

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO
UNIDAD ACADÉMICA DE LOS CICLOS
PROFESIONALES Y DE POSGRADO
CCH

ESTUDIO HISTOLÓGICO DE LAS GLANDULAS DEL VENENO
DEL ALACRAN MEXICANO CENTRUROIDES NOXIUS HOFFMANN:
IDENTIFICACION Y CARACTERIZACION DE TIPOS CELULARES

Tesis para obtener el título de
Licenciado en Investigación Biomédica Básica

presentada por

Ana Luisa Piña Hernández

México, 1987



Universidad Nacional
Autónoma de México



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 está 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.

INDICE GENERAL

	Página
INTRODUCCION.	1
ANTECEDENTES.	4
I Generalidades sobre alacranes	
- Datos históricos.	4
- Origen, Clasificación y Distribución Geografica.	4
- Anatomía General.	10
- Morfología, Histología y Función del Aparato Venenoso.	13
II Venenos	
- Venenos Animales.	19
- Venenos de Alacranes.	22
- El veneno del Alacrán Centruroides noxius Hoffmann.	31
MATERIALES Y METODOS	35
I Fuente del material biológico.	35
II Técnicas histológicas	
- Preparación del Tejido	35
- Fijación.	35
- Postfijación, Corte y Montaje.	37
- Tinciones	39
- Azul de Toluidina.	39
- Hematoxilina-Eosina	39
III Cuantificación y Análisis de Datos.	42

IV Inmunocitoquímica

- Generalidades.	44
- Montaje de la Técnica Inmunocitoquímica.	49
- Adaptación de la técnica al tejido de la Glándula.	54
- Controles.	55

RESULTADOS

I Preparación del tejido.	60
II Histología de las Glándulas Productoras del Veneno.	63
- Estroma de la Glándula.	63
- Parénquima Glandular.	66
Regiones.	66
Zonas.	66
Población Celular.	70
Topografía Celular.	91
- Estructuras anexas a las Glándulas del Veneno	
Vaso Hemolinfático.	95
Músculo Periglandular.	96
III Inmunocitoquímica (localización de las toxinas en las glándulas del veneno del Alacrán	
- Dilución de Anticuerpos.	104
- Tiempo de Incubación.	104
- Controles.	105
IV Relación de las tinciones Histológicas y la tinción observada con anticuerpos marcados. .	110

DISCUSION

I Histología de las glándulas productoras del veneno.	113
II Inmunocitoquímica.	121
III Relación de las tinciones histológicas y la tinción observada con anticuerpos marcados..	124
BIBLIOGRAFIA.	126

INDICE DE FIGURAS

Figura No.		Página
1	Distribución geográfica de las especies más peligrosas del género <i>Centruroides</i> en la República Mexicana (Hoffmann, 1938)	9
2	Anatomía externa de los alacranes	12
3	Aparato venenoso del alacrán	18
4	Técnicas inmunocitoquímicas	45
5	Fotomicrografías. Inmunofluorescencia para B-endorfina en hipófisis de rata	50
6	Fotomicrografías. Estructura general de las glándulas del veneno del alacrán <i>C. noxius</i> Hoffmann.	64
7	Esquema. División topográfica del telson alacrán.	67
8	Fotomicrografías y Esquema. Tipos celulares del epitelio glandular.	71
9	Fotomicrografías. Región caudal de las glándulas productoras del veneno.	77
10	Fotomicrografías. Región medial de las glándulas productoras del veneno.	81
11	Fotomicrografías. Región rostral de las glándulas productoras del veneno.	85
12	Esquemas. Distribución topográfica de los tipos celulares de las glándulas productoras del veneno.	93
13	Fotomicrografías. Proyecciones de tejido conectivo. Células mioepiteliales.	98
14	Fotomicrografías. Vaso hemolinfático y estructuras relacionadas.	100
15	Fotomicrografías. Fascículos musculares.	102
16	Fotomicrografías. Tinción de inmunoperoxidasa en el epitelio glandular.	108
17	Fotomicrografías. Relación entre la inmunoperoxidasa y la tinción ácido-básico	111

INDICE DE TABLAS

I	Dosis letales medias (DL50) sobre ratones y sobre larvas de moscas de diferentes especies de alacranes.	25
II	Secuencia de aminoácidos de las toxinas de los alacranes.	28
III	Secuencia de aminoácidos de las toxinas del alacrán <i>Centruroides noxius</i> Hoffmann.	34
IV	Soluciones fijadoras probadas para la preservación del tejido glandular productor del veneno	36
V	Controles utilizados para la técnica de inmunocitoquímica.	56

INDICE DE CUADROS

I	Características de los tipos celulares que constituyen el epitelio glandular productor del veneno del alacrán <i>Centruroides noxius</i> Hoffmann	76
---	---	----

INDICE DE GRAFICAS

I	Histograma y Gráfica. Región caudal.	77
II	Histograma y Gráfica. Región medial.	83
III	Histograma y Gráfica. Región rostral.	87
IV	Histogramas. Regiones rostral-distal rostral-proximal	89

ABREVIATURAS

a.a.	Aminoácidos
Ac.	anticuerpo
Ag.	antígeno
BSA	albúmina sérica bovina (Bovine Serum Albumin)
C.n.H	Centruroides noxius Hoffmann
CtI	Células tipo I
CtII	Células tipo II
CtIII	Células tipo III
DAB	diaminobenzidina
DL50	dosis letal media
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
f.m.	fascículos musculares
FII	fracción II del veneno de C.n.H.
ICQ	Inmunocitoquímica
IgG	Inmunoglobulina G
LHRH	Hormona liberadora de hormona luteinizante (Luteinizing Hormone-Releasing Hormone)
Ntx	noxiustoxina
PBS	Amortiguador o Buffer fosfatos-salina (Phosphate buffer saline)
p.g.	parénquima glandular
PO	peroxidasa
RB2	Rabbit B-endorphin 2. (suero anti- B-endorfina elaborado en el conejo 2)
RCD	Rodamina
ZI	zona I
ZII	zona II
ZIII	zona III

INTRODUCCION

En la naturaleza existe una amplia variedad de especies animales que utilizan los venenos como mecanismos de defensa y/o como arma para obtener su alimento. Esta adaptación biológica constituye un proceso convergente evolutivo de enorme valor para la supervivencia de las especies que la poseen.

Durante mucho tiempo, el estudio de estos venenos tuvo un enfoque casi exclusivamente clínico; sin embargo, esta tendencia ha cambiado, y hoy en día, las toxinas de los venenos son utilizadas también como herramientas para el estudio de procesos fisiológicos básicos, siendo fuentes potenciales de agentes terapéuticos nuevos y para el estudio de relaciones zoeológicas, y taxonómicas. Ejemplo de esto lo constituyen los venenos de varias especies de alacranes de entre los cuales destaca el del alacrán mexicano *Centruroides noxius* Hoffmann, por la variedad de estructuras químicas y acciones farmacológicas de sus toxinas.

El veneno de *C. noxius* es considerado como uno de los más potentes hasta ahora descritos (su dosis letal media es de sólo 0.26 mg por Kg de ratón). Sus constituyentes han sido aislados, purificados y caracterizados: de los 14 componentes peptídicos identificados, han resultado las toxinas II-9.2.1, II-9.2.2, II-10.1, II-10.2, II-11, II-12, II-13, II-14, tóxicas para mamíferos, y las toxinas II-5.3 y la II-6 tóxicas para crustáceos.

Se ha demostrado que de las toxinas antes mencionadas la II-10.2 modifica específicamente la corriente entrante de sodio y que el componente II-11 o Noxiustoxina bloquea selectivamente el canal de potasio, en axón gigante de calamar y en sinaptosomas de cerebro de ratón. Además se han podido establecer dos grupos (o familias) de toxinas de alta homología de secuencia de aminoácidos: por un lado el grupo de toxinas homólogas de cadena larga, de aproximadamente 7000 de peso molecular (II-9.2.2, II-10, II-13 y II-14), cuyas acciones farmacológicas ocurren sobre corrientes de sodio (Na⁺); por otro lado se encuentra el grupo de toxinas de cadena corta, de aproximadamente 4000 de peso molecular (II-11 y II-10.2) las cuales bloquean el canal de potasio.

Estos grupos de toxinas homólogas en secuencia de aminoácidos - y en acción - recuerdan a otras familias de péptidos bioactivos (con acciones hormonales, neurotransmisoras, etc.) identificadas en la última década. Estas familias se originan de precursores proteicos que, con frecuencia, contienen varias secuencias de aminoácidos homólogas o péptidos que al ser cortados enzimáticamente del precursor, generan un grupo de péptidos con semejanzas, no sólo estructurales, sino que también de acción. Las familias de neurotoxinas pudieran generarse de manera análoga, o pudieran revelar un modelo alternativo de producción de familias de péptidos (siempre que la glándula del veneno resultara un modelo accesible y relativamente simple de experimentación). En cualquier caso, la estrategia de investigación exitosa y probada para definir la génesis de una

familia de péptidos bioactivos - probada y exitosa, hasta ahora, con los neuropéptidos - se inicia con la identificación del o de los tipos celulares capaces de producir a los distintos miembros de la familia; de hecho, la segregación y especialización celular en su síntesis empieza a definir una familia de péptidos de origen común.

Por lo anteriormente expuesto, para abordar el problema de la génesis de las toxinas, debíamos, en una primera etapa, conocer la histología de las glándulas productoras de veneno, identificar sus tipos celulares, sus características morfológicas y tintoriales y su localización, distribución y frecuencia de ocurrencia en las glándulas. Esto constituye el cuerpo de esta Tesis.

Con este marco de referencia será posible reconocer e identificar por métodos inmunocitoquímicos a las células que producen las distintas toxinas; aquí presentamos también experiencias preliminares que muestran las dificultades y hallazgos inesperados que ofrecen estos métodos.

ANTECEDENTES

I GENERALIDADES SOBRE ALACRANES

- Datos Históricos

Los animales ponzoñosos entre ellos los alacranes, han sido fuente de inspiración para la creación de un sinnúmero de mitos, leyendas y algunas manifestaciones artísticas en las cuales, se hace alusión a las propiedades mágicas y divinas de estas especies biológicas; ejemplo de ello son las referencias que se hacen de estos animales en la Biblia, el Talmud, y en la iconografía de algunas mitologías como la Maya, la Huicho, la Egipcia y la Griega (Balozet, 1971).

En el siglo III a.J.C., Aristóteles describe las diferencias existentes entre algunas especies de alacranes tomando en cuenta la letalidad de su veneno; sin embargo no fue sino hasta el año de 1668 que Francesco Redi realizó el primer estudio sistemático sobre las variaciones de la toxicidad de los venenos de los animales que nos ocupan haciendo además referencia a su distribución geográfica. A este trabajo le siguieron pocas investigaciones y tuvieron que pasar casi dos siglos para que el estudio de los alacranes cobrara mayor importancia científica.

- Origen, Clasificación y Distribución Geográfica.

Los alacranes o escorpiones son artrópodos terrestres antiquísimos y quizá hayan sido los primeros miembros de este filum en conquistar la tierra; su registro fósil data del período Silúrico; se supone que evolucionaron de los Euriptéridos que

fueron los primeros organismos de agua dulce que aparecieron en el Cámbrico y en el Silúrico; por esta razón, a los antiguos alacranes se les ha atribuido una forma acuática de vida que podría explicar la ausencia de estigmas (pulmones "en libro") en dichos fósiles; también existe la posibilidad de que fueran formas de vida terrestre que habitaban las costas durante las mareas bajas pudiendo ser atrapadas por mareas altas y así ser confundidas con organismos acuáticos, la carencia de estigmas podría deberse entonces, a su mal estado de preservación; si esto último es cierto, los alacranes junto con los centípedos serían los primeros animales terrestres de los cuales se tiene registro fósil. (Parenti, 1973; Camacho, 1974).

Se han encontrado pequeñas diferencias entre las formas fósiles y las actuales de los alacranes ya que han permanecido casi inalterados morfológicamente a través del tiempo gracias a su gran adaptabilidad ecológica; por esto, en ocasiones, se les ha denominado fósiles vivientes (Meglisch, 1981). Los alacranes tienen la característica de no ser especies intermedias en la evolución animal sino que, son el resultado de una línea totalmente independiente dentro de los artrópodos que ha sido capaz de resistir cambios geológicos durante millones de años sin dar lugar a nuevas formas (Vachon, 1953).

Los alacranes son Arácnidos-Quejicerados que pertenecen al orden Scorpionida compuesto por seis familias: Buthidae, Scorpionidae, Diplocentridae, Chactidae, Vejovidae y

Bothriuridae, que es la familia más grande con más de quinientas especies distribuidas por todo el mundo de las cuales, alrededor de 25 se consideran dañinas al hombre (Bucher), 1971; Shulov y Levy, 1978).

Los alacranes se localizan en las zonas templadas correspondientes a climas tropicales y subtropicales de ambos hemisferios terrestres. La distribución geográfica de las especies extremadamente tóxicas es para los géneros *Androctonus*, *Leiurus*, *Buthus* y *Heterometrus*: Europa meridional, el Norte de Africa, el medio Oriente e India; para el género *Centruroides*: una área del sur de los Estados Unidos y México y para el género *Tityus*: Brasil y Trinidad y Tobago (Bazolet, 1971; Bucherl, 1971).

En México, los alacranes venenosos presentan una amplia distribución en zonas tropicales y subtropicales de la vertiente del Pacífico, dichas áreas, son interrumpidas por la sierra Madre Occidental y por el Eje Volcánico.

Los estudios taxonómicos y biogeográficos de los alacranes mexicanos se realizaron, casi en su totalidad, por Hoffmann entre los años de 1930 y 1939; sin embargo, basándose en la comparación de las características electroforéticas de los venenos, se ha demostrado que algunas de las especies descritas con anterioridad son artificiales (Stahnke, 1971) y por lo tanto, se requieren estudios más completos sobre taxonomía y distribución geográfica.

En virtud de que no existe un estudio posterior al respecto, puede decirse que hay en México seis especies de

alacranes peligrosos pertenecientes al género *Centruroides* (Hoffmann, 1938), cuya distribución geográfica se indica a continuación:

- *Centruroides sculpturatus*: localizado en el sur de Arizona y norte de Sinaloa.

- *Centruroides suffusus* con dos subespecies:

a) *C. suffusus suffusus* chiaravigli al norte de la meseta central de México.

b) *C. suffusus suffusus* localizado al sur de Durango, norte de Zacatecas y este de Sinaloa

- *Centruroides noxius* que habita en el estado de Nayarit y sureste de Sinaloa

- *Centruroides limpidus* con dos subespecies:

a) *C. limpidus limpidus* que se encuentra principalmente en la cuenca del río Balsas, en el estado de Morelos, sureste del estado de México, sureste de Michoacán y suroeste de Puebla.

b) *C. limpidus tecomanus* que habita en el estado de Colima.

- *Centruroides elegans* con dos subespecies:

a) *C. elegans insularis* que se encuentra en las islas Mariás.

b) *C. elegans elegans* que habita en dos regiones geográficas separadas: la primera de ellas corresponde al norte de Jalisco, áreas costeras de Nayarit y al estado de Sinaloa; la segunda zona corresponde a la región costera de Guerrero y parte de Oaxaca.

- *Centruroides infamatus* se localiza en el centro del país, sur de Durango, Zacatecas, Aguascalientes, Michoacán, Jalisco y una pequeña área cercana a Jalapa en el estado de Veracruz; cuenta con dos subespecies: *C. infamatus infamatus* y *C. infamatus ornatus* (Hoffmann, 1938; Díaz-Nájera, 1970). (Ver fig. 1)



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

- Anatomía General

Los alacranes son arácnidos grandes que miden como promedio de 3cm. a 9 cm. de longitud. Se sabe que algunos escorpiones del Silúrico alcanzaron longitudes de 44cm. a 86 cm. (Meglisch, 1981).

El cuerpo del alacrán consta de un prosoma cubierto por un solo caparazón y un opistosoma con segmentos separados, este último, consta de un mesosoma ancho (preabdomen) de siete segmentos, y un metasoma estrecho (postabdomen) de cinco segmentos que termina en un aguijón.

Las coxas de las patas ocupan la mayor parte de la superficie ventral, excepto por una placa media, el esternón. Los quelíceros son pequeños, triarticulados y quelados, proyectándose en dirección anterior desde el frente del caparazón. Los pedipalpos son los apéndices más grandes y forman un par de pinzas destinadas a capturar sus presas.

En el preabdomen, se localizan los opérculos genitales sobre la cara ventral del primer segmento abdominal. Por detrás de las placas genitales y adherido al segundo segmento abdominal, destacan un par de apéndices sensoriales conocidos como péctenes o peines, característicos de los alacranes. En cada uno de los segmentos abdominales, del segundo al quinto, se observan sobre la cara ventral un par de hendiduras transversales (espiráculos) que se abren en los estigmas o pulmones en "libro". Los segmentos correspondientes al postabdomen no tienen apéndices; el último, denominado telson, es portador de la abertura anal sobre la cara ventral posterior y también

sostiene el aparato punzante característico de los alacranes. (Meglisch, 1981). (ver fig. 2)

El cuerpo del alacrán está cubierto de un tegumento constituido por un epitelio cúbico simple recubierto por una gruesa capa de cutícula, dichos elementos celulares vierten su secreción a canales que atraviesan la cutícula, estos canales, permanecen intactos o se rellenan de material cuticular constituyendo pilares que proporcionan mayor rigidez estructural (Sámano et. al., 1964).

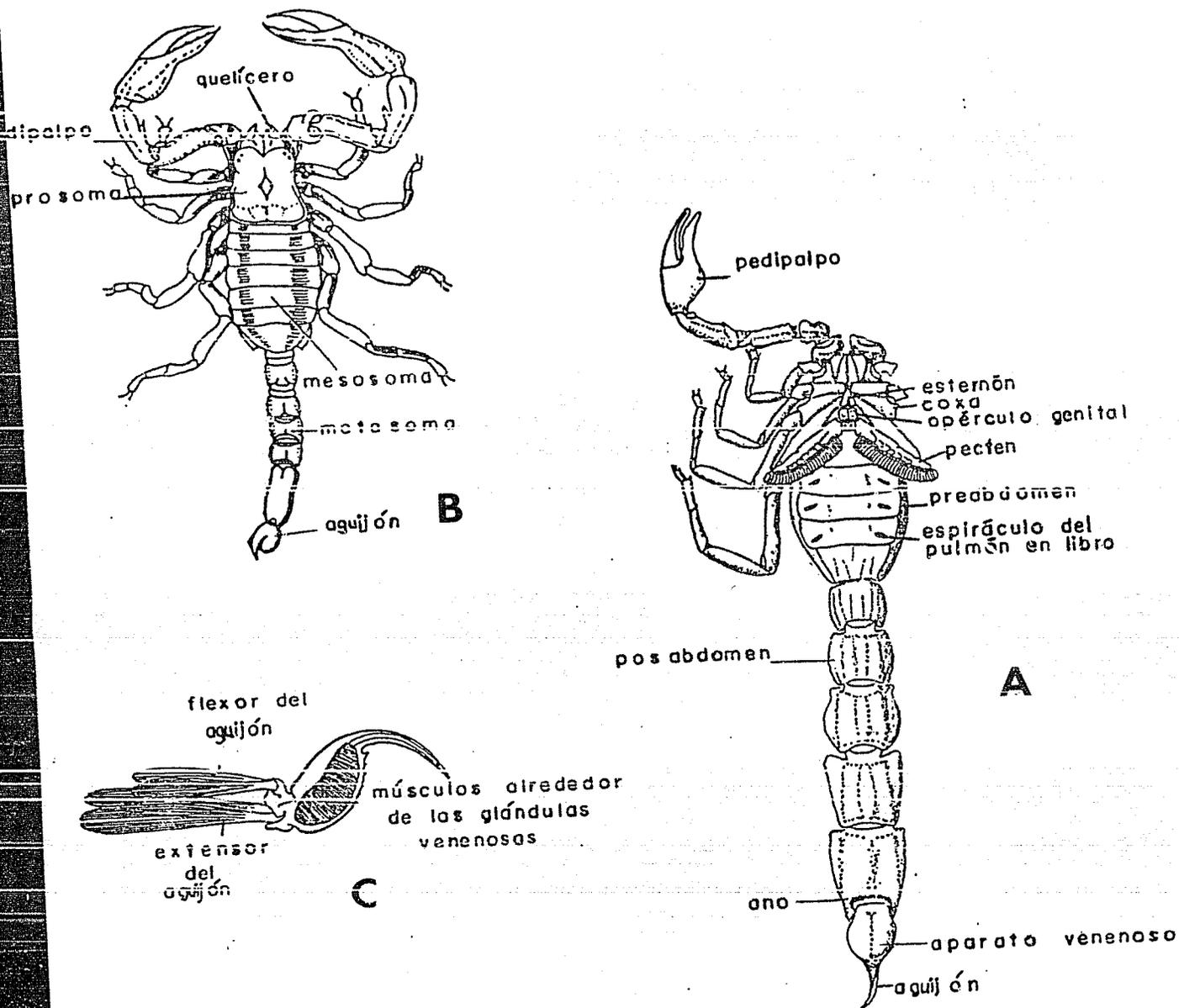


Fig. 2. Anatomía externa de los alacranes. A. Vista ventral B. Vista dorsal; C. Esquema de una sección longitudinal del telson mostrando la musculatura. (Tomado de Meglisch, 1981)

- Morfología, Histología y Función del Aparato Venenoso

Las glándulas venenosas del alacrán están situadas en el extremo posterior del metasoma, en el interior del telson, el cual, está constituido por una porción bulbosa (la vesícula o ampulla) dentro de la cual se alojan un par de glándulas y el aguijón, aculeus o conducto por el cual atraviesa el veneno para ser inyectado (Stanhke, 1978).

