutica.* 11va Edición. McGraw-Hill Interamericana Editores, S.A. 2007; p.25-38.
28. Borges A., Alfonzo M., García C., Winand N., Leipold E., Heinemann S. (2004a). Isolation, molecular cloning and functional characterization of a novel  $\beta$ - toxin from the Venezuelan scorpion, *Tityus zulianus*. *Toxicon* 43(67):671-684.
29. Kazmierczak S., Van Lente F., and Hodges E. Diagnostic and Prognostic Utility of Phospholipase A activity in Patients with Acute Pancreatitis: Comparison with Amylase and Lipase. *Clin Chem.* 1991; 37(3): 356-360.
30. Kiriyama S., Gabata T., Takada T., Hirata K., Yoshida M., Mayumi T., Hirota M., Kadoya M., Yamanouchi E., Hattori T., Takeda K., Kimura Y., Amano H., Wada K., Sekimoto M., Arata S., Yokoe M., Hirota M. New diagnostic criteria of acute pancreatitis. *J Hepatobiliary Pancreat Sci.* 2010; 17(1):24-36.
31. Gautam D., Han S., Heard T., Cui Y., Miller G., Bloodworth L., y Wess J. Cholinergic stimulation of amylase secretion from pancreatic acinar cell studied with muscarinic acetylcholine receptor mutant mice. *J. Pharmacol. Exp. Therap.* 2005; 31 (3): 995-1002.
32. Halangk W., Lerch M., Brandt-Nedelev B., Roth W., Ruthenbuerger M., Rein heckel T., Domschke W., Lippert H., Peters C., y Deussing J. (2000). Role of cathepsin B in intracellular trypsinogen activation and the onset of acute pancreatitis. *J. Clin. Invest.* 106:773-781.
33. Hodges G., Livingston D. & Franks L. The localization of trypsin in cultured mammalian cells. *J. Cell Sci.* 1973; 887-902.

34. Gryshchenko O., Gerasimenko J., Peng S., Gerasimenko O. & Petersen O. Calcium signalling in the acinar environment of the exocrine pancreas: physiology and pathophysiology. *J Physiol* 2018; 596(14): 2663-2678
35. Chvanov M., De Faveri F., Moore D., Sherwood M., Awais M1, Voronina S1, Sutton R1, Criddle DN1, Haynes L1, Tepikin AV1. Intracellular rupture, exocytosis and actin interaction of endocytic vacuoles in pancreatic acinar cells: initiating events in acute pancreatitis. *J Physiol.* 2018; 596(13): 2547-2564.