En la base de la vesícula existe un pedículo cuyo tamaño varía dependiendo de la especie; en la base de este último, se encuentran las papilas anales y una placa quitinosa llamada placa pedicular. En la parte distal de la vesícula se localizan dos cerdas simples a partir de las cuales se considera que comienza el aguijón en cuya base presenta un diente subaculear bien desarrollado en la especie *Centruroides noxius* Hoffmann (Sámano et al, 1964; Gómez, 1963; Ruiz, 1963) (Fig. 3a).

Como el resto del cuerpo, el telson también se encuentra cubierto de cutícula que a este nivel está bien desarrollada. La cutícula está formada por tres capas superpuestas:

- La externa o epicutícula.
- La media o exocutícula relativamente rígida.
- La interna o endocutícula dividida en una porción exuvial constituida de capas sobrepuestas de quitina y formada después de la muda, y otra preexuvial formada antes de la muda.

El núcleo de la cutícula la forma la asociación de la exocutícula con la endocutícula (Gómez, 1963; Dent, 1979).

"El tejido glandular se encuentra dispuesto

simétricamente dentro de la vesícula constituyendo dos glándulas ovoides limitadas en su parte superior por la endocutícula y en la inferior por una fuerte túnica muscular que se adhiere a los apodemas de la cutícula por la parte superior de las paredes laterales envolviendo a las glándulas solamente por el lado libre de quitina. Las glándulas ocupan toda la longitud de la vesícula dejando en la región superior un espacio amplio lleno de veneno y linfa" (Sámano et al, 1964).

La glándula esta constituida por un epitelio dispuesto en dobleces a manera de vellosidades que amplian la superficie epitelial formando una estructura acinar (Mazurkiewicks y Bertke, 1972). De acuerdo a la cantidad de vellosidades que presentan las glándulas maduras pueden clasificarse en primitivas o embrionarias, cuando poseen pocos dobleces y en definitivas cuando la estructura sea más complicada; esta clasificación está basada en el estudio del desarrollo de glándulas venenosas en diferentes especies de alacranes (Pawlowski, 1914).

De la parte anterior del telson se proyectan al interior de la luz glandular algunas vellosidades que recorren longitudinalmente toda la vesícula, dichas vellosidades presentan ramificaciones transversales; desde la porción glandular libre de cubierta muscular se presentan proyecciones musculares al eje longitudinal de la vesícula, de este modo, las vellosidades ocupan casi la totalidad de la cavidad dejando un espacio reducido en donde se vierte el veneno (Martínez, 1964).

El epitelio glandular descansa sobre una fina

membrana basal que se adhiere íntimamente a la superficie interna del macizo muscular y al epitelio cúbico de la cutícula además de proyectarse hacia la cavidad general formando ramificaciones. Las células son cilíndricas y forman un epitelio simple; su altura es de 100 micras aunque varía según la especie (Sámano, 1964); poseen núcleos redondos, adyacentes a la membrana basal; el aparato de Golgi forma un retículo colocado cerca del núcleo y orientado hacia el polo secretor de la célula, además, presenta microvellosidades en su borde libre. Los productos de secreción parecen ser almacenados en gránulos (Bucherl, 1971); pueden observarse gránulos finos, medianos y grandes que se tiñen de azul oscuro con colorantes metacromáticos. Cada célula contiene un solo tipo de gránulo (Keegan y Lockwood, 1971); varios autores asumen que estos gránulos contienen veneno.

Entre las células epiteliales se encuentran otras no secretoras, las cuales guardan una posición basal; han sido descritas por Pawlowsky (1926) como células de soporte (Stutzellen), por Bucherl (1964) como células de sustitución (Ersatz), y como células mioepiteliales por Sámano et al (1964). En base a tinciones metacromáticas utilizando azul de toluidina, se han descrito dos tipos celulares mucosos independientes de los que contienen veneno, uno de ellos con glóbulos de varios tamaños y el otro, con un contenido amorfo (Keegan y Lockwood, 1971).

La relación entre la producción del veneno y las células productoras del mismo ha sido discutida por varios autores: Kubota, 1948; Bucherl, 1964; Sámano et al, 1964; Probst, 1972; este último piensa que la secreción se forma en la

parte basal de la célula y luego se desplaza hacia el borde libre para ser arrojada hacia el lumen después de que las células adyacentes han vaciado su contenido. De acuerdo con él la misma célula es capaz de producir veneno varias veces, es decir, son esencialmente glándulas merocrinas cuya secreción es producto del metabolismo celular y se expulsa a través de su membrana en vesículas de modo que la célula se mantiene íntegra y sin pérdida de citoplasma; sin embargo la mayoría de los autores coinciden en identificar a la glándula que nos ocupa como apocrina en las cuales el citoplasma celular se incorpora a la secreción. Basándose únicamente en criterios morfológicos (Sámano et al., 1964; Bucheri, 1971) se considera que la actividad secretoria consta de cuatro fases:

- Fase de reposo: en la cual las células presentan citoplasma homogéneo.
- Fase de elaboración: con células que presentan en su parte basal numerosas granulaciones finas muy uniformes.
- Fase de acumulación caracterizada por la adopción de una forma celular similar a la de un cáliz originada por el almacenamiento de grandes gránulos en el citoplasma.
- Fase de expulsión: en la que el veneno contenido en los gránulos sale de la célula junto con pequeñas cantidades de citoplasma.

El lumen de la glándula se ha propuesto como un reservorio de veneno ya que se ha observado abundante material membranoso unido a vesículas (Mazurkiewicks y Bertke, 1972).

El proceso de inoculación del veneno del alacrán está condicionado por la contracción de dos capas musculares (una longitudinal y otra circular), esta acción comprime al epitelio glandular en contra de la cutícula forzando, de esta manera, la expulsión del veneno a través del aculeus, el cual, está formado por un par de conductos revestidos por una capa de células cuboidales dispuesta sobre una membrana basal delgada y recubiertos por una capa quitinosa (Bucher], 1971; Stahnke, 1978), dichos conductos se estrechan conforme se acerca el extremo caudal del aculeus; la disminución progresiva de su diámetro explica la incapacidad de generar un flujo retrógrado así como las presiones elevadas que se crean durante la inyección y expulsión del veneno; es probable que los componentes se mezclen durante este último proceso como el resultado del rompimiento de la vesículas determinado por los factores de presión y flujo antes descritos (Mazurkiewicz y Bertke, 1972)

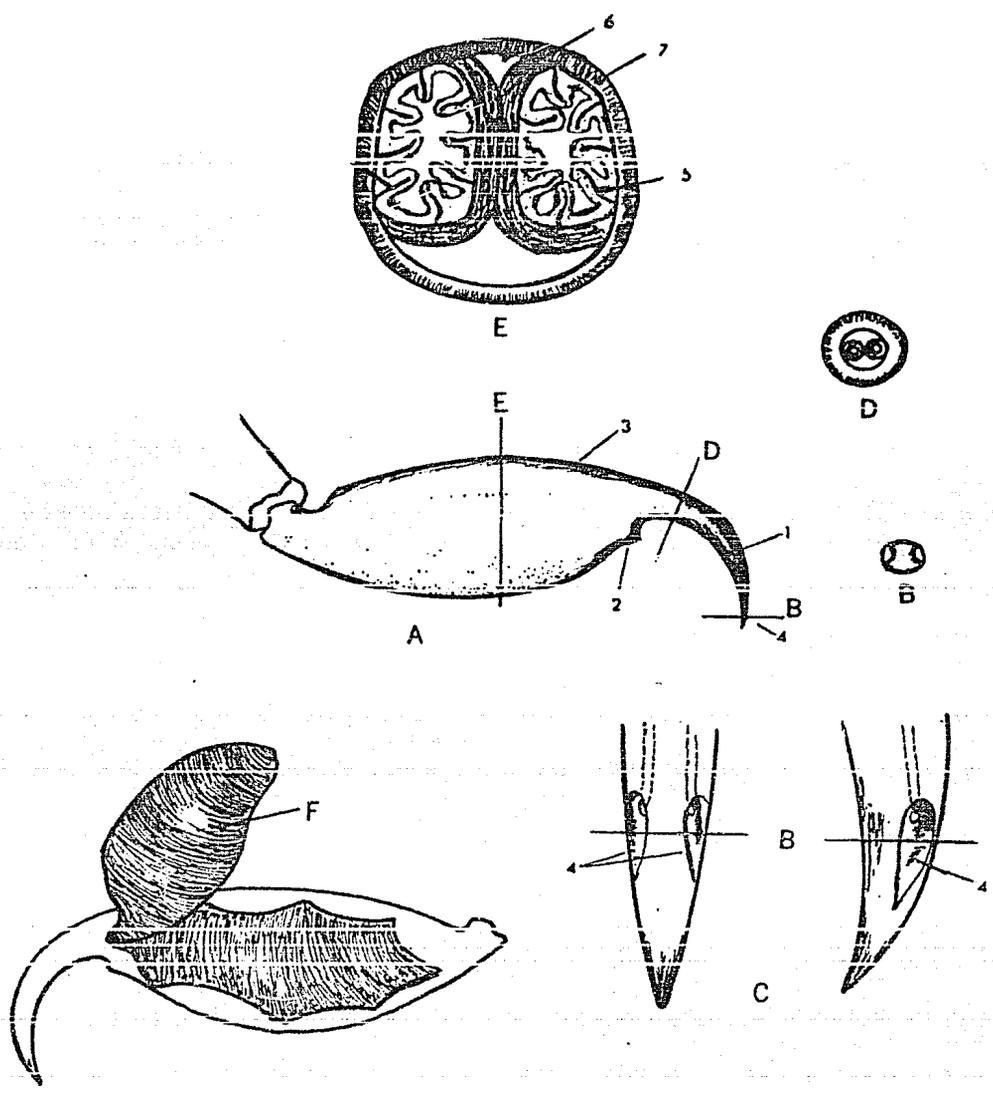


Fig. 3. Aparato venenoso de Alacrán. A. Telson compuesto de (1) Aguijón o Aculeus; (2) Tubérculo subaculear; (3) Ampolla o vesícula; (4) Apertura del canal del veneno B. Sección Transversal a nivel de la apertura del canal. C. Amplificación del aculeus. D. Sección transversal que muestra los canales del veneno. E. Sección transversal que muestra ambas glándulas (5) del veneno; (6) Músculo estriado; (7) Cutícula. F. Glándula venenosa removida del telson. (Según Stahnke, 1978)

II VENENOS

- Venenos Animales

En la naturaleza existen una gran diversidad de especies animales que poseen venenos, desde organismos unicelulares hasta mamíferos. Esta adaptación biológica (producción de veneno), es acompañada por una gran heterogeneidad de diseños anatómicos adecuados a las necesidades de formación y liberación de sustancias tóxicas. También son de gran diversidad los efectos patogénicos de los venenos. Dichas diferencias son la expresión de una composición química variada: algunos compuestos alifáticos (alcoholes, aldehídos, etc...) y cíclicos (fenoles, y quinonas) son típicos de las secreciones de defensa en artrópodos; los alcaloides de naturaleza triterpénica-esteroidal son característicos de los venenos de anfibios; los péptidos son comunes en la secreción tegumentaria de anfibios, en venenos de serpientes y de alacranes; compuestos glucoproteicos son secretados por algunos dinoflagelados (Miranda et. al, 1961; Pavan y Dazzini 1971).

Estos compuestos no aparecen como constituyentes únicos en los venenos, sino que forman parte de una mezcla heterogénea la cual explica la diversidad de los efectos patológicos; así tenemos que algunos componentes tienen efectos sinergistas ya que poseen una acción semejante específica sobre un tejido, v. gr. la lisis directa de eritrocitos debida a la acción sinergista de la fosfolipasa A y el factor lítico directo en los venenos de serpientes y de abejas (Slotta et al., 1967).

Otra forma de acción cooperativa se expresa como la penetración facilitada de componentes tóxicos por otros no tóxicos, caso que se puede observar con el veneno del alacrán *Mastigoproctus* el cual contiene ácido acético, ácido caprílico y agua, mezcla que sirve como solvente permitiendo la penetración y difusión de los otros componentes del veneno (Zlotkin, 1973).

Desde el punto de vista evolutivo, el uso de sustancias químicas con propósitos de defensa o para la obtención de alimentos puede ser considerado como una solución eficiente de ahorro energético. De hecho, la amplia distribución de estos mecanismos en el reino animal es una expresión del enorme valor que tienen para la supervivencia por lo que se les considera como mecanismos evolutivos convergentes. Siendo así uno esperaría encontrar una relación selectiva entre la composición del veneno y su actividad contra organismos que habitan el ambiente natural del animal venenoso; sin embargo, la mayoría de los venenos de reptiles, alacranes y arañas tienen una potencia letal para mamíferos y artrópodos e inclusive para organismos unicelulares (Johnson, 1966); en estos casos puede pensarse que la letalidad a diferentes organismos se debe a un mismo factor o factores del veneno que afectan a un tejido esencial o a un proceso fisiológico común a todos los organismos o quizás a diversos factores que afectan selectivamente diferentes grupos de organismos. La evidencia experimental apunta hacia el segundo enunciado, así por ejemplo el estudio del veneno de 18 especies de alacranes demostró que tenían actividad letal para ratones, mientras que indujeron parálisis en insectos (Johnson, 1966).

Se sabe que los escorpiones son principalmente predadores de insectos, sin embargo, estudios paleontológicos han demostrado que los antiguos alacranes euriptéridos vivieron en estrecha relación con algunos vertebrados como los peces ostracodermos y placodermos (Romer, 1977), esto sugiere la posibilidad de que el fenómeno de selectividad de las toxinas, represente una adaptación química a cambios en las fuentes alimenticias o en las especies predadoras durante la evolución. En la actualidad, el estudio del fenómeno de selectividad de las toxinas, ha permitido su aplicación como herramienta experimental en el campo de la Biología.

- Venenos de Alacranes

El problema médico que representan los venenos de los alacranes fue, durante mucho tiempo, la motivación principal y el único propósito de investigación sobre el campo. En varias regiones del mundo tales como México (Nazzotti y Bravo-Becherelle, 1961), Brasil (Bucherl, 1971), el norte de África (Balozet, 1971) y el medio oriente (Shulov, 1955) los alacranes representan un problema de salud; sin embargo, el mejoramiento de los servicios médicos ha reducido la morbilidad y mortalidad causadas por la picadura del alacrán.

Hoy en día, las toxinas de estos venenos son utilizadas como herramientas en el estudio de procesos fisiológicos esenciales, como fuentes potenciales para la obtención de agentes terapéuticos nuevos y como bases para el estudio de relaciones zoológicas, de comportamiento y taxonómicas entre este grupo de artrópodos.

El veneno de alacrán obtenido por estimulación manual o eléctrica del telson (Bucherl, 1971; Zlotkin et al. 1978; Rochat, 1979) es una sustancia opalescente y de apariencia lechosa con un pH aproximado de 7.0; una vez disuelto en agua se puede separar por centrifugación una fracción insoluble (no tóxica) constituida por mucoproteínas y desechos aparentemente membranales, y una porción soluble (tóxica) formada de componentes con naturaleza polipeptídica y en menor proporción por aminoácidos libres, sales inorgánicas, lípidos y nucleótidos. La actividad enzimática del veneno del alacrán es pobre, sin embargo, ha sido posible detectar la existencia de hialuronidasa

(factor de penetración y difusión), fosfolipasa A₂, fosfomonoesterasa, 5'-nucleotidasas y fosfodiesterasas en algunas especies. (Tu, 1977).

La acción letal del veneno se atribuye a una serie de polipeptidos que difieren en su grado de toxicidad y composición de aminoácidos. Aunque existen amplias variaciones entre la toxicidad del veneno de las diferentes especies de alacranes, suele observarse una sintomatología similar en las víctimas que han sido inoculadas; esta sintomatología se debe principalmente a la respuesta del sistema nervioso autónomo ante el agente agresor, la respuesta está constituida de las siguientes manifestaciones clínicas: hiperestésias, dolor local intenso e inmediato, entumecimiento de lengua y garganta, hiperexcitabilidad, salivación, diaforesis, lagrimeo, midriasis, en casos severos exoftalmia, fotofobia, distensión gástrica, taquicardia, arritmias, hipertensión seguida de hipotensión, convulsiones, contracciones musculares, parálisis flácida acompañada de tetania en los miembros inferiores, disnea y finalmente, sobreviene la muerte por parálisis respiratoria que puede ocurrir desde unos cuantos minutos hasta varias horas después de la picadura (Bravo-Becherelle y Mazzotti, 1961; Flores, 1963; Balozet, 1971; Zlotkin, 1978; Possani, 1983). El efecto tóxico y la potencia del veneno dependen de diversos factores algunos de los cuales son:

- Dependientes del alacrán: especie, capacidad y estado funcional de las glándulas productoras del veneno y la dosis

inoculada.

- Dependientes del huésped: peso, edad, estado de salud previo, sensibilidad específica hacia el componente tóxico del veneno y el lugar de la picadura (Hoffmann, 1938; Flores, 1963).

Una medida cuantitativa de la toxicidad y/o letalidad de los venenos de alacranes es la dosis letal media (DL 50), esta medida varía dependiendo de la especie estudiada, de la cepa de ratones utilizada así como de la vía de administración y manipulación estadística de los datos. En la tabla I se muestran las DL 50 de 18 especies de alacranes probadas en ratones y larvas de mosca utilizando el mismo método, se puede observar que las especies más potentes son el alacrán africano *Leiurus quinquestriatus* y el mexicano *Centruroides noxius*. (Ver Tabla I)

El aislamiento y caracterización de las diversas toxinas que constituyen el veneno del alacrán fueron posibles gracias al desarrollo y aplicación de las técnicas cromatográficas de filtración en gel y de intercambio iónico, así como de electroforesis y del análisis y secuenciación de aminoácidos; de esta manera, la solubilización en agua o en buffer (solución amortiguadora) del veneno seguida de centrifugación y de análisis cromatográfico en columna, del sobrenadante correspondiente, se ha convertido en el procedimiento común para la purificación de los componentes tóxicos (Miranda, 1961; Zlotkin et al., 1978). Gracias a los métodos mencionados, se ha podido encontrar que las toxinas del veneno son proteínas solubles en agua, precipitables por

TABLA I Dosis letales medias (DL₅₀) sobre ratones y sobre larvas de moscas de diferentes especies de alacranes.

Especie de alacrán	DL ₅₀ mg/kg en ratón	DL ₅₀ mg/kg en larva
<u>L. quinquestriatus</u>	0.25	2.2
<u>C. noxius</u>	0.26 [†]	-
<u>A. aeneas aeneas</u>	0.31	0.5
<u>A. mauretanicus maur.</u>	0.31	4.7
<u>A. australis</u>	0.32	2.9
<u>C. santa maria</u>	0.39	32.2
<u>A. crassicauda</u>	0.40	6.8
<u>Tityus serrulatus</u>	0.43 -1.25 [†]	21.7
<u>Buthiscus bicalcaratus</u>	0.60	0.7
<u>C. limpidus tecomanus</u>	0.69	2.2
<u>A. amoreuxi</u>	0.75	3.6
<u>Buthacus leptochelis</u>	0.77	0.9
<u>B. occitanus tunetanus</u>	0.90	0.7
<u>B. arenicola</u>	0.99	0.7
<u>C. sculpturatus</u>	1.12*	-
<u>B. occitanus paris</u>	4.15	0.3
<u>Buthotus minax</u>	4.25	3.0
<u>Parabuthus transvaalicus</u>	4.25	3.5

Tomado de Zlotkin y col. (1971)

[†] Tomado de Possani y col. (1977)

+ Tomado de Dent y col. (1980)

* Tomado de Stahnke (1963)

acetona y de comportamiento básico en la electroforesis y en la cromatografía de intercambio iónico a pH ácido.

La purificación de las toxinas del veneno de alacrán no es un tarea fácil dado la semejanza de pesos moleculares y propiedades fisicoquímicas que presentan, sin embargo, se ha logrado hasta la fecha la purificación de unas cien toxinas aproximadamente, de las cuales, 23 ya han sido secuenciadas en su totalidad y de 33 más se conoce la secuencia parcial del extremo amino terminal (Possani, 1982, 1983). Entre los venenos que están mejor caracterizados se encuentran los de las especies de alacranes originarias del Norte de Africa (*Androctonus australis*, *A. mauretanicus*, *Buthus occinatus paris*, *B. occinatus tunetanus* y *Leiurus quinquestriatus quinquestriatus*) de sudamérica (*Tityus serrulatus*) y de Norteamérica (*Centruroides sculpturatus*, *C. suffusus suffusus*, *C. limpidus limpidus*, *C. limpidus tecomanus*, *C. elegans* y *C. noxius Hoffmann*).

En general podemos decir, que las toxinas de los venenos de los alacranes están constituidas por cadenas polipeptídicas simples relativamente pequeñas, la mayor parte formadas de 60 a 74 aminoácidos (a.a.) y algunos péptidos más cortos de 36 a 39 a.a. (Possani et al., 1982)

Los aminoácidos más abundantes (5 a 10 en cada toxina) son lisina, cisteína, tirosina y en menor cantidad fenilalanina e isoleucina en algunas especies (1 a 2 a.a.) o fenilalanina e histidina. La metionina es un a.a. que rara vez se presenta en las toxina de alacrán (Possani, 1983).

TABLA II. SECUENCIA DE AMINOACIDOS DE LAS TOXINAS DE LOS ALACRANES

Grupo			
	C.n.	II.9.2.2	KEGYLVKDKNTGCKYECLKLGDNNDYCLRECKQQYKAGGYCYAF-----ACWC...
	C.n.	II.14	KDGYLVDAK-GCKKNCYKLGKNDYCNRECRMKHRG...
	C.n.	II.13	KEGYIVDYHDGCKYXCYKLGDNNDY...
	C.n.	II.10	KEGYLVNXY...
1.	Css	II	KEGYLVSKSTGCKYECIKLGDNDYCLRECKQQYKSSGGYCYAF-----ACWC-THLY-EQAVVWPLPNK-TCN
	Css	III	KEGYLVSKSTGCKYECIKLGDNDYCLRECKQQYKSSGGYCYAF-----ACWC-EALP-DHTOVV-VPNK--CT
	Css	I	KEGYLVSKSTGCKYECIKLGDNDYCL...
	CsE	I	KDGYLVEK-TGCKKTCYKLGENDFCNRECKWKIIGGSYGYCYGF-----GCYC-EGLP-DSTQTWPLPNK--CT
	C.e.	II.6.3	KEGYLVBIHSTGCKYECFKLGDNDYCLRECR...
	CsE	v1	KEGYLVKKS DGCKYDCFWLKGHEHNTCECKAKNQGGSYGYCYAF-----ACWC-EGLP-ESTPTYPLPNK--CS
	CsE	v2	KEGYLVNKSTGCKYGCILKLGHEGKCECKAKNQGGSYGYCYAF-----ACWC-EGLP-ESTPTYPLPNK--CSS
	CsE	v3	KEGYLVKKS DGCKYGCILKLGHEGDCDTECKAKNQGGSYGYCYAF-----ACWC-EGLP-ESTPTYPLPNK-SC
2.	T.s.	III-10	KEGYLMD-HEGCKLSCF-IKPSGYCGRECGIKK--GSSGYCAWP...
	T.s.	III-8	KEGYAMD-HEGCKFSCF-IRIAGFCGDGYCNTHLK-ASSGYCAW...
	R.B.	IV-5	KKDGYI'VE-YDNCAIYICW-NYDHAYCDKLCCKD-KK-ADSGYCYW...
3.	AaH	I	KRDGYIVYPN-NCVYHCYPP-----CDGLCKKN-GSSSGSSC-FLVPSGLACWC-KDLP-DNVPIKDTSRK--CT
	AaH	I'	KRDGYIVYPN-NCVYHCYPP-----CDGLCKKN-GSSSGSSC-FLVPSGLACWC-KDLP-DNVPIKDTSRK--CT
	AaH	I''	KRDGYIVYPN-NCVYHCYPP-----CDGLCKKN-GSSSGSSC-FLVPSGLACWC-KDLP-DNVPIKDTSRK--CTR
	AaH	III	VRDGYIVNSK-NCVYHCYPP-----CDGLCKKN-GAKSGS-CGFLPSGLACWC-VALP-DNVPIKDPYK--CHS
	Amm	III	GRDGYIVDTK-NCVYHCYPP-----CDGLCK...
4.	Bom	I	GRDGYIAQPE-NCVYHCYPSIIG--CDTLCKEK-GATSGX-CGFLPGXKVA...
	Bom	IV	GRDAYIAQPE-NCVYECAKNSY---CNDICTKX-GATSGY-CXW...
	Bom	VI	VRDAYIAQPD-NCVYHCAKDMY---CNDLCT...
	Bom	PI	GRDAYIAQPE-NCVYECAKSSY---CNXLC...
5.	AaH	II	VKDGVIYDDV-NCTYFCGR---NAYCNEECTKL-KGESG-YCQWASPYGNACCYK-LP-DIVRTKGPGR---CH
	Lqg	V	LKDGYIVDDK-NCTFFCGR---NAYCNDLCTKN-GGESG-YCQWASPYGNACCYK-LP-DRVSIKEKGR---CN
	Amm	V	LKDGYIDDL-NCTFFCGR---NAYCNDLCTKN-GGESG-YCQWASPYGNACCYK-LP-DRVSIKEKGR---CN
	Bot	III	VKDGVIYDDR-NCTYFCGR---NAYCNEECTKL-KGESG-YCQWASPYGNACCYK-VP-DIVRTKGPGR---CN
	Bot	XI	LHXGYIVDDR-NCTYFCGT---NAYCNEECTKL-KGE...
	Bop	M10	VRDGYIADDK-DCAYFCGR---NAYCNEECTKL--CAESG-KCYAGQYGNACCYK-LP-DNVPIKQKVSCK-CN
6.	Lqg	IV	GVRDAYIADDK-NCVYTCGS---NSYCNTECTKD-GAESG-YCQWLGKYGWACWIK-LP-DKVPPIRIP---GK-CR
	Amm	VI	DARDGYIVQPH-NCVYHCYK---NPPC...
	Bot	II	GRDAYIAQPE-NCVYECAK---NSYCNLCTKN-GAKSG-YCQWLGKYGWACWIK-LP-DKVPPIRIP---CHF
	Bot	I	GRDAYIAQPE-NCVYECAG---NSYCNLCTKD-GATSG-YCQWLGKYGWACWIK-KDLP-DNVPIRIPGK---CHF
	Bot	VIII	VRDAYIAQNY-NCVYTCFK---NSYCNLCTKN-GAKSG-YC...
	Lqg	III	VRDAYIAKNY-NCVYECFR---NSYCNLCT...
7.	Bop	I	GRGYIADIA-NCAY...
	Bop	II	GRDAYIADIX-NCAYKCAL---XNYCN...
7.	C.N.	II-11	TII...
8.	AaH	IT	KXNGYAVDSS-GKAPECLL---SNYCNNOCTKV-HYADKGYCCLL-----SCYCFGLNDDKVKVLEISDTRKSYCDTTIIN
9.	Be	IT	HCMPCFTRPDMAQQRACCKGRGKCFGPQCLCGYD
	Amm	P2	CGPCFTTDPYTESKCATCCGGKCVGPQCLCNRI

C.n. II.9.2.2., II-14, II-13, II-10, II-11 del Centruroides noxius activas en mamíferos (Possani y col., 1981); Css I, II, III de Centruroides suffusus suffusus activas en mamíferos (García 1976; Zlotkin y col., 1978); CsE I activa en pollos del Centruroides sculpturatus Ewing (Babin y col., 1975), CsE v1, v2, v3 variantes del mismo veneno activas en insectos (Zhdavona y col., 1974); T.S. III-10, III-8, IV-5 del Tityus serrulatus activas en mamíferos (Possani y col., 1981); AaH I, I', I'', III, II del Androctonus australis Hector activas en mamíferos (Rochat y col., 1976; 1970 abc, 1972); AaH IT toxina del mismo alacrán activa en insectos (Zlotkin y col., 1971; Rochat y col., 1979); Amm III, V, VI del Androctonus mauretanicus mauretanicus activa en mamíferos; Amm P2 péptido homólogo al Be IT activa en insectos (Rochat y col., 1979); Be IT del Buthus opus activa en insectos (Zhdavona y col., 1977); Bop I, II del Buthus occitanus paris activa en mamíferos (Rochat y col., 1976); Bot I, II, III, VIII, XI del Buthus occitanus tunetanus activa en mamíferos (Rochat y col., 1976, 1970b, 1979); Lqg III, IV, V del Leiurus quinquestriatus quinquestriatus activa en mamíferos (Kopeyan y col., 1978; Rochat y col., 1976, 1970). Be M10 del Buthus opus activa en mamíferos (Grishin y col., 1981); Bom I, IV, VI, PI del Buthus occitanus mardochei (Vargas y col., 1982) Las secuencias de aminoácidos se alinearon respecto a la posición de los residuos de Cisteína y se asignaron arbitrariamente deleciones (-). (X) significa residuo no identificado.

membranas excitables en sistemas tales como la placa neuromuscular, rebanadas de cerebro de rata, sinaptosomas de rata, células cardíaca de embriones de pollo, entre otros. (Del Pozo et al., 1947; Gómez et al., 1973; Jover et al., 1978; Catteral, 1980; Cárabez y Possani, 1982).

- Toxinas que actúan en insectos, como en el grillo en el músculo de cucaracha, etc. (Zlotkin et al., 1978)

- Toxinas que poseen efectos sobre crustáceos los cuales aun no estan bien caracterizados (Zlotkin et al., 1978).

Además de las toxinas con acción conocida sobre los canales de sodio, se han aislado recientemente del veneno de los alacranes de los géneros *Centruroides* y *Tityus* algunas toxinas específicas para el canal de potasio (K) en mamíferos (Possani, 1982; Carbone et al., 1982, 1983; Sitges et al., 1986)

La diversidad estructural y funcional de las toxinas ha llevado a algunos autores a postular que estas moléculas representan líneas evolutivas divergentes de un ancestro común (Rochat et al., 1970; Possani et al., 1982). El alto grado de homología de secuencia sugiere que la conservación de algunos aminoácidos juega un papel importante en la determinación de las funciones biológicas de las toxinas dado que pueden constituir el sitio activo, ser esenciales para el mantenimiento de la conformación activa o servir para el plegamiento de la cadena peptídica (Zlotkin et al., 1973); así en base a los datos antes descritos se ha postulado la existencia de un polipéptido ancestral común (de longitud menor respecto de la que poseen las toxinas actuales) que originó por duplicación génica, no sólo a

las toxinas de alacrán sino también a las de las abejas y de las serpientes (Erickson et al., 1978); por otro lado, algunos autores han propuesto una posible secuencia evolutiva a partir de una enzima digestiva (serina-proteasa) la cual dió origen a la proinsulina y finalmente a las proteínas tóxicas, esto permite proponer de una hipersuperfamilia de polipéptidos (Ivanov, 1981).

- El veneno del alacrán *Centruroides noxius*
Hoffmann

Entre los venenos producidos por las diferentes especies del género *Centruroides*, el de *C. noxius* es el más potente.

Este alacrán habita en las lomerías y cerros del estado de Nayarit y sur de Sinaloa, siendo además una especie endémica desligada del resto de los alacranes mexicanos. Es un animal de color moreno rojizo que mide entre 5cm. y 8cm. de longitud, en estado adulto.

El veneno del alacrán *C. noxius* presenta la DL 50 mas baja de las especies existentes en México siendo de 0.26mg/Kg de peso de ratón; es estable y mantiene su toxicidad después de hervirse por cinco minutos (Possani et al., 1981). Del Pozo (1947, 1948, 1956) hizo varias observaciones sobre la acción del veneno total en varios sistemas experimentales tales como en el músculo estriado, en el músculo cardíaco y en la placa neuromuscular; sin embargo, estos estudios no discriminaron los diferentes elementos del veneno.

El fraccionamiento y la purificación de los componentes del veneno de *C. noxius* (Possani et al., 1981a), se realizaron con una primera separación del veneno soluble a través de una columna de Sephadex G 50 de donde se obtuvieron tres fracciones: La fracción I constituida por componentes de alto peso molecular presentando actividad de hialuronidasa, la fracción III formada por diversos componentes de bajo peso molecular positivos a ninhidrina y la fracción II que

constituye el 63% del veneno recuperado siendo la parte tóxica del mismo. La cromatografía de intercambio iónico en carboximetilcelulosa de esta última fracción, da como resultado la separación de 14 componentes, 9 de ellos tóxicos para mamíferos y dos para crustáceos (Dent et al., 1982). Normalmente se lleva a cabo un tercer paso cromatográfico para obtener en forma homogénea a las toxinas de las cuales II-9.2.1, II-9.2.2 (Possani et al., 1981) II-10.1, II-10.2 y II-11 (Possani et al., 1982), II-12, II-13 y II-14 (Possani et al., 1981c; Dent, 1980, 1982) son tóxicas en mamíferos, mientras que los péptidos II-5.3 y II-6 son tóxicas en crustáceos. La fracción II-11 llamada Noxiustoxina es la primera toxina corta (39 a.a.) que afecta a mamíferos además de tener una secuencia de a.a. completamente diferente a las toxinas ya descritas. (Tabla II y Tabla III).

En cuanto a las estructura secundaria y terciaria se ha podido establecer, por medio de técnicas de resonancia magnética y de dicroísmo circular (Possani et al., 1981c), que la toxina II-9.2.2 posee un 11% de estructura alfa-hélice y un 22% de estructura plegada tipo beta (Watters et al., 1982).

En años recientes se han estudiado los mecanismos de acción de algunas toxinas de este alacrán:

- Utilizando la técnica de voltaje sostenido en axón gigante de calamar, fue demostrado que el componente II-10 del veneno de *C. noxius* actúa como bloqueador específico reversible de la corriente entrante de sodio; esta es una diferencia importante con relación al veneno de los alacranes

Norafricanos el cual inhibe el cierre del canal de sodio, prolongando el potencial de acción (Carbone et al., 1984).

- La Noxiustoxina bloquea de manera reversible e independiente del voltaje al canal de potasio (Carbone et al., 1982). Esta es la primera toxina de naturaleza proteica con una secuencia de a.a. corta capaz de bloquear el canal de potasio.

- Se ha demostrado que la toxina II-10.2, homóloga a la Noxiustoxina también bloquea selectivamente el canal de potasio (Possani et al., 1982).

- El componente II-6 es una toxina que afecta a crustáceos, su acción se traduce como parálisis reversible en acociles y cangrejos (Possani et al., 1981a).

- Trabajos recientes han demostrado que algunas de las toxinas de este alacrán, pueden tener acción distinta sobre un mismo tipo de canal dependiendo de la especie (Sitges et al., 1986).

- Finalmente, en el veneno de la especie *C. noxius* se han identificado dos familias de toxinas que se agrupan y distinguen entre sí por sus secuencias de a.a y largo de cadena, siendo cada una de ellas específica y selectiva para canales de sodio o de potasio (Tabla III). Se ignora si cada una de estas familias se sintetizan a partir de un precursor o de varios precursores (situación que se observa en varios péptidos bioactivos).

TABLA III Secuencia de aminoácidos
de las toxinas del alacrán
Centruroides noxius Hoffmann.

TOXINA	SECUENCIA DE AMINOACIDOS
II-9.2.2	KEGLVDKNTGCKYECLKLGDN DYCLRECKQQGYKGAGGYCYAFACWC...
II-10	KEGLVN...
II-13	KEYIVCYHDGCKYXCYKLGDN DY
II-14	KDGYLVDAGCKKKNCYKLGKN DYCNRECRMKHRG...
II-11	TIINVKCTSPQKCKDKELYGSSACAKCMNGKCKCYBN...
II-10.2	TFIDVKCGSSKECP...

MATERIALES Y METODOS

I FUENTE DEL MATERIAL.

Los alacranes de la especie *Centruroides noxius* Hoffmann fueron colectados entre los meses de julio y agosto en la región aledaña a El Pantanal Nayarit a diez kilómetros de Tepic. Durante su cautiverio fueron alimentados con larvas de insectos y agua bidestilada sola o con sacarosa al 1%.

II TECNICAS HISTOLOGICAS.

- Obtención del tejido.

Para poder manipular las glándulas del veneno en cada ensayo, se aisló el telson haciendo un corte con navaja en la parte proximal al ano entre el penúltimo y el último segmentos de la cola o metasoma. En seguida se practicó un segundo corte transversal en la parte media del telson (dando lugar a dos bloques de tejido, uno proximal y otro distal) y/o en la parte distal del mismo (originando un solo bloque) dejando libre el aguijón; los bloques de tejido así obtenidos, siguieron el procesamiento subsecuente.

- Fijación.

Con el fin de obtener los mejores resultados en la conservación del tejido, se probaron varias soluciones fijadoras (TABLA IV), todas ellas disueltas en buffer salina-fosfatos (PBS) pH 7.4 (Fosfatos 0.1M, Cloruro de Sodio

TABLA IV SOLUCIONES FIJADORAS*

NOMBRE DEL FIJADOR	PARAFORMALDEHIDO (BAKER)	GLUTARALDEHIDO (MERCK)
Fijador P-4	4%	
Fijador P-10	10%	
Mezcla P4-G1	4%	1%
Mezcla P1-G1	1%	1%
Fijador Karnovsky ^o	1%	2.5%

^o Según Karnovsky (1965)

* También se utilizó Etanol absoluto

O.15M; Baker) El paraformaldehído se disolvió a 60-70 C con agitación continua, agregando una o dos gotas de hidróxido de sodio hasta que la solución se aclaró. A continuación, la solución se enfrió y se agregó glutaraldehído en cantidades variables dependiendo del fijador que se deseó preparar cuidando de mantener agitación continua.

Se ensayaron dos tipos de fijación:

- Por inmersión: Los bloques de tejido se sumergieron en la solución fijadora durante 30 minutos, una hora o tres horas según el ensayo.

- Fijación post-corte: Los bloques de tejido fueron incluidos en un medio especialmente hecho para la realización de cortes en congelación (Tissue-Tek O.C.T.; División Miles), cortados en criostato y montados en portabjetos cubiertos con gelatina; inmediatamente después de sacar la preparación del criostato se cubre con solución fijadora por 30 minutos, una hora o tres horas.

- Postfijación, corte y montaje del tejido.

Postfijación: Después de fijar el tejido, éste se somete a un lavado que se realiza de la siguiente forma:

- En el caso de fijación por inmersión se elimina el exceso de fijador al mismo tiempo que se protege el tejido para cortes en congelación por medio de lavados en sacarosa al 12%, 16% y 18% en PBS, tres cambios de 15 minutos cada uno por cada lavado.

- Para la fijación post-corte, el tejido se lavó

tres veces con 5 ml. de PBS y se conservaron los cortes en un desecador a cuatro grados centígrados hasta su uso (no más de 24 hrs. después).

Corte: Los cortes se realizaron en criostato (American Optical, Histostat microtome). Se probaron varias temperaturas de corte (desde -10 grados hasta -20 grados centígrados) así como el espesor de la rebanada (desde 5 hasta 15 micras). Para poder hacer los cortes se incluyó el tejido en Tissue-Tek (O.C.T. Division Miles) dentro de cápsulas molde (Beam) las cuales se sumergieron en hexano en un baño de hielo seco y acetona o en un ultracongelador (-70 C) durante cinco a diez minutos, tiempo suficiente para que el tejido estuviera listo para cortarse. Se realizaron cortes longitudinales y transversales.

La inclusión del tejido se intentó también en parafina y resina JB4 (resina sintética de gran solubilidad en agua) sin embargo, debido a la naturaleza del tejido y de los medios de inclusión, no se obtuvieron resultados positivos.

Montaje del tejido: Los cortes obtenidos se montaron sobre portaobjetos previamente cubiertos con una película de gelatina (Knox) preparada al 0.5% más 0.05% de Crom-Alúmina (sulfato de cromo y potasio, Aldrich), en 40% de Etanol absoluto (Baker) y el resto de agua desionizada.

Para asegurarse que el tejido se quedara pegado al portaobjetos inmediatamente después de sacar los cortes del criostato se secaron con aire tibio durante 5 minutos y se guardaron en un desecador al vacío a 4 C durante toda la noche.

-tinciones

a) Azul de Toluidina. Este colorante es un derivado de las tiazinas siendo considerado como colorante básico; tiene la capacidad de producir metacromacia (de azul a rosa) cuando se utiliza para tejidos tales como cartílago, tejido conectivo, mucinas epiteliales, gránulos de células cebadas. Es un colorante inestable porque las preparaciones teñidas con esta técnica pierden su color con el tiempo (Drury y Wallington, 1980).

Preparación: se disolvieron 0.5g de azul de Toluidina O (Sigma) en un litro de solución al 4% de borato de sodio en agua desionizada. Esta solución se aplicó directamente sobre los cortes de tejido durante 2 a 3 minutos, se retiró el exceso lavándolos 5 veces con agua desionizada. Se agregó a la laminilla una gota de glicerol (Baker) y se colocó un cubreobjetos (Procedimiento de Merchant y cols., comunicación personal).

b) Hematoxilina-Eosina.

-Hematoxilina: Colorante básico utilizado para tinciones demostrativas de núcleo celular, mielina, fibras elásticas, fibrina, neuroglia y estrías musculares (Cole, 1943; Lillie, 1965).

-Eosina: Colorante derivado de los Xantenos (tetrabromo fluoresceína), es considerado como ácido y tiñe diferencialmente tejido conectivo y el citoplasma celular cuando se utiliza acompañado de Hematoxilina (Lillie, 1965).

La técnica de Hematoxilina-Eosina es actualmente la más utilizada en los laboratorios de histopatología debido a su rápido manejo y obtención de buenos resultados en cuanto a la diferenciación del núcleo y del citoplasma así como de algunas otras estructuras ya mencionadas (Drury y Wallington, 1980).

Preparación: Se preparó la variante de Hematoxilina conocida con el epónimo de "Harris" (1900) de la siguiente forma: se disolvió 1 g. de Hematoxilina (Merck) en 10 ml. de alcohol etílico absoluto añadiendo después, 20 g. de alumbre de potasio (Sulfato de Aluminio y Potasio, Baker) previamente disuelto en 200ml. de agua caliente; esta mezcla se llevó a ebullición añadiendo posteriormente 0.5g de óxido de mercurio. Se enfrió rápidamente y se filtró quedando lista para su uso.

La Eosina (Eosina amarilla, Sigma), se preparó disolviendo un gramo del colorante en 25 ml. de alcohol etílico al 95% y agregando 75ml. de agua bidestilada.

Como esta técnica está estandarizada para cortes en parafina y los cortes que en este trabajo se hicieron fueron realizados en congelación, se elaboraron las modificaciones siguientes:

- Los pasos de desparafinación y de rehidratación fueron eliminados (cambios en xileno y etanol).

- Se inició la rutina de tinción del tejido lavándolo en agua destilada, en seguida se agregó la hematoxilina y se dejó reposar 5 minutos, se enjuagó con agua destilada y se agregó la Eosina por 5 minutos, se lavó la laminilla con agua

destilada y se montó con glicerol.

- Los pasos posteriores de deshidratación y de montaje en resinas fueron eliminados.

III CUANTIFICACION Y ANALISIS DE DATOS

Para poder establecer la existencia de poblaciones celulares y su patrón de comportamiento en el área del epitelio glandular, fue necesaria la cuantificación y el análisis de dichos datos en la siguiente forma:

Se cortó una glándula desde su extremo caudal hasta el extremo proximal en cortes seriados y ordenados en 6 laminillas, de tal manera que se obtuvieron 12 cortes por laminilla. El corte uno de la laminilla uno fue el más caudal y el corte 12 de la laminilla 4 resultó el más proximal y último. El primer corte se ubicó en la laminilla 1 (numerado como 1.1), mientras que el segundo corte se ubicó en la laminilla 2 constituyendo el corte uno de dicha laminilla (2.1), el tercer corte se ubicó en la tercera laminilla (3.1) y así sucesivamente hasta completar doce. Terminado este trabajo se tñieron las laminillas 1, 3 y 5 con Azul de Toluidina y las 2, 4 y 6 con Hematoxilina-Eosina. En seguida se identificaron las zonas y se delimitaron (según el patrón de tinción con azul de toluidina y hematoxilina-eosina); se procedió a contar célula por célula de cada tipo en cada zona (según se verá en Resultados); elaborando las anotaciones correspondientes; este procedimiento se realizó por duplicado, esto es, dos veces se contaron todas las células para cada glándula (derecha e izquierda). Se decidió tomar como región caudal a los cuatro primeros cortes de cada laminilla (1-4); la región medial a los siguientes 4 cortes (5-8) y como región rostral a los últimos 4 cortes (9-12). Se verificó que cada región correspondiera con la

morfología e histología previamente establecidas (Ver fig. B).

Los datos se ordenaron por tipo celular por zona en cada región y se vaciaron a una computadora Printaform modelo 5203 bajo un programa comercial denominado Lotus (el cual ordena datos ubicándolos dentro de rangos establecidos). Se aplicó la prueba estadística de Kruskal-Wallis, que es un análisis de varianza de una clasificación por rangos de datos no paramétricos con la cual se decide si k muestras independientes son de poblaciones diferentes.

Se establecieron comparaciones para rangos de tipos celulares en la misma zona y en zonas distintas, y entre rangos de regiones de la glándula. Esta prueba se elaboró con ayuda del programa de paquetes estadísticos GW Basic.

Se elaboraron además gráficas con los promedios de los datos por tipo celular, con ayuda del programa Print-Graph acoplado al programa Lotus. Para cada gráfica se estableció el resultado de la prueba estadística.

También se realizaron comparaciones entre los cortes de varios telsones elegidos al azar, esto con la finalidad de constatar que lo que se observó y analizó fuera representativo de la población en general.

IV INMUNOCITOQUIMICA

- Generalidades

Las tinciones inmunocitoquímicas (ICQ) se han convertido en herramientas experimentales poderosas en varios campos de investigación biológica. Esta técnica permite al investigador utilizar la especificidad de las reacciones inmunológicas aunada a la amplia resolución topográfica obtenida en las microscopías de luz y electrónica. La información obtenida es única, técnicas como la bioquímica, la inmunoquímica o la morfológica por sí solas no podrían dar tales resultados.

El principio de que los anticuerpos (Acs.) se pueden utilizar como reactivos histoquímicos en unión con marcadores adecuados, fue reconocido hace más de 50 años (Marrak, 1934). Coons (1942) fue el primero en desarrollar con éxito esta idea utilizando como marcador de anticuerpos al isotiocianato de fluoresceína para antígenos de pneumococo (Geffen, 1983). Desde entonces la popularidad de esta técnica ha aumentado por lo cual, se han elaborado varios ensayos que han perfeccionado la técnica. El objetivo de la mayoría de estos ensayos ha sido incrementar la relación señal/ruido en las preparaciones teñidas ya sea aumentando la intensidad de la señal (uso de marcadores enzimáticos en lugar de marcadores fluorescentes (Avrameas, 1972) o el grado de amplificación (técnicas de capas múltiples). (Ver fig. 4)

A pesar de que la ICQ posee principios básicos simples, están involucrados varios factores técnicos que hacen a este método laborioso por lo que se hace necesario abordar este

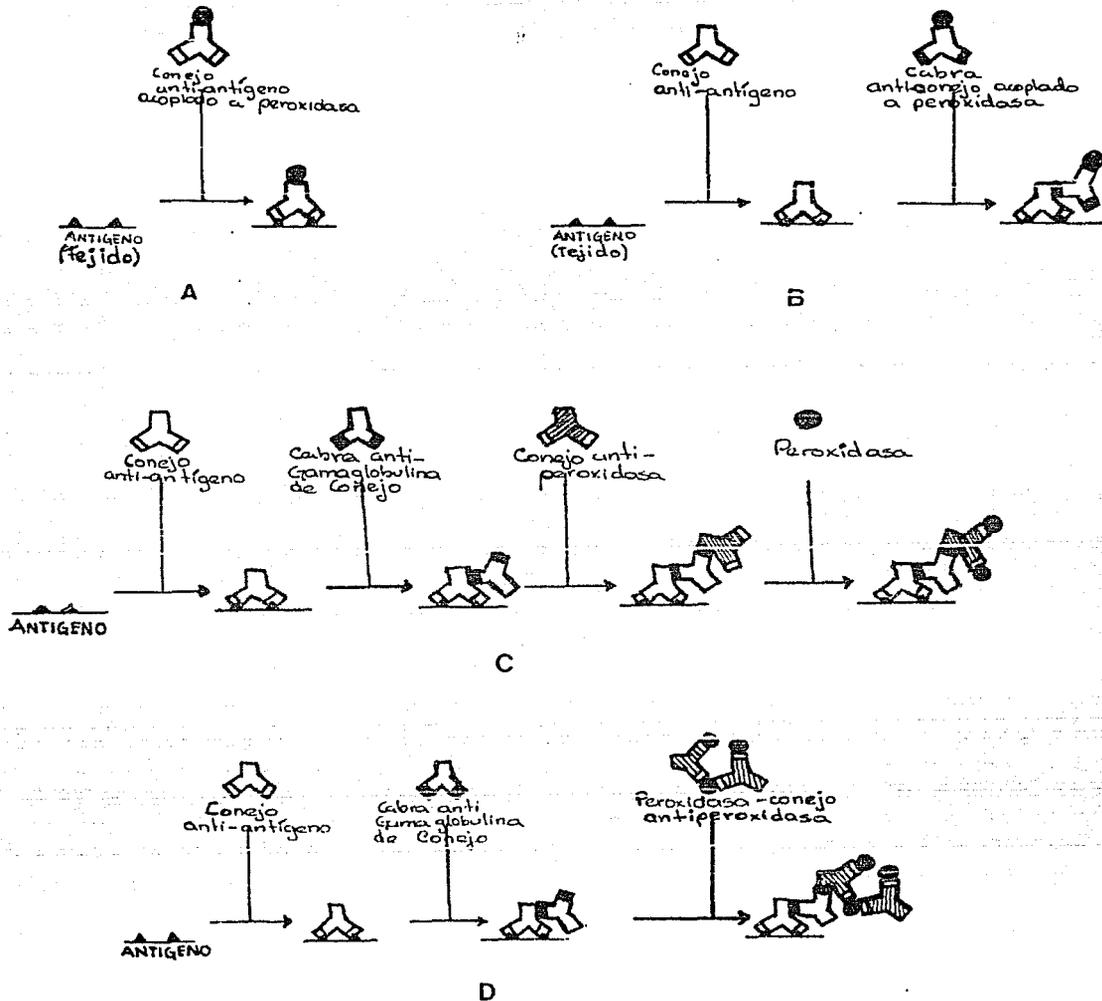


Fig. 4. Técnicas Inmunocitoquímicas. A. Inmunocitoquímica directa (Coons et al., 1942); B. Inmunocitoquímica indirecta (Weller y Coons, 1954); C. Técnica de tres capas o puente (Mason et al., 1969); D. Técnica de tres capas para el complejo peroxidasa-antiperoxidasa, PAP, (Sternberger et al. 1970).

problema de manera sistemática para poder obtener resultados confiables.

Generalmente el éxito de un método para obtener su propósito (en el caso de la ICC, la detección selectiva de los antígenos del tejido) depende principalmente de que tan práctico y confiable sea (Petrusz et.al., 1980). En cuanto a lo práctico no hay duda de la gran variedad de métodos de ICC que están a disposición para casi cualquier propósito (fig. 4), sin embargo, aun no han sido definidos claramente los criterios de confiabilidad aunque existe una gran cantidad de experiencia acumulada (Coons, 1956; Mayersbach, 1967; Sternberger, 1976; Pool, 1983).

De acuerdo con Petrusz (1976, 1977, 1980, 1983) hay cinco criterios que debieran ser aplicados al iniciarse ensayos que involucren la técnica de ICC. Estos son:

Exactitud: ha sido definida como la medida más próxima al valor real para estudios cuantitativos. En el caso del método de ICC, exactitud puede ser definido como resolución o exactitud de localización.

Precisión: en ICC se refiere al grado de reproducibilidad de los resultados.

Sensibilidad: definido como la concentración más baja de antígeno (contenido en el tejido) que puede ser discriminado del fondo (background) con cierta seguridad.

Eficiencia: definida como la relación señal/ruido que se obtiene para una preparación dada.

Especificidad: se refiere a la habilidad del

anticuerpo para detectar un determinante antigénico en particular, excluyendo a otros. Una reacción ICC es específica cuando satisface dos criterios: la especificidad del método (la tinción positiva resulta exclusivamente de la reacción inmunoquímica entre el primer anticuerpo y el antígeno del tejido) y la especificidad de anticuerpo o del antisuero (la habilidad para discriminar entre determinantes antigénicos similares).

El cumplimiento de estos criterios depende del manejo cuidadoso de varios factores tales como la preservación de los determinantes antigénicos en el tejido, la penetración del anticuerpo y otros reactivos al tejido, la dilución del anticuerpo primario, la obtención y naturaleza de los anticuerpos etc... (Bigbee, 1977; Vandesande, 1979; Pool, 1983; Grossi y Mayersbach, 1964; Rosene y Mesulam, 1978). La calidad y especificidad de la tinción inmunocitoquímica está determinada en gran medida, por el origen del anticuerpo o del antisuero utilizado: los antisueros que contienen anticuerpos polivalentes contienen varios anticuerpos dirigidos a diferentes determinantes del antígeno de importancia, así como anticuerpos dirigidos contra otros antígeno de poca valía; los anticuerpos monoclonales, en contraste, consisten en una población homogénea de anticuerpos dirigida a un sólo epítipo (Boorsma et. al., 1982; Duell et al., 1983; Milstein et. al., 1983; Sofroniew et.al.1983; Mason et. al., 1983).

La manipulación de los factores antes mencionados implica la aplicación de una serie de controles primordiales

positivos y negativos tales como las pruebas de especificidad de anticuerpos que demuestren la inhibición de la fijación con antígenos homólogos y/o la falta de inhibición por acción de antígenos heterólogos relevantes; además, la aplicación de otras pruebas inmunológicas, fisiológicas o bioquímicas que aporten información sobre la validez de la localización del antígeno (Petrusz, 1976, 1977; Swaab, 1977; Larsson, 1981; Lutz, 1979; Boer, 1979; Childs, 1983; Pool et. al., 1983).

Como se puede observar, es necesario hacer uso crítico de este método ya que de lo contrario se pueden obtener resultados que aparenten reflejar realidades fisiológicas y sean artefactuales.

- Montaje de la técnica Inmunocitoquímica.

Para empezar a manejar la técnica de ICC, se replicó un ensayo estructurado por Bloom et. al. (1978). Como modelo biológico se utilizó la hipófisis de rata en donde se detectó Beta-endorfina por medio de un antisuero de conejo-anti Beta-endorfina elaborado en el laboratorio del Dr. Bloom y segundos anticuerpos conjugados a Rodamina y a Peroxidasa (Miles Laboratories) obtenidos de cabra contra conejo. Los resultados pueden observarse en la figura 5.

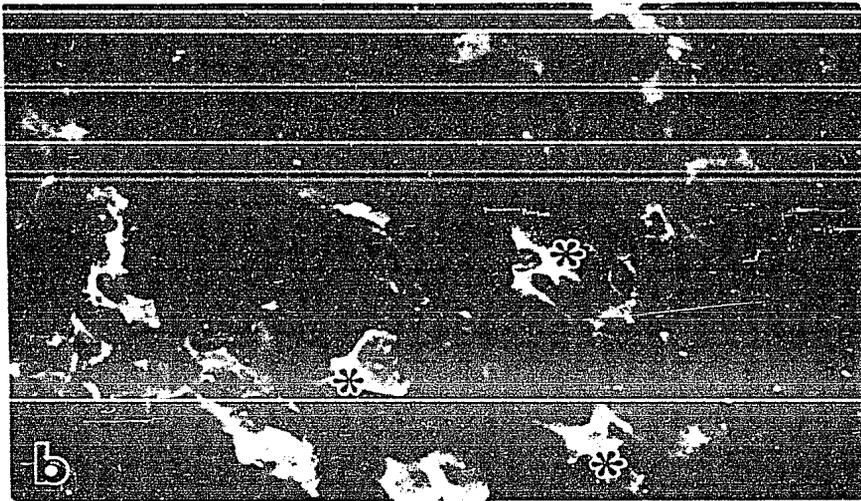
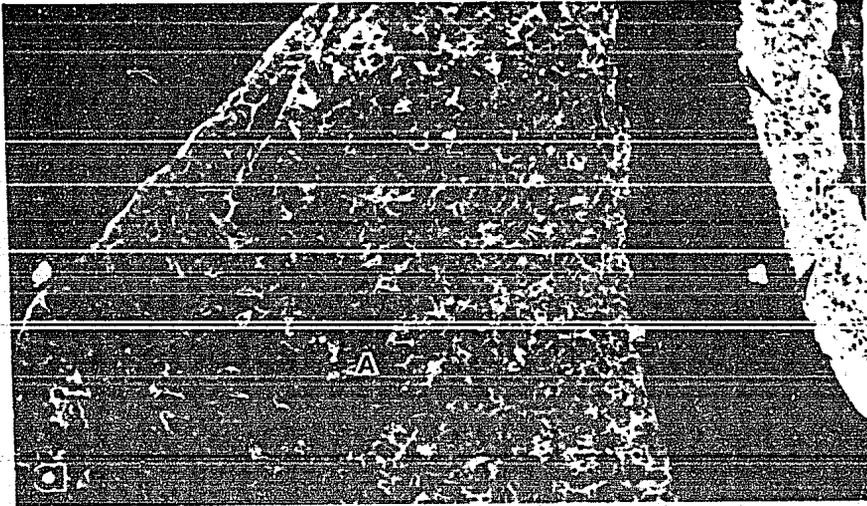
Se estandarizaron para el caso:

- Obtención del tejido: se realizó la perfusión (por vía intracardiaca) del cerebro de la rata con un fijador (Paraformaldehído al 4% en PBS), después de lo cual, se disectó la hipófisis y se dejó en el mismo fijador durante tres horas; en seguida el tejido se equilibró en soluciones de sacarosa al 12, 16 y 18%, con tres cambios de 15 minutos cada uno, para cada concentración de sacarosa,, posteriormente se cortó el tejido (-16 C; 14µm de espesor) por inclusión en Tissue-TekII (OCT, Division Miles). las rebanadas de tejido se montaron en portaobjetos previamente cubiertos con gelatina. Inmediatamente después de sacar los cortes del criostato, se secaron con aire tibio durante 5 minutos después de los cuales se inició el procesamiento para ICC.

- Diluciones de los anticuerpos: todos los anticuerpos utilizados se diluyeron en PBS con 0.3% de tritón X-100 (Sigma), se ensayaron varias diluciones del primero y del segundo anticuerpos para establecer las concentraciones óptimas

- FIGURA 5.** Fotomicrografías de hipófisis de rata que ilustran la inmunofluorescencia para β -endorfina. Se establecieron las diluciones del anticuerpo específico contra β -endorfina (RB2, 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de IgG dilución 1:50; donado por Bloom y cols.) en relación al segundo anticuerpo acoplado a peroxidasa (60 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de IgG, dilución 1:250) o a rodamina (150 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de IgG, dilución 1:100). Se obtuvieron señales intensas con fondos bajos. Los controles de fluorescencia endógena y de sustitución de primer anticuerpo específico por preinmune, resultaron negativos.
- a. Inmunotinción específica de las células de la hipófisis intermedia y de las células corticotropas en la Adenohipófisis (flechas). (80X)
A Adenohipófisis
I Hipófisis Intermedia
- b. Sección de la adenohipófisis que muestra la inmunotinción para β -endorfina en las células corticotropas (*) (320X)
- (Barra=50 μm)

FIGURA 5



que diese la mejor relación señal/ruido, esto es, el mínimo de fondo con una señal clara de las células inmunoteñidas específicamente para B-endorfina.

- Aplicación de los anticuerpos al tejido: para cubrir de anticuerpo el tejido, sin gastos excesivos del mismo, se ideó el uso de cubreobjetos con soportes delgados en los vértices de los mismos elaborados con parafina, de tal manera que el volumen bajo de cubreobjetos que cubriera al tejido pudiera ser llenado con 150 ul. de la dilución del anticuerpo, evitando la formación de burbujas en el tejido o cerca de él.

El primer anticuerpo (específico para la toxina) se aplicó después de secar el tejido, dejando un tiempo de incubación de 24 hrs en una cámara húmeda a 4 C; transcurrido este tiempo, se lavó el tejido tres veces con 2ml. de PBS-Tritón 0.3% cada vez, intentando durante el primer lavado, deslizar y remover el cubreobjetos sin dañar el tejido; los lavados restantes se utilizaron para eliminar el exceso de anticuerpo cuidando, en todo momento, de evitar la desecación del tejido.

Para la aplicación del segundo anticuerpo (antiIgG de conejo, acoplado a un fluoróforo o a peroxidasa) fue necesario cubrir de nuevo el tejido con un cubreobjetos con soportes e introducir 150 ul. de la dilución del mismo; esta vez la incubación se llevó a cabo a 37 C durante 2hrs.; posteriormente se lavó el tejido en la forma ya indicada.

En el caso en que se utilizó un segundo anticuerpo conjugado a Rodamina, fue necesario manipularlo en

semioscuridad (sin luz directa) para evitar que la fluorescencia propia del compuesto decayera; el montaje en glicerol se llevó a cabo inmediatamente después del último lavado. Las laminillas se resguardaron de la luz en portelaminillas cubiertas con papel aluminio.

En el caso en el que se utilizó un segundo anticuerpo acoplado a peroxidasa, se reveló la presencia de la acción enzimática por medio de la incubación del tejido en una solución de tetracloruro de diaminobenzidina (DAB; Sigma) 0.05% en buffer fosfatos 0.05M, pH 7.4, 0.01% de peróxido de hidrógeno por 5 minutos a temperatura ambiente y en semioscuridad. Se detuvo la reacción lavando tres veces con 2ml. de la solución PBS-tritón 0.3%; se montó la preparación en glicerol.

Las observaciones se realizaron en un microscopio Zeiss Standard, LAB16, lámpara y condensador de epifluorescencia IVEL, filtros 546/590 (excitación-absorción), y las fotografías se obtuvieron de la cámara adaptada al microscopio NC35 Zeiss con control automático de exposiciones.

- Adaptación de la técnica ICQ al tejido de las glándulas del veneno de alacrán

Después de obtener la preservación adecuada del tejido y los resultados positivos en el modelo de ensayo de la técnica, se procedió a montar la ICQ indirecta en el tejido glandular productor del veneno de alacrán, para lo cual se diseñó una estrategia que comprendía la selección de antisueros, la definición de variables a explorar para encontrar las condiciones óptimas del ensayo y los controles de especificidad.

- Anticuerpos: se utilizaron anticuerpos monoclonales específicos para dos tipos de toxinas: la toxina II-9.2.2 (representativa de las toxinas largas que actúan sobre el canal de sodio) y la toxina II-11 o Noxiustoxina (representativa de las toxinas cortas que actúan sobre el canal de potasio). Estos anticuerpos fueron elaborados por el Dr. Pascal Herión, el D.F.B. Rafael Saavedra Durán, la Bln. Rocío Sánchez y el M.en C. Fernando Zamudio, en el laboratorio del Dr. Lourival Possani P.

Los anticuerpos secundarios conejo-antiraton acoplados a Fluoresceína, a Rodamina o a Peroxidasa se compraron a la casa comercial Miles (concentración aproximada de IgG cuando A280 A = 1.4 es de 15mg/ml cada uno)

- Diluciones de anticuerpos: el buffer de dilución de los anticuerpos se probó con diferentes concentraciones de Tritón X-100. En general, se utilizó el PBS-tritón 0.3% como se describió con anterioridad.

Se establecieron varias pruebas de dilución de Acs. primarios y secundarios para poder obtener la concentración mínima necesaria con la que se pudiera observar una relación señal/ruido adecuada.

Los procedimientos de incubación y de lavado del primero y segundos anticuerpos, así como el de revelado de peroxidasa y montaje de las laminillas se establecieron de forma idéntica a los establecidos para el modelo de B-endorfina en hipófisis de rata.

- Incubación del primer anticuerpo: ya establecidos los parámetros de dilución, se utilizaron tiempos de incubación variables (3, 6, 12 y 24 hrs) para el primer anticuerpo.

- Incubación del Segundo anticuerpo: se elaboraron ensayos de temperatura de incubación del segundo anticuerpo (conejo-antiraton) con el fin de evitar, en la medida de lo posible, uniones inespecíficas del segundo anticuerpo. Las temperaturas probadas fueron 37 C y 4 C (según Boorsma et.al., 1982).

- Controles

Se establecieron varios tipos de controles que se utilizaron en el desarrollo de la técnica de ICO en el cerebro de rata para la determinación de B-endorfina y en la glándula de alacrán para la detección de toxinas (ver tabla V).

-Control Histológico: en cada uno de los experimentos se tomaron por lo menos dos laminillas con cuatro cortes cada una de ellas, se tñieron con Azul de Toluidina y

TABLA V CONTROLES PARA ICQ

NOMBRE DEL CONTROL	INCUBACION 1 ^{er} Ac.	INCUBACION 2° Ac. (PO, ROD, FITC)	OTRA INCUBACION
De fondo	-	+	
Peroxidasa endógena	-	-	Solo con DAB
Fluorescencia endógena	-	-	
De Reacción inespecífica	Preinmune u otro monoclonal o Líquido de ascítis	+	
Preadсорción	1 ^{er} Ac + toxina, FII BSA, LHRH	+	
Bloqueo de señal inespecífica *	+	+	Preinmune de conejo, o suero de conejo, o IgG de conejo anti-ratón, BSA, etc...
Control adicional de unión inespecífica	-	Anticuerpos marcados de cualquier origen	

- indica que se incubó con PBS-Tritón 0.3%

+ indica que se incubó con el anticuerpo

PO peroxidasa

ROD rodamina

FITC fluoresceína

* en este tipo de control se realizaron las 3 incubaciones en el mismo experimento, aunque no necesariamente siempre con el mismo orden (ver texto).

FII Fracción II del veneno total producido por el alacrán Centruroides noxius Hoffmann, obtenido por medio de una cromatografía en G50.

con Hematoloxilina-Eosina para verificar la integridad del tejido así como para observar las posibles relaciones existentes entre las tinciones histológicas y las inmunotinciones.

- Control de Fondo: con este tipo de control se observa la tinción que da el segundo anticuerpo al unirse de manera inespecífica con algunas moléculas del tejido y/o la precipitación inespecífica de diaminobenzidina. Este control se procesó incubando el tejido con PBS-tritón en sustitución del primer anticuerpo, y con segundo anticuerpo acoplado a peroxidasa, a fluoresceína o a Rodamina en el segundo periodo de incubación (2 AcPO, 2 AcFIC, 2 AcROD).

- Control para peroxidasa endógena: el tejido se procesó incubando el tiempo correspondiente para los dos anticuerpos con PBS-Tritón, es decir, se sustituyeron los anticuerpos por esta solución, después, se reveló con la solución de DAB, esto con la finalidad de observar alguna posible reacción (precipitación de diaminobenzidina) propia del tejido, que fuera similar a la obtenida con peroxidasa.

- Control para fluorescencia endógena: se incubó el tejido con PBS-tritón durante un lapso de tiempo correspondiente a la incubación hecha con primer y segundo Acs. Posteriormente, se observó la preparación al microscopio utilizando la lámpara de ultravioleta y los filtros correspondientes para la Rodamina y la Fluoresceína.

- Controles de reacción inespecífica: para poder certificar que con el primer anticuerpo se estaba obteniendo tinción positiva, era necesario descartar a los demás reactivos

como causantes de la inmunotinción; con este objeto se incubó el tejido con un suero preimmune de ratón (suero de animal no inmunizado) y un monoclonal no relacionado con el tejido (en este caso se utilizó un monoclonal contra LHRH donado por el Dr. Pascal Heriön) y se continuó el procedimiento de rutina.

- Controles por preadsorción: para comprobar que el primer anticuerpo estuviera reconociendo únicamente al antígeno deseado (que no haya reacciones cruzadas), se preincubó (preadsorbió) el anticuerpo monoclonal con el antígeno que se esperaba reconociera específicamente, para lo cual se utilizaron FII, en la cual se conoce que están contenidas las toxinas II-11 y II-9.2.2; y los antígenos aparentemente no relacionados BSA y/o LHRH. Los valores de concentración de antígeno requerida para obtener una preadsorción total, se estimaron en base a la constante de afinidad que debiera tener un anticuerpo para poder ser visualizable por ICC, estos valores se tomaron entre 10^{-10} y 10^{-12} M, por lo tanto, para tener la seguridad de cubrir todos los sitios disponibles del anticuerpo (saturar) las concentraciones de antígeno requeridas para tal efecto se calcularon aumentando en dos o en tres ordenes de magnitud la molaridad del antígeno, esto es 10^{-8} a 10^{-10} M.

- Controles de bloqueo de señal inespecífica: en ocasiones se presentan uniones no específicas de conjugados de segundo anticuerpo las cuales son difíciles de eliminar (ver en resultados); una manera de prevenir esta reactividad no específica es la preincubación del tejido con suero preimmune del animal que sirvió como fuente del segundo anticuerpo

(Sternberger, 1979). En este caso se utilizaron: sueros preinmunes de conejo; sueros de conejos inmunizados previamente con IgG de ratón e IgG de conejo anti-ratón purificados (donación de la M.C. Ana Ma. Sierra H.) Se utilizaron concentraciones equivalentes en los tres casos a 0.2mg/ml de IgG de conejo.

- Control adicional de la unión específica del segundo anticuerpo: este tipo de prueba es una manera de comprobar la unión inespecífica de cualquier tipo de inmunoglobulina, así se utilizaron inmunoglobulinas de cabra anti conejo acopladas a peroxidasa (Miles) en concentraciones equivalentes a las utilizadas para el anticuerpo conejo-antiratón (0.1 mg/ml.).

RESULTADOS

I PREPARACION DEL TEJIDO

Como ya se ha indicado, el tejido secretorio del veneno está contenido dentro de una gruesa capa de cutícula, esto representa un serio problema técnico puesto que la difusión del fijador a través del tejido blando (glándula) se dificulta por el tejido grueso y duro que la cubre. Aunado a este problema, se encuentra el compromiso con la técnica ICQ, esto es, la fijación debe ser lo bastante fuerte para preservar el tejido pero lo bastante suave como para mantener los determinantes de los antígenos (toxinas) y preservar la inmunoreactividad.

Los ensayos iniciales para definir el mejor fijador, el tiempo de fijación, el grosor y temperatura del corte, etc., se valoraron realizando observaciones al microscopio tomando en cuenta dos parámetros:

- Preservación general del corte: si la cutícula quedó íntegra y unida al tejido glandular, y si el tejido glandular en conjunto se observó íntegro (utilizando los objetivos de 3.4X y 10X en el microscopio).

- Preservación de la integridad celular: en ocasiones se observaron cortes que conservaron la integridad de la cutícula y del tejido glandular, sin embargo al realizar un análisis cuidadoso de las células (con los objetivos 40X y 100X) éstas se observaron desintegradas, con rupturas evidentes, o se detectaron restos de membranas, y detritus celulares. Cuando las

células aparecieron íntegras y en unión con su membrana basal se les consideró como en buen estado de preservación.

Los resultados para tales observaciones fueron los siguientes:

1. Los bloques de tejido del telson se procesaron de manera que el telson quedara en un solo bloque con aberturas en los extremos por donde pudiera entrar fácilmente el fijador: los bloques de tejido obtenidos del corte transversal inicial en la parte media del telson, se desecharon pues repetidas veces se fragmentaron al ser realizado el corte.

2. Fijación: la tabla IV muestra los fijadores empleados para las pruebas. Los resultados para el ensayo de ICQ (ver adelante) indicaron que en cada uno de ellos se establece el mismo tipo de señal, pero la preservación es completamente diferente: los mejores fijadores resultaron ser Karnovsky y P4-G1, este último se eligió como fijador de rutina para las observaciones subsiguientes de la histología glandular y para la ICQ, pensando en la posibilidad de que concentraciones altas de glutaraldehído (2.5% en fijador Karnovsky) llegaran a afectar los resultados de ICQ en pruebas posteriores. Los fijadores P-4, P-10, y P1-G1 resultaron ser poco apropiados para este tejido, por la extensa destrucción que presentó el mismo.

El tipo de fijación que se estandarizó como de rutina fue por inmersión; la fijación post-corte no resultó apropiada pues el tejido sufría deshidratación extrema.

El tiempo de fijación adecuado se estableció en tres horas después de las cuales se eliminó el fijador con sacarosa.

como ya se ha indicado (ver materiales y métodos)

Los cortes se obtuvieron en criostato a $-16^{\circ}C$ con un espesor de 10 micras, estas rebanadas resultaron adecuadas ya que evitaron superposiciones de varias capas de células en el mismo corte, además tuvieron la ventaja de brindar una adecuada adhesión al portaobjetos.

Una vez establecidas las condiciones óptimas de preparación del tejido, se inició el análisis de datos histológicos que se presentan a continuación.

II HISTOLOGIA DE LAS GLANDULAS PRODUCTORAS DEL VENENO

Las glándulas productoras de veneno del alacrán se encuentran en el telson del animal, poseen una forma ovoidal siendo el diámetro mayor la altura, la cual presenta una posición relativa oblicua con respecto al plano sagital del animal (esta disposición se refleja en los cortes transversales que se utilizaron para realizar este estudio) (Fig. 6); están recubiertas por una gruesa envoltura de quitina denominada cutícula con la cual se relacionan estrechamente mediante su cara externa, mientras que su cara interna está recubierta por una túnica muscular estriada bien desarrollada que se fija por sus extremos a la cutícula formando un receptáculo músculo-fibroso que contiene al parénquima glandular (pg.) o tejido secretor. (ver figura 6).

- Estroma de la Glándula

El soporte estructural del epitelio glandular está formado por tejido conectivo que se adhiere de manera estrecha al epitelio cúbico que sintetiza a la cutícula a lo largo de la cara externa de la glándula, así mismo, tapiza la cara interna que se relaciona con fascículos musculares creando, de esta manera, una cápsula fibrosa a partir de la cual nacen algunas proyecciones conjuntivas laminares en dirección a la luz glandular y que corren perpendiculares al plano sagital del cuerpo del animal (ver fig.6), estas proyecciones sostienen racimos de células glandulares aumentando la superficie celular apta para la producción del veneno. Estas proyecciones parecen contener en su

FIGURA 6. Microfotografías que muestran la estructura general de la glándula del veneno del alacrán *C. noxius* Hoffmann

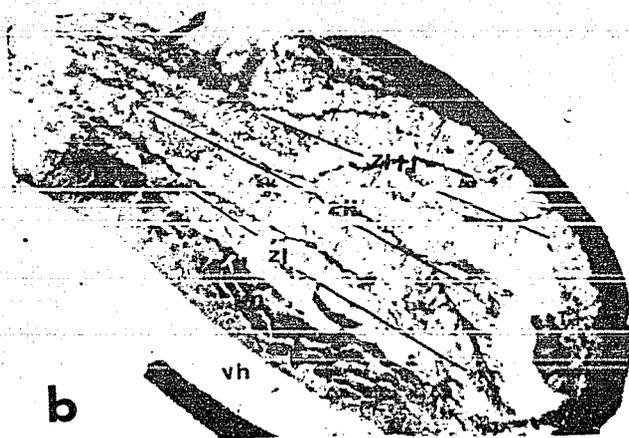
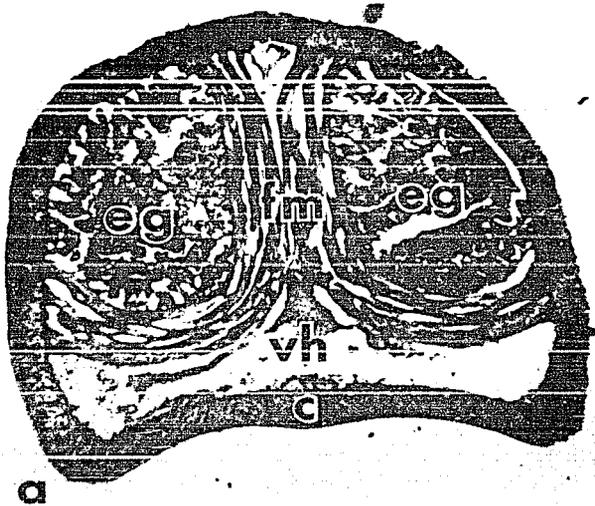
a) Corte transversal de la región medial de la glándula que muestra las estructuras generales que conforman este órgano: (C) Cutícula; (e.g) epitelio glandular; (f.m.) fascículos musculares; (v.h.) vaso hemolinfático; (t.c.) proyecciones de tejido conectivo. Se indican los elementos de referencia utilizados para la descripción anatómica:

- 1) Plano medial o sagital
- 2) Cara Externa
- 3) Cara interna

b) Corte longitudinal (ó parasagital) de la glándula. se observan las estructuras generales y la distribución por zonas de tinción del epitelio.

- ZI, Zona I o de tinción básica
- ZII, Zona II o de tinción ácida
- ZIII, Zona III o de tinción básica

FIGURA 6



interior los vasos que alimentan el epitelio, además de que se pueden observar células las cuales posiblemente sean fibroblastos, aunque estas aseveraciones, deben ser estudiadas con más cuidado. (Ver fig. 13)

- Parénquima Glandular

REGIONES. Para facilitar la descripción anatómica e histológica de las glándulas del veneno, se dividió al telson en tres regiones en sentido rostro-caudal; como se puede apreciar en la figura 7; cada región posee una anatomía externa muy particular, el telson se aplana en su parte externa (cutícula) conforme se acerca al animal (sentido caudo-rostral). Se subdividió a la región rostral en distal y proximal, pues el epitelio glandular tiene características diferentes en cada mitad de la región.

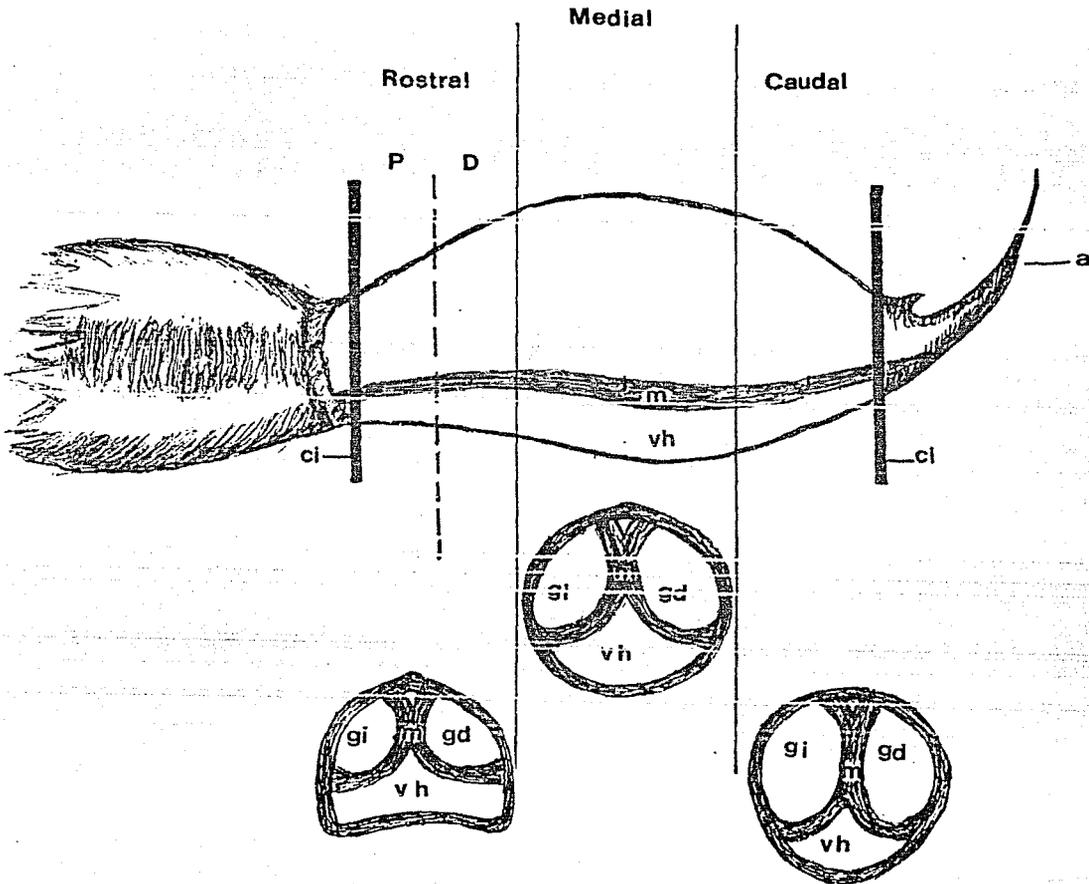
ZONAS. Las proyecciones de tejido conectivo arriba descritas son un parámetro morfológico excelente para la división topográfica de la glándula y para la localización de los distintos tipos celulares del parénquima glandular. Tomando como límites estas proyecciones de tejido conectivo y el tipo de tinción ácido-básica (con azul de toluidina y/o hematoxilina-eosina) que presentan las células, se dividió el parénquima en zonas bien delimitadas:

-ZONA I (ZI): La zona I está ubicada en el tercio inferior del parénquima glandular, es una región delgada limitada por la cutícula (cara externa), por la porción inferior de los fascículos musculares (fm) (cara interna) y por el borde inferior

FIGURA 7. Esquema que muestra la división topográfica empleada para la descripción histológica del epitelio de la glándula del veneno del alacrán *C. noxius* Hoffmann. Obsérvense las características anatómicas correspondientes para cada región glandular.

- a aguijón
- c.i corte inicial (realizado antes de la fijación del tejido)
- d distal
- g.d glándula derecha
- g.i glándula izquierda
- m músculo
- p proximal

FIGURA 7



de las vellosidades (asociación de las proyecciones del tejido conectivo con el epitelio glandular) que se originan desde las paredes interna y externa. La ZI está constituida de elementos celulares que tienen afinidad por colorantes básicos, es decir, se tiñen con hematoxilina y azul de toluidina. Dividiendo al testis por regiones se puede decir que la ZI en su inicio (región Caudal), es una banda estrecha de tejido glandular que aumenta paulatinamente de dimensiones conforme se acerca a la región medial para desaparecer después en la región rostral proximal del testis.

- ZONA II: Esta zona compone el tercio medio del parénquima glandular (pg), tiene los mismos límites externo e interno que la zona antes descrita pero a diferencia de ella, los límites superior e inferior están determinados por los bordes correspondientes (superior e inferior) de las vellosidades que separan las zonas I y III. La ZII está constituida de una población celular mixta aunque predomina aquella que tiene afinidad por los colorantes ácidos (Eosina). La ZII es la más amplia y se conserva así a lo largo de las regiones caudal y medial; la dimensión de esta zona aumenta en la región rostral proximal cuando desaparece el área ocupada por la zona I, cuando esto sucede la ZII ha ocupado la totalidad de la mitad inferior del pg.

- ZONA III (ZIII): Esta zona ocupa el tercio superior (o dorsal) del pg., posee una forma triangular con base inferior formada por el borde superior de las vellosidades que sirven de límite entre esta zona y la ZII; y dos caras, una externa

constituida por cutícula y otra interna formada por músculo. La población celular que compone a esta zona posee afinidad por los colorantes básicos (azul de toluidina y hematoxilina). En cuanto a su distribución a lo largo del telson se puede decir, que la ZIII se conserva en prácticamente la misma proporción en las tres regiones.

POBLACION CELULAR. Tomando en cuenta las estructuras intracitoplasmáticas celulares y las características tintoriales hemos dividido a la población celular del epitelio glandular productor de veneno de C.n.H, en los siguientes tipos celulares (Ver cuadro I y fig. 8):

- Células del tipo I (CtI): Células de forma cilíndrica con núcleo pequeño, de cromatina condensada y situado en la región parabasal; en general su citoplasma posee afinidad por los colorantes básicos lo que hace suponer la riqueza de estas células en grupos ácidos; no contienen alguna estructura citoplásmica característica, esto es, la apariencia de su citoplasma es homogéneo. En su borde libre presentan microvellosidades que son más aparentes en el grupo de células que forman la población mixta de la ZII. CtI tiene la distribución más general de todos los tipos celulares que componen el epitelio glandular, se observan células de este grupo en todas las zonas descritas, independientemente del nivel del corte.

Las características tintoriales, como se mencionó con anterioridad, dependen de la afinidad del grupo celular por colorantes básicos, sin embargo, para CtI la intensidad de

FIGURA B. Esquema y microfotografías que ilustran los tres tipos celulares descritos para las glándulas del veneno del alacrán *C. noxius* Hoffmann.

a. Esquema que representa los tipos celulares:

I. Tipo celular I: células cuyo citoplasma posee una apariencia homogénea.

II. Tipo celular II: células cuyo citoplasma contiene gránulos finos

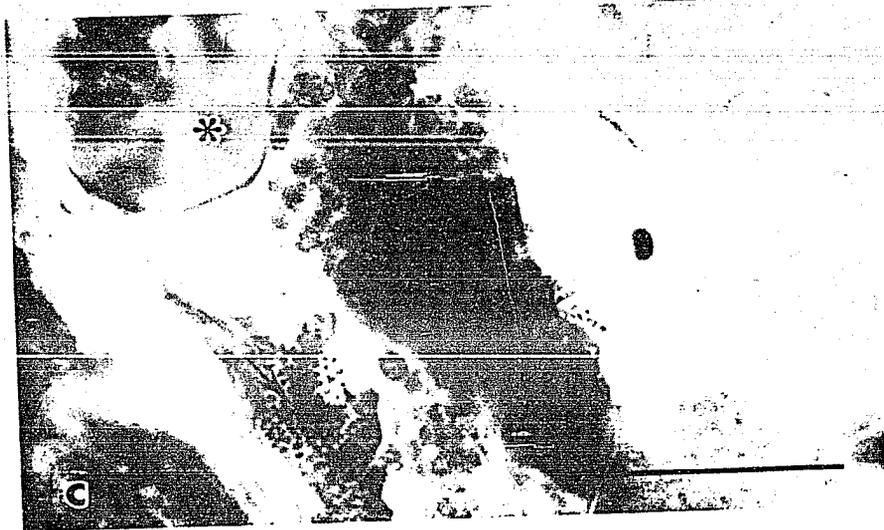
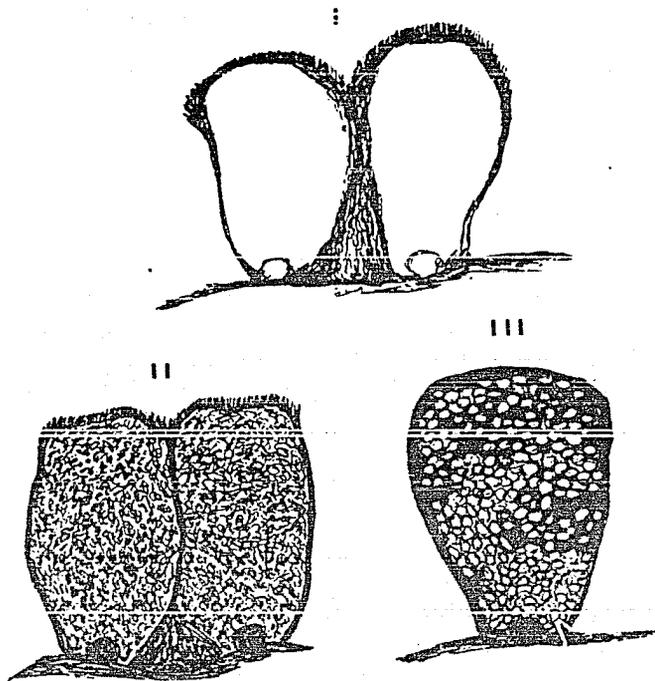
III. Tipo celular III: células en cuyo citoplasma se observan gránulos de mayor tamaño con respecto a los del tipo anterior (gránulo grueso).

b. Microfotografía que ilustra dos células del tipo I (*), enmarcando a una célula del tipo II (flecha). Se observa también, la base de una célula del tipo III (+) unida a la proyección de tejido conectivo (t.c.). (800X)

c. Microfotografía que muestra una célula de gránulo grueso o del tipo III (+) que limita, en la parte superior, con una célula del tipo I (*) y una célula del tipo II (flecha). (800X).

(Barras = 50µm)

FIGURA 8



coloración varía desde el violeta hasta el azul, dependiendo de la zona; en la ZII, CtI adquiere una tinción violeta particularmente intensa (H-E), esta característica podría reflejar una composición mixta en cuanto a la naturaleza ácido-base de los componentes intracitoplásmicos o quizás, se trate de estados funcionales diferentes de un mismo grupo celular o, una tercera posibilidad, es que fuesen una nueva población celular con características tintoriales particulares. En las zonas I y III, CtI adquiere una tinción por colorantes básicos moderada, las células se tiñen de azul. Para la tinción con azul de toluidina, las CtI se tiñen de azul en las zonas I y III, y de azul tenue en la zona II.

- Células de tipo II (CtII): Células de forma cilíndrica, su núcleo es oval con silueta regular y cromatina condensada, está situado en posición parabasal; su citoplasma tiene afinidad por colorantes ácidos (Eosina) y en él se observa un contenido granular fino que podría corresponder a vesículas de secreción, esta es la característica morfológica sobresaliente del grupo celular. La cantidad de gránulos varía de célula a célula pero en la generalidad se presentan en número suficiente como para ocupar aproximadamente el 75% del citoplasma. El borde libre presenta microvellosidades que son visibles en aquellas células que forman parte de los racimos de las vellosidades.

CtII es un tipo celular que tiene a la mayor parte de sus representantes en la zona II. Existen algunas células de este grupo que se entremezclan con otros tipos celulares en ZIII (8% de las células), estas en particular,

se tiñen de azul con hematoxilina, aunque con azul de toluidina no se tiñen, lo que hace pensar en la posibilidad de la existencia de un nuevo tipo celular o quizá, en un estado funcional diferente.

- Células tipo III (CtIII): células de forma cilíndrica que poseen un núcleo pequeño de cromatina condensada situado en la porción basal del citoplasma, este último, presenta como característica distintiva una gran cantidad de gránulos cuyo diámetro es mucho mayor que los gránulos de CtII y que ocupan casi la totalidad del citoplasma. El citoplasma tiene poca afinidad por los colorantes básicos (tinción débil con hematoxilina y con azul de toluidina).

CtIII es un tipo celular que tiene una distribución bien establecida: se les puede observar formando parte de los grupos celulares de las zonas I y III principalmente aunque pueden existir en la zona II en número escaso; en la región rostral su número aumenta constituyendo parte del epitelio glandular de la zona III.

En el cuadro I se sumarizan las características de los tipos celulares descritos en los párrafos anteriores.

En las figuras 9, 10 y 11 pueden apreciarse las características de cada una de las regiones y la forma en que se tiñe cada zona.

Las gráficas de la I a la IV representan el número promedio de células tipo I, II y III para cada zona, para las distintas regiones; se puede observar como se comportan cada una

de las poblaciones celulares en cada zona. Así podemos observar que en la:

- Zona I: los tipos celulares predominantes son CtI y CtIII en la región caudal (47% y 41% respectivamente). en la región Medial los tipos celulares son CtI (43%) y CtIII (39%) y en la región rostral distal CtI (39%) y CtIII (39%).

- Zona II: tenemos que CtII es el tipo celular que se encuentra en mayor cantidad (55% en promedio de las tres regiones), seguido de CtI (con un 40% en promedio de las tres regiones).

- Zona III: CtI es el tipo celular predominante en las regiones caudal y medial (56%, en promedio de las dos regiones), y comparte espacio con CtIII en la región rostral (50% para CtI y 46% para CtIII). (Ver cuadro I).

CUADRO I. Características de los tipos celulares que constituyen el epitelio productor del veneno del alacrán Centruroides noxius Hoffmann.

Tipo celular	Característica morfológica distintiva	Porcentaje promedio de representantes en cada zona	A T	H-E	IP
CTI	Citoplasma homogéneo	ZI: 43%	Azul intenso	Azul intenso (H)	/ -
		ZII: 40%	Azul muy claro	Violeta (H)	/ -
		ZIII: 53%	Azul intenso	Azul intenso (H)	/ -
CTII	Citoplasma con gránulos finos	ZI: 17%	Sin tinción	Rojo (E)*	/ -
		ZII: 55%	Sin tinción	Rojo (E)**	/ +
		ZIII: 8%	Sin tinción	Azul (H)	/ -
CTIII	Citoplasma con gránulos de diámetro mayor al precedente	ZI: 40%	Azul claro	Azul intenso (H)	/ -
		ZII: 5%	Azul claro	Azul intenso (H)	/ -
		ZIII: 39%	Azul claro	Azul intenso (H)	/ -

* Sólo en los límites entre ZI y ZII.

** Es excepcional este tipo celular en la zona III.

AT Azul de Toluidina.

H-E Hematoxilina-Eosina

IP Immunoperoxidasa.

- Tinción negativa.

+ Tinción positiva-

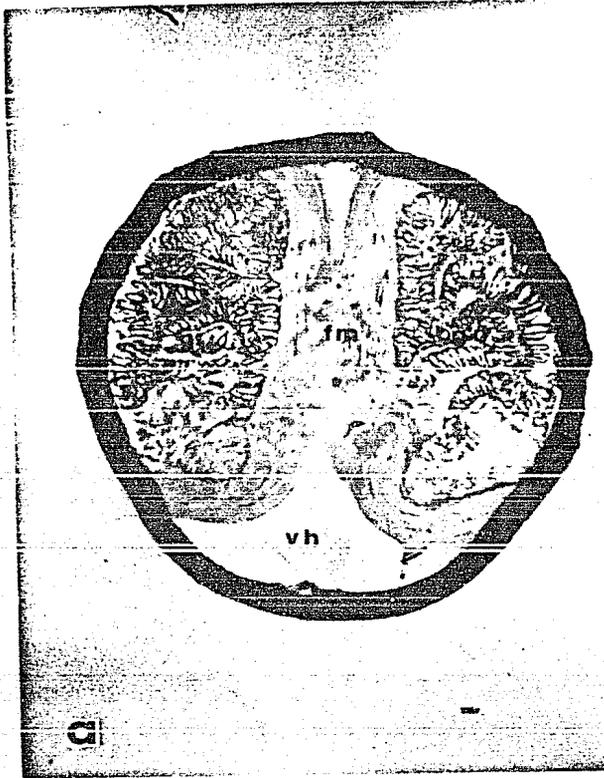
FIGURA 9. Fotomicrografías que ilustran las características anatómicas e histológicas correspondientes a la región topográfica caudal.

a. Fotomicrografía que muestra un corte transversal correspondiente a la región caudal de la glándula (25.6X). Tinción con azul de toluidina.

b. Fotomicrografía de un corte transversal de la región caudal de la glándula del veneno. Nótese la distribución por zonas correspondiente a esta región (80X). Tinción con hematoxilina-eosina.

(Barra=50um).

FIGURA 9



GRAFICAS I

Diagramas que representan el número promedio de células por tipos celulares para cada zona del epitelio glandular correspondiente a la región caudal. Los datos se obtuvieron promediando las regiones caudales de glándulas izquierda y derecha.

A. Histograma que muestra el número promedio de células de cada tipo celular para cada zona del epitelio glandular en la región caudal en donde se pueden observar:

Zona I Células tipo I y III en igual proporción

Zona II Células de tipo II (gránulo fino) y de tipo I

Zona III Células del tipo I y del III

Nótese además, que la zona I es en la que se alberga un número menor de células seguida de la zona III

B. Gráfica que ilustra el comportamiento de cada tipo celular para las diferentes zonas del epitelio glandular de la región caudal. Se observa que:

- Las células de tipo I o de citoplasma homogéneo aumentan en número desde la zona I, hacia la zona III.

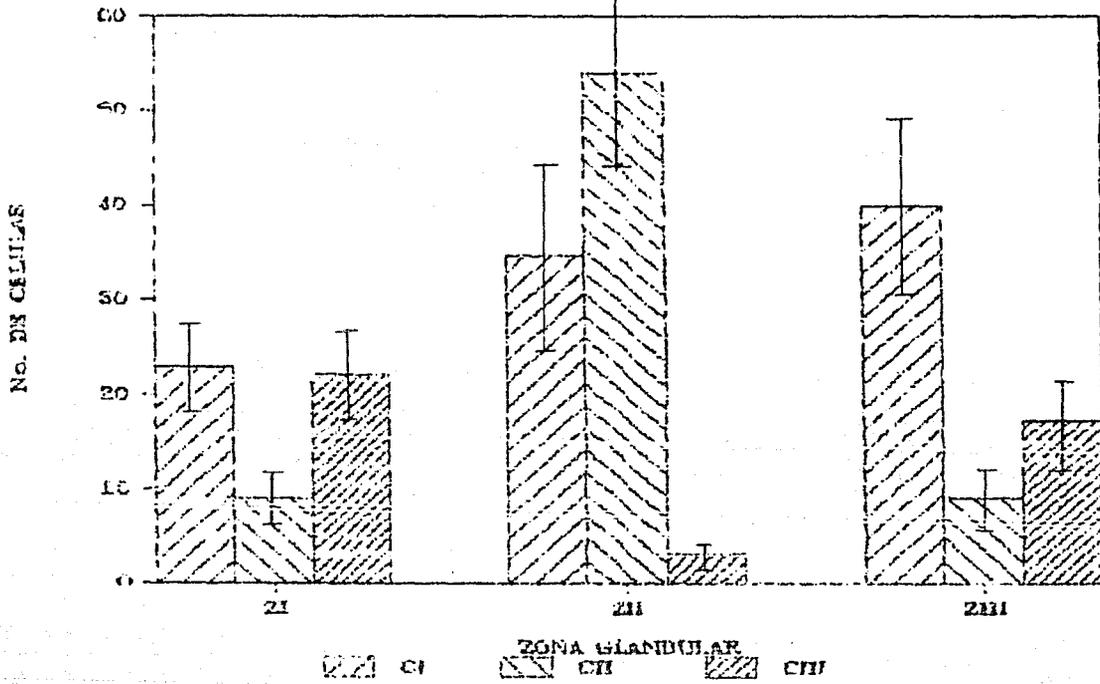
- Las células de tipo II o de gránulo fino predominan en la zona II mientras que se observan en menor número en las zonas restantes.

- Las células de tipo III o de gránulo grueso, predominan en la zona I mientras que su número se reduce en la zona II aumentando de nuevo en la zona III. Esta es la población celular con menor número de representantes en el epitelio glandular.

Prueba estadística de Kruskal-Wallis $p < 0.00001$

GRAFICA I

REGION CAUDAL



REGION CAUDAL

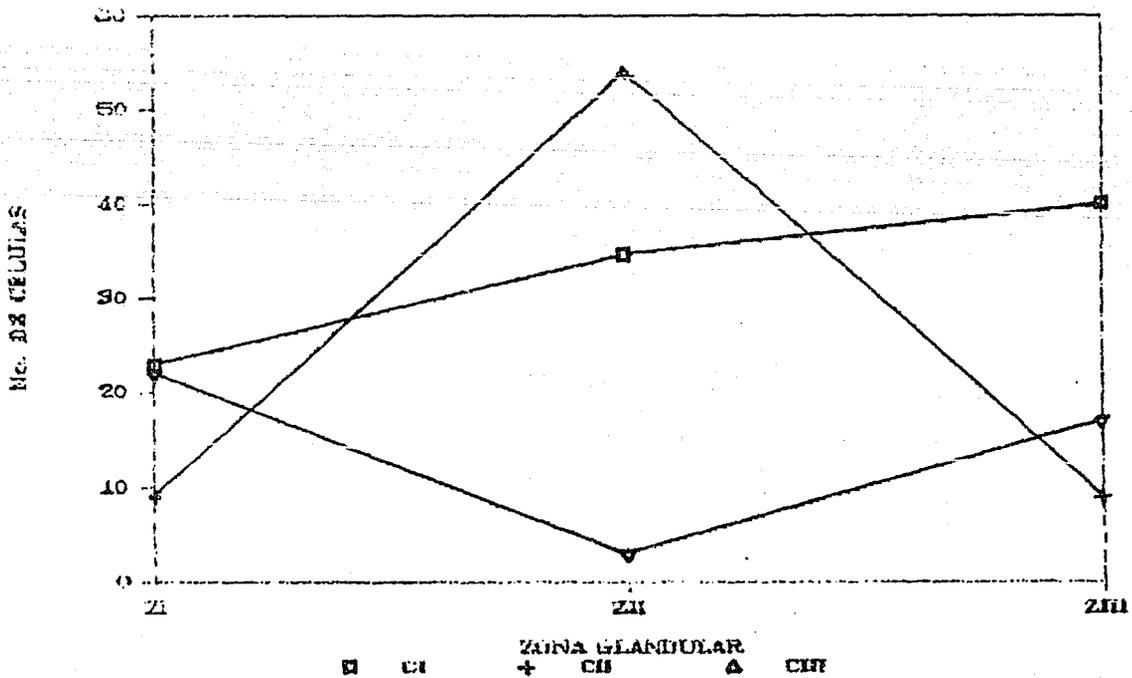


FIGURA 10. Fotomicrografías que ilustran las características anatómicas e histológicas correspondientes a la región medial).

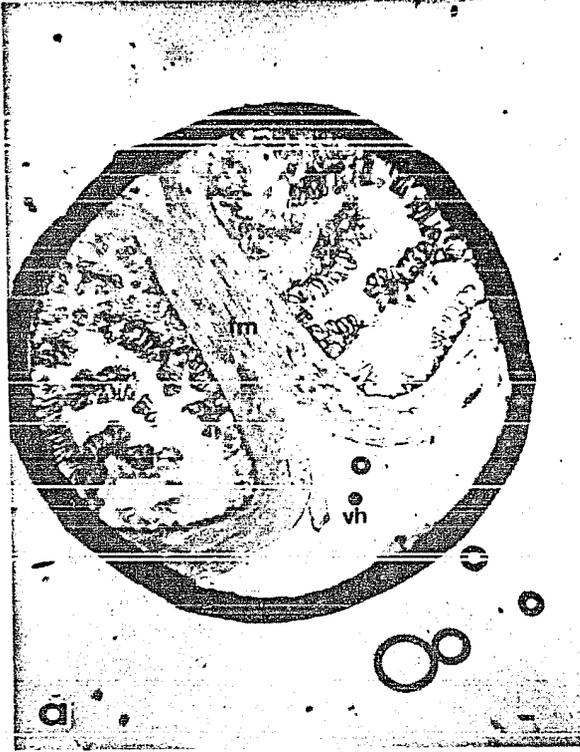
a. Fotomicrografía que muestra un corte transversal correspondiente a la región medial de la glándula del veneno. Nótese la forma circular de la misma (25.6X). Tinción Azul de Ioiuidina.

b. Fotomicrografía de un corte transversal de la región medial de la glándula. Nótese la distribución por zonas correspondientes a esta región. (80X). Tinción H-E .

ZI zona I
ZII zona II
ZIII zona III

(Barra=50um)

FIGURA 10



GRAFICAS II

Diagramas que representan el número promedio de células por tipo celular para cada zona del epitelio glandular correspondientes a la región medial. Los datos se obtuvieron promediando las regiones mediales de las glándulas derecha e izquierda.

A. Histogramas que muestran el número promedio de células de cada tipo para cada zona de la región medial; se observan los tipos celulares predominantes para cada zona:

- Zona I Tipos celulares I y III casi en igual proporción
- Zona II Tipo celular II o de gránulo fino, seguido del tipo I (citoplasma homogéneo)
- Zona III Tipo celular I, seguido del tipo III.

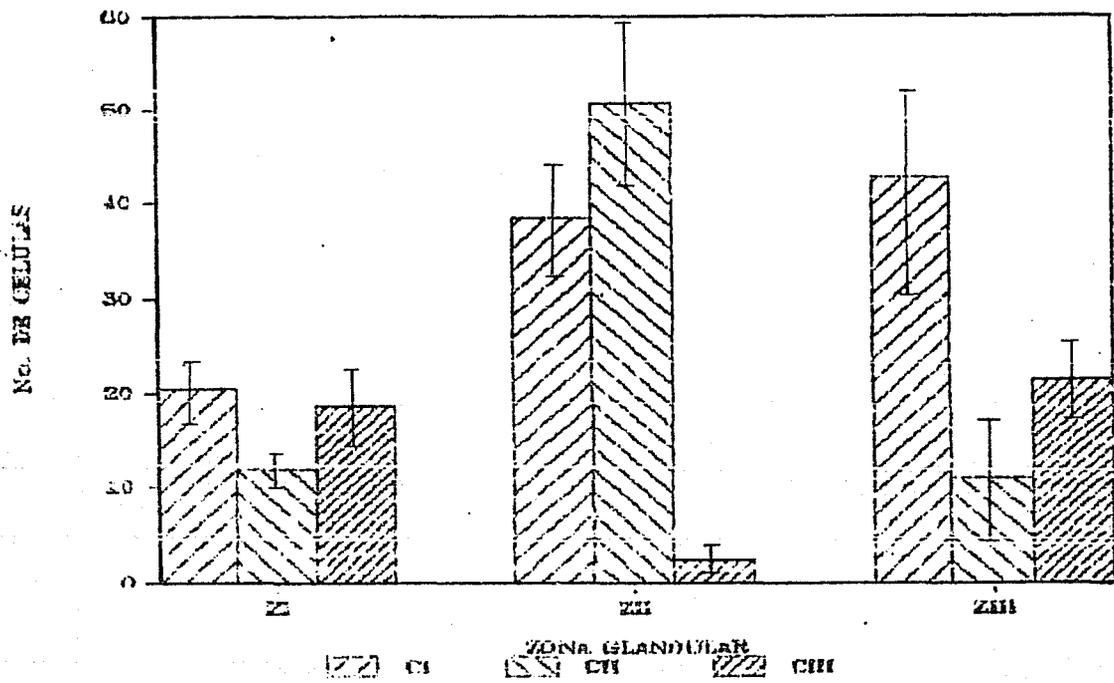
Notese que la zona I es la que conserva un menor número de células.

B. Gráfica que ilustra el comportamiento de cada población celular para las diferentes zonas de la glándula.

- El tipo celular I aumenta en número desde la zona I hacia la zona II
- Para el tipo celular II el número máximo de representantes se encuentra en la zona II y se conserva su número en las zonas II y III.
- El tipo tres es el grupo celular con el menor número de representantes en las tres zonas; para las zonas I y III conservan números promedios casi equivalentes mientras que la misma población para la zona II tiende a desaparecer.

Prueba estadística de Kruskal-Wallis $p < 0.00001$

GRAFICA II
REGION MEDIAL



REGION MEDIAL

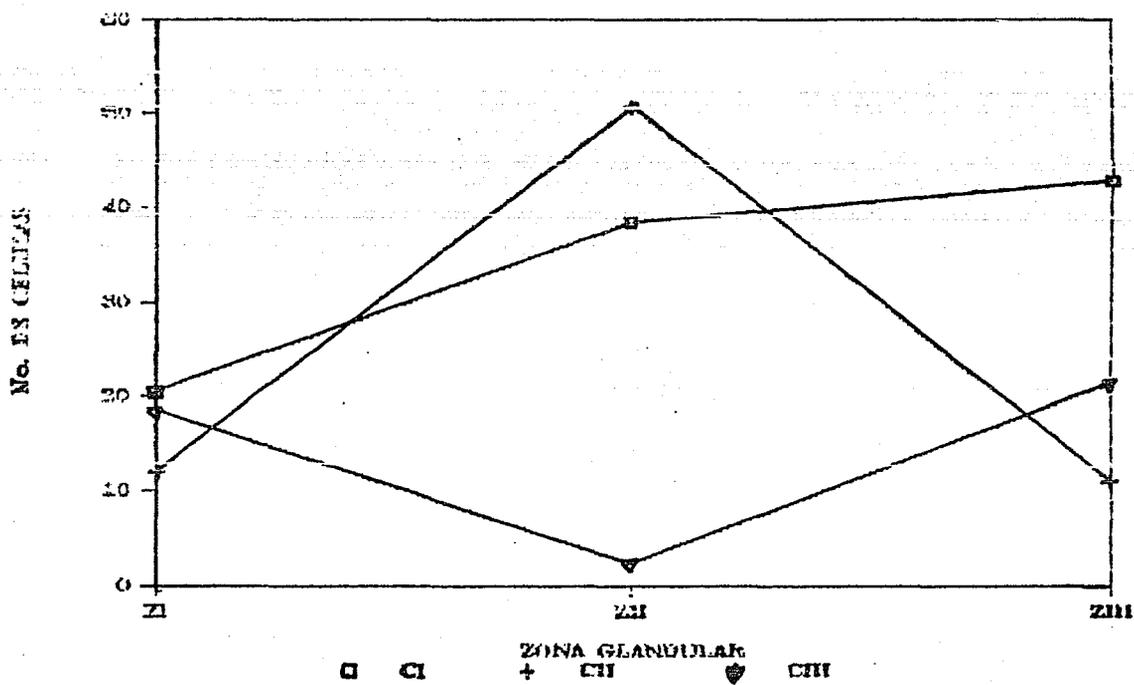


FIGURA 11. Fotomicrografías que ilustran las características anatómicas e histológicas correspondientes a la región rostral de la glándula del veneno

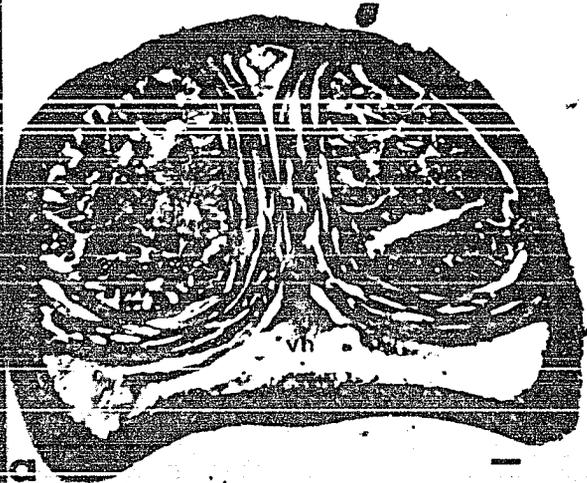
a. Fotomicrografía que muestra un corte transversal de la región rostral de la glándula del veneno. Obsérvese la forma del corte: circular en la porción superior y cóncava en la porción inferior. (25.6X). tinción con Azul de toluidina.

b. Fotomicrografía de un corte transversal de la región rostral distal de la glándula. Nótese que la zona I (ZI) se estrecha y las zonas II (ZII) y III se amplían. (80X). tinción H-E.

c. Fotomicrografía de un corte transversal de la región rostral proximal de la glándula. Obsérvese la desaparición de la zona I y la distribución de las zonas II (ZII) y III (ZIII). (80X). tinción H-E

(Barra: 50µm)

FIGURA 11



GRAFICAS III

Diagramas que representan el número promedio de células por tipo celular para cada zona del epitelio glandular correspondiente a la región rostral. Los datos se obtuvieron promediando las regiones rostral distal y rostral proximal de las glándulas derecha e izquierda. Es importante hacer notar que la zona I desaparece en la región rostral proximal por lo que los datos que aparecen en esta zona son los existentes en la región rostral distal.

A. Histograma que muestra el número promedio de células de cada tipo para cada región rostral; se observan los tipos celulares para cada zona:

- zona I Células tipo I y tipo III en igual proporción.
- zona II Células del tipo II y del I
- zona III Células tipo I

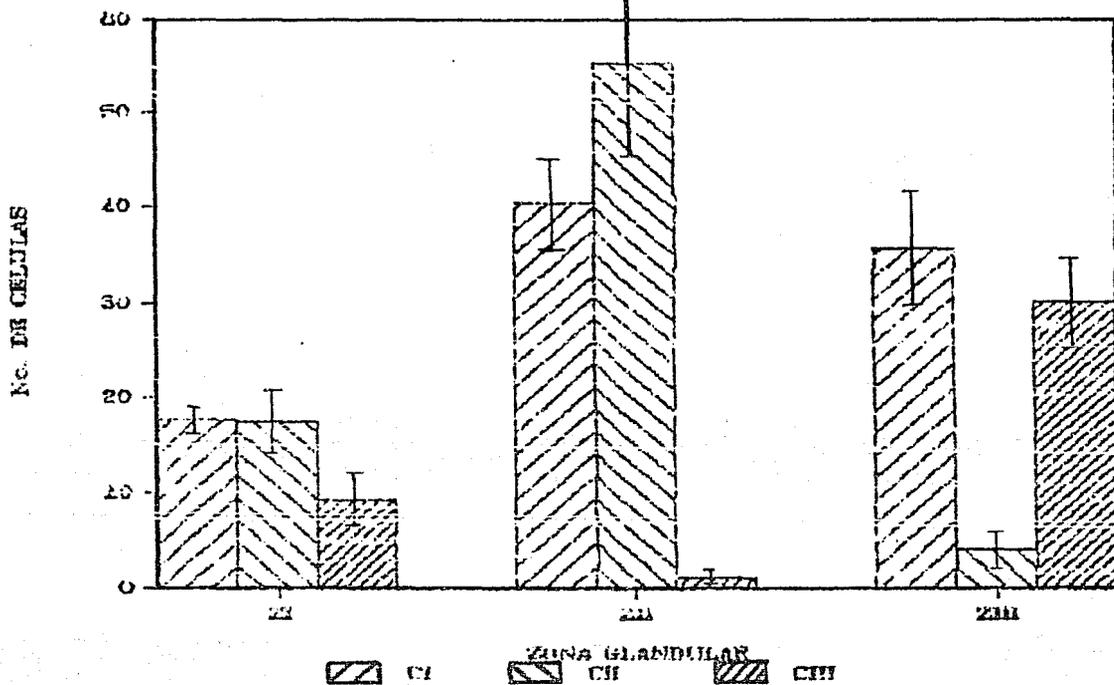
B. Gráfica que ilustra el comportamiento de las tres poblaciones celulares en las diferentes zonas de la glándula.

- Las células tipo I o de citoplasma homogéneo aumentan su número en la zona II y III con respecto a la zona I
- Las células tipo II siguen el mismo patrón de las regiones anteriores.
- Las células de tipo III aumentan su número en la zona III y disminuyen sus representantes en la zona I y II con respecto a los otros tipos celulares.

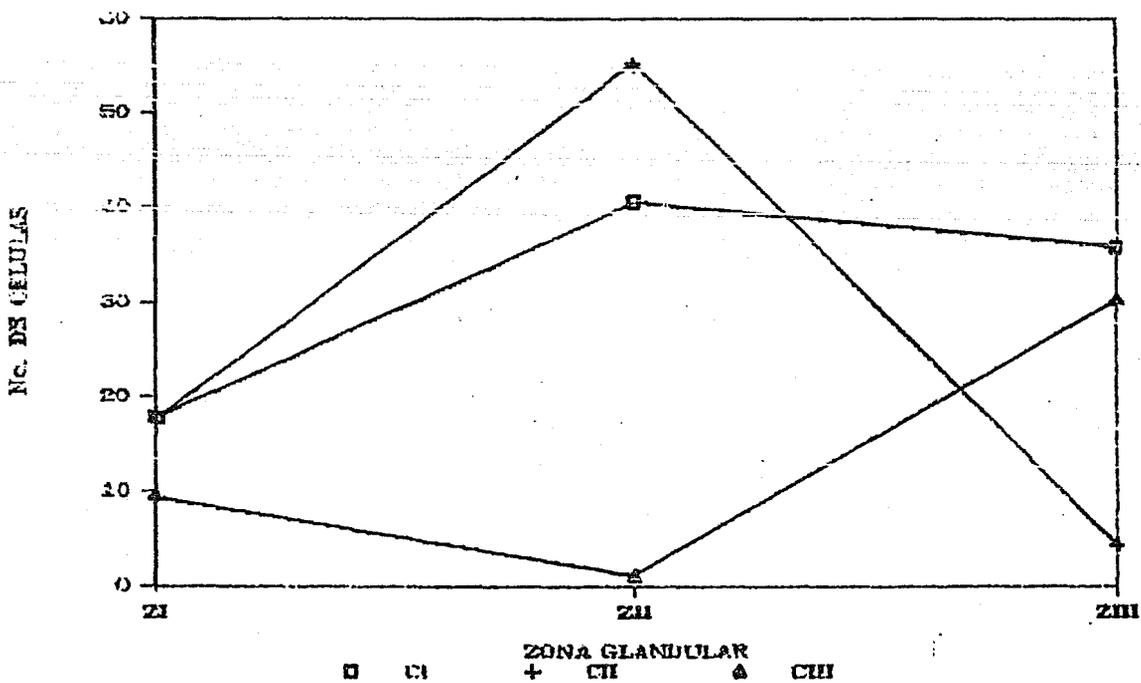
Prueba estadística de Kruskal-Wallis $p < 0.00001$

GRAFICA III

REGION ROSTRAL



REGION ROSTRAL



GRAFICAS IV

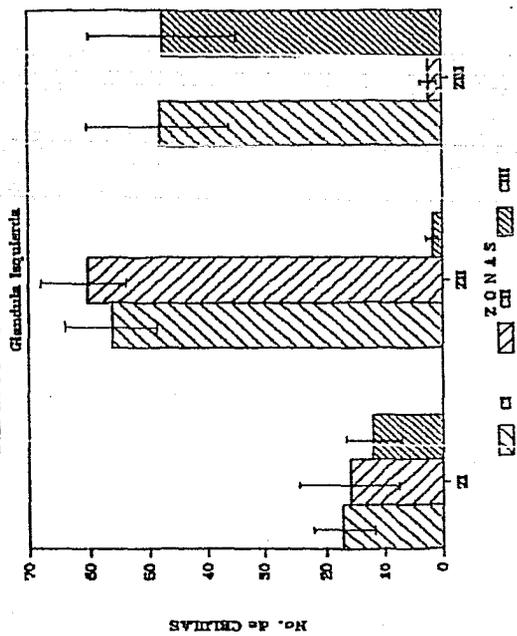
Histogramas que representan el número promedio de células de cada tipo para cada zona en las regiones rostral distal y rostral proximal del epitelio glandular derecho e izquierdo.

A y B Histogramas para la región rostral distal de las glándulas derecha e izquierda. Nótese que los tipos celulares predominantes para cada zona conservan el comportamiento de regiones anteriores; sin embargo, el número de representantes del tipo celular III aumenta en la zona III.

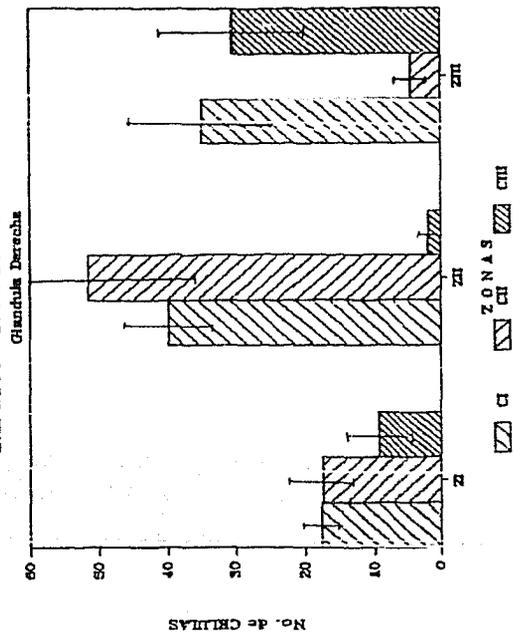
C y D Histogramas para la región rostral proximal de las glándulas derecha e izquierda. Obsérvese la ausencia de la zona I; la desaparición casi total de células de tipo III y el aumento del mismo grupo celular en la zona III.

Prueba estadística de Kruskal-Wallis $p < 0.00004$

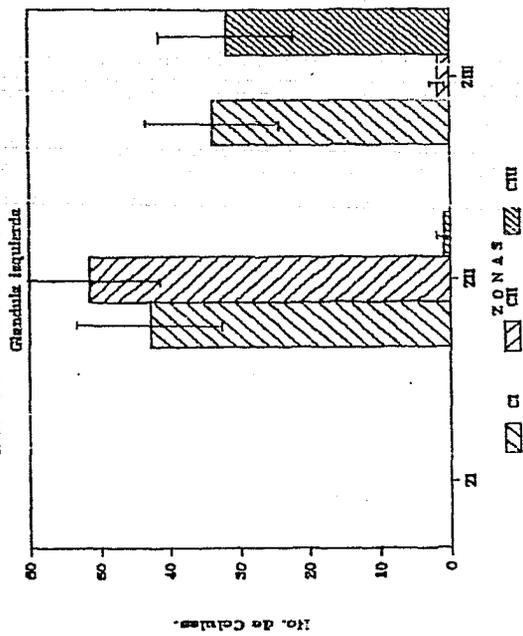
REGION ROSTRAL DISTAL



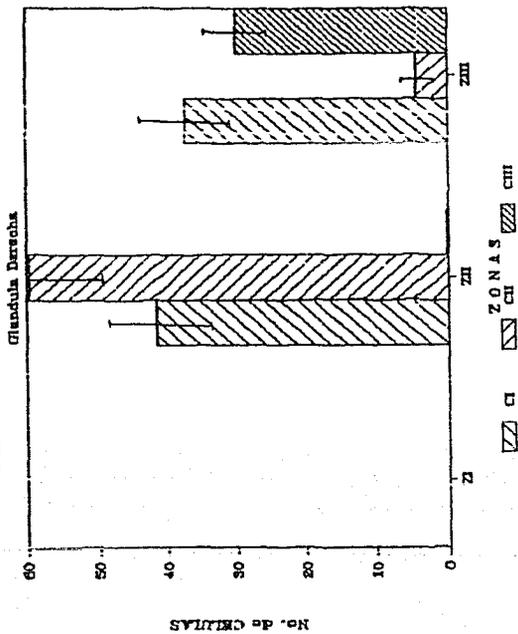
REGION ROSTRAL DISTAL



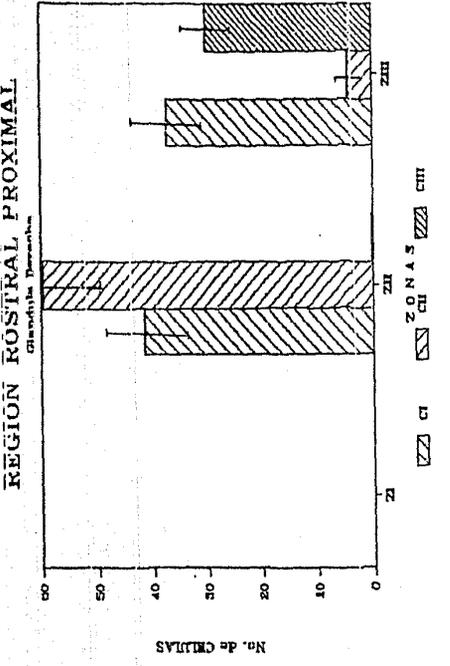
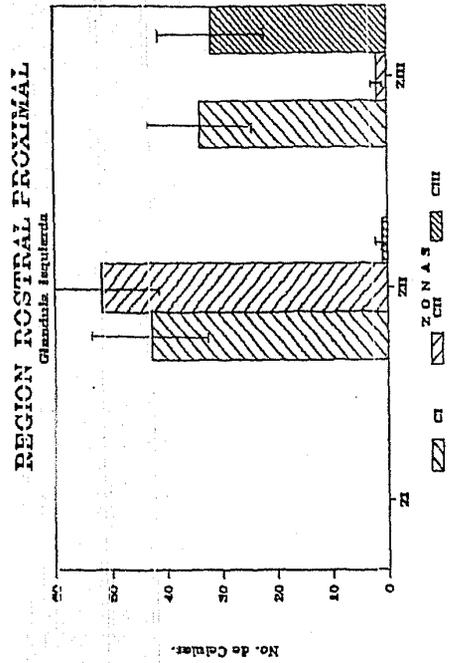
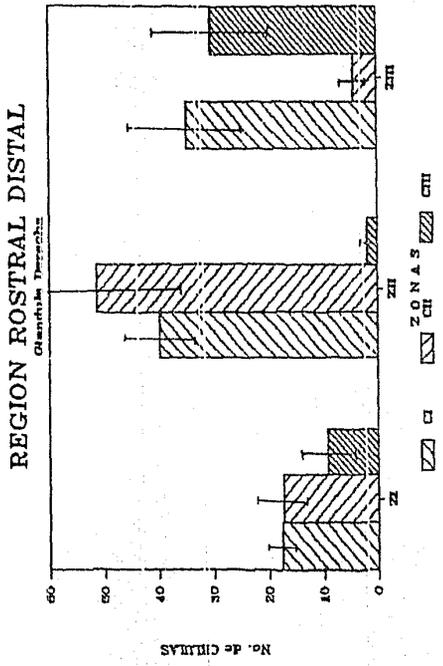
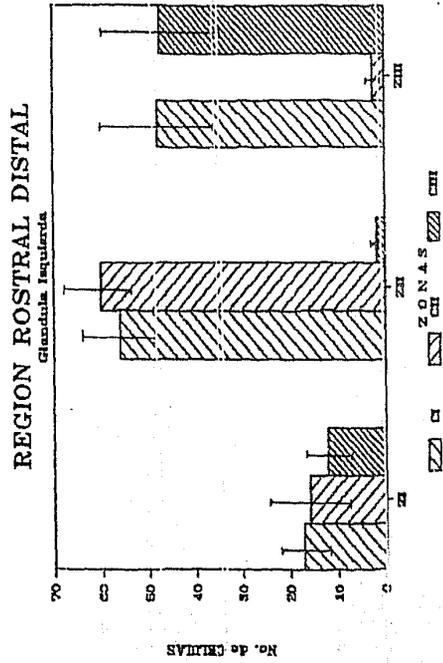
REGION ROSTRAL PROXIMAL



REGION ROSTRAL PROXIMAL



GRAFICA IV



- TOPOGRAFIA CELULAR. Un vez establecidos los límites de las zonas y los tipos celulares que se localizan en ellas describiremos la localización exacta de cada uno de los grupos celulares que constituyen el pg.. Para esto nos auxiliaremos de esquemas que ejemplifican la regiones del telson (Fig. 12).

En la figura 12a., corte que corresponde a la región caudal de la glándula, se muestra que la ZI posee tres tipos celulares que se distribuyen en su superficie de la siguiente manera: en su cara interna se encuentran las CtIII principalmente; en la cara externa existen células del tipo I y II intercaladas; en el borde inferior de la vellosidad que se extiende desde la pared externa hay células del tipo II intercaladas con aquellas del tipo I. Esta distribución se conserva con ligeras variaciones hasta que desaparece la zona I en la región Rostral proximal.

En la misma figura 12, se puede observar que la zona II está compuesta de una población mixta de células, predominan las CtII; aunque no pareciera existir una topografía celular estricta, hay una tendencia de las CtI a localizarse en las vellosidades que nacen de la cara interna y a lo largo de la misma, mientras que las CtII se ubican en las superficies de las caras interna y externa; las CtIII no tiene un sitio específico de localización.

La zona III está constituida por una población celular formada principalmente por dos tipos: las CtI que se localizan en la cara externa e intercaladas con las CtIII en la

cara interna, así como en el borde superior de las vellosidades; el otro grupo celular importante es el Ct11J que se localiza, casi exclusivamente en la cara interna de las glándulas, hasta el inicio de la región rostral, en donde se extiende para abarcar la parte superior de la vellosidad interna (fig. 12).

FIGURA 12. Esquemas que ilustran la distribución topográfica de los tipos celulares en las distintas regiones de la glándula del veneno.

a. Esquema que muestra la distribución topográfica de los tres tipos celulares para la región caudal.

b. Esquema que representa la distribución topográfica de los tipos celulares para la región medial.

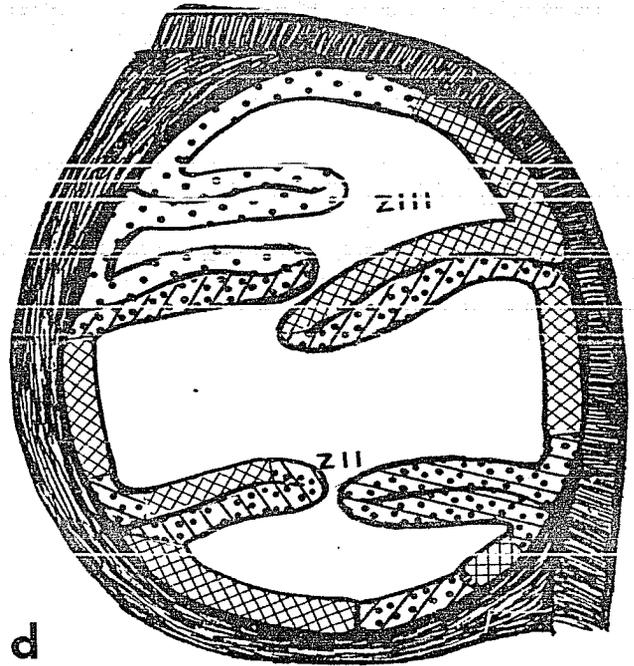
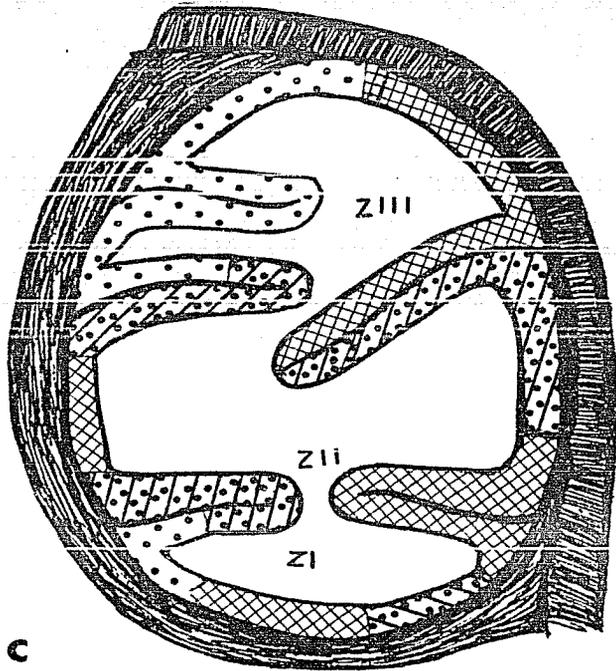
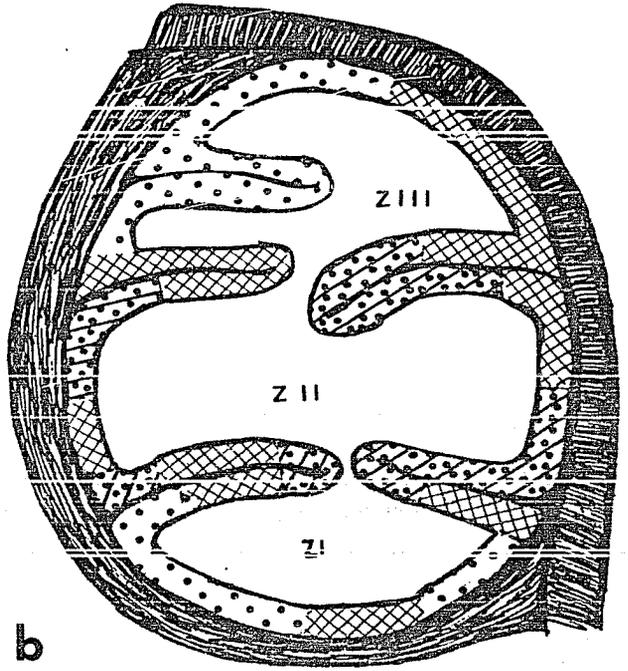
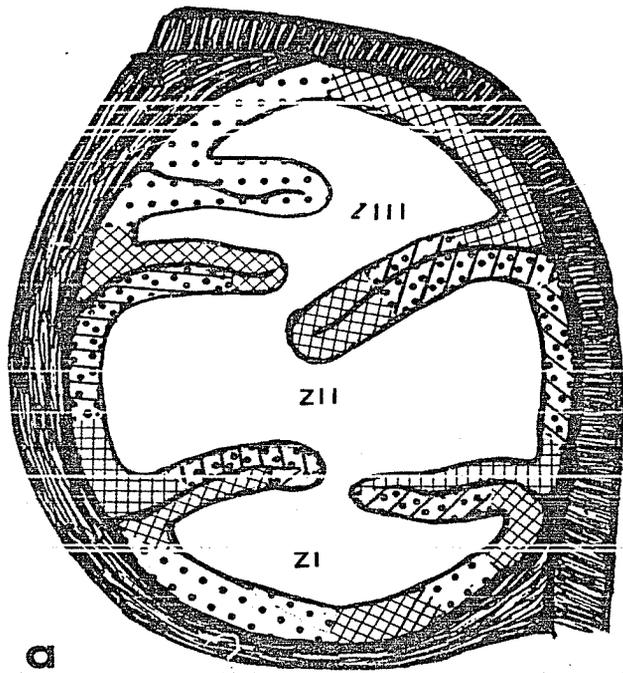
c. Esquema que muestra la distribución topográfica de los tres tipos celulares de la región rostral proximal

Células tipo I o de citoplasma homogéneo

Células tipo II o de gránulo fino

Células tipo III o de gránulo grueso.

FIGURA 12



- Estructuras anexas a las Glándulas de Veneno

VASO HEMOLINFÁTICO. como se puede observar en las figura 14, existe un espacio de grandes dimensiones limitado por la cutícula y por los fascículos musculares (fm) (fig.15); el espacio posee una luz amplia en forma triangular con base inferior y vértice superior que se extiende hasta alcanzar la porción de la cutícula que se opone a su base; está revestido de un epitelio plano simple muy lábil (de difícil preservación), que descansa en una fina membrana basal por medio de la cual se relaciona con el epitelio cúbico propio de la cutícula; en su interior se encuentran células cuyas características morfológicas son semejantes a las de las células hemáticas de mamíferos (fig. 14b); basados en las observaciones anteriores se puede pensar que el espacio descrito es en realidad, un gran vaso hemolinfático que brinda nutrición al tejido glandular.

Las células que se observan en el interior del vaso son del tipo mononuclear, su núcleo es excéntrico, de cromatina condensada y de silueta regular en las células pequeñas pero irregular en las de mayor tamaño; el citoplasma es acidófilo o basófilo y escaso en las células pequeñas, y generalmente basófilo en las células más grandes.

Además de las células observadas en el lumen del vaso, se observan concreciones granulares finas que podrían corresponder a proteínas precipitadas de origen hemolinfático, aunque algunos autores (Sámano et al., 1964), piensan que podría ser veneno (fig. 14b); así mismo se puede observar una estructura compuesta de tejido conectivo que sostiene dos pequeños conductos

revestidos por epitelio plano simple, esta estructura está adherida por fibras de tejido conectivo al epitelio de la cutícula en la zona central de la base del vaso hemolinfático; es una estructura delicada que se preserva con dificultad, razón por la cual es difícil de observar en todas las preparaciones (fig. 14c).

En la mayoría de los cortes se puede observar un pequeño espacio de forma triangular y vértice inferior dirigido hacia el vaso hemolinfático, ubicado en en la parte superior del telson; este pequeño espacio es virtual, pues depende de la extensión superior del conducto hemolinfático y del estado de contracción de los fm. periglandulares; así, si los músculos se contraen, como no existe unión real de los fm. (ver fig. 5), el espacio desaparece; en caso contrario, si hay relajamiento muscular, la relación íntima de los bordes mediales de los fm. crea por superposición de imagen, un falso conducto. Esta aseveración se ve corroborada por la presencia de células "hemolinfáticas" en el pequeño espacio, y la existencia de una comunicación amplia entre los dos espacios descritos observada en algunas preparaciones, faltaría verificar si la presencia de dicha comunicación se relaciona con el grado de contracción muscular mediante el estudio del patrón de bandas de las estrias en microscopía electrónica.

MUSCULO PERIGLANDULAR: los fascículos musculares (fig. 15) están compuestos de células alargadas en forma de huso que poseen un núcleo de cromatina condensada y central; en el citoplasma se pueden distinguir las bandas características del

músculo estriado (azul de toluidina).

Los fm. que envuelven a las unidades glandulares se disponen en dos direcciones con respecto al eje longitudinal de la glándula, los haces longitudinales ocupan una porción del tercio medio y superior de la masa muscular y se encuentran intercalados entre los haces circulares. Predominan los haces musculares circulares.

Como se había mencionado con anterioridad, los fm. correspondientes a cada glándula son estructuralmente independientes es decir, no existen puentes conectivos aparentes entre ambos que los unan a un tercer punto de apoyo fijo, este hecho facilita la contracción autónoma de cada cubierta muscular sobre el parénquima glandular con el que se relaciona, brindando al animal la capacidad potencial de la compresión alternante o sincrónica de las glándulas, posibilidad que debiera ser estudiada en detalle.

FIGURA 13. Fotomicrografías que ilustran la distribución de diferentes tipos celulares en una proyección de tejido conectivo; además, se pueden observar células mioepiteliales intercaladas entre las células del epitelio glandular.

a. Fotomicrografía que muestra la distribución de células de tipo I y de tipo II en la región apical de una proyección de tejido conectivo. (320X).

b. Fotomicrografía de la región apical de una proyección de tejido conectivo que limita las zonas II y III. Notese el cambio de tonalidad (tinción con Hematoxilina y Eosina) entre las zonas II (Eosina) y III (Hematoxilina). Al centro de la proyección se observa una pequeña área clara que corresponde a la matriz fibrosa de la misma. (320X).

c. Fotomicrografía que muestra un grupo celular del epitelio glandular; en él, se puede distinguir una célula mioepitelial (flecha) intercalada entre las células secretorias; las características morfológicas de las células mioepiteliales se pueden observar con claridad en la ilustración: Poseen un núcleo oval, central y de cromatina condensada; su citoplasma se extiende hacia sus extremos dando un aspecto alargado a la célula; se piensa que su función es ayudar a la expulsión del contenido de las células secretorias durante el proceso de secreción.

- I Célula tipo I.
- II Célula tipo II.
- c.m. Célula mioepitelial.
- c.p. Células de la proyección de tejido conectivo (probablemente fibroblastos).
- ZI zona I.
- ZII zona II.

(Barra = 50um).

FIGURA 13

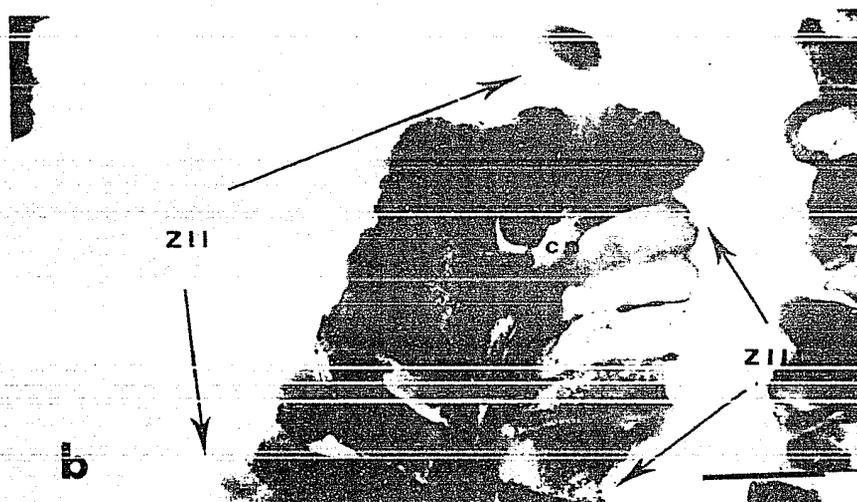
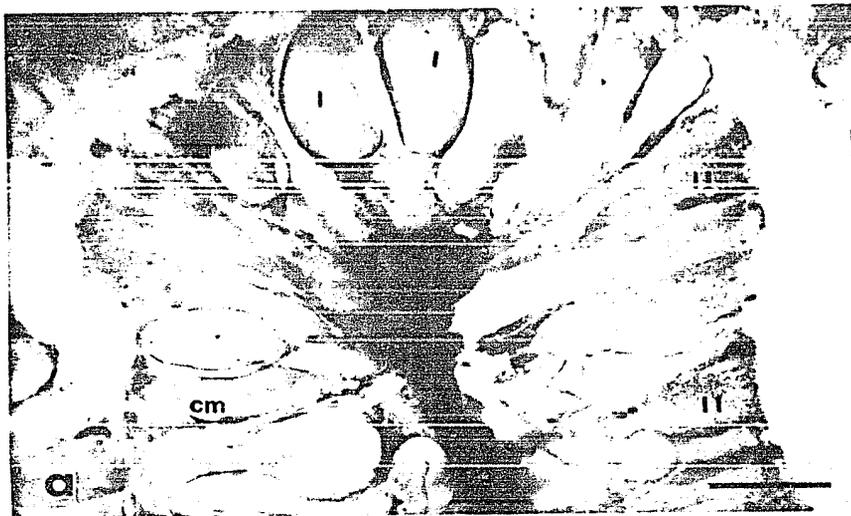


FIGURA. 14. Fotomicrografías que ilustran el vaso hemolinfático y los elementos propios del mismo.

a. Fotomicrografía que muestra el vaso hemolinfático (v.h.) en toda su extensión; en su interior se observa material precipitado que podría corresponder a proteínas. Nótese que en la parte superior de la estructura glandular, se observa un pequeño espacio formado por la superposición de las imágenes de los fascículos musculares (f.m.) por lo que, se trata de un espacio virtual (*). (80X).

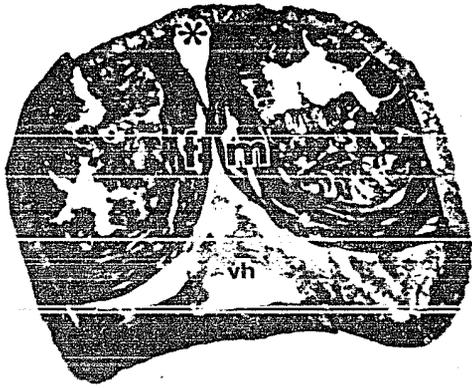
b. Fotomicrografía en la cual se puede observar un grupo de células hemolinfáticas (flechas) contenidas en el vaso linfático.

c. Fotomicrografía que muestra la estructura de tejido conectivo localizada en la parte inferior del vaso hemolinfático adherida a la cara interna de la cutícula; en su interior se advierten dos estructuras que semejan conductos cuya descripción morfológica se encuentra en el texto. (320X).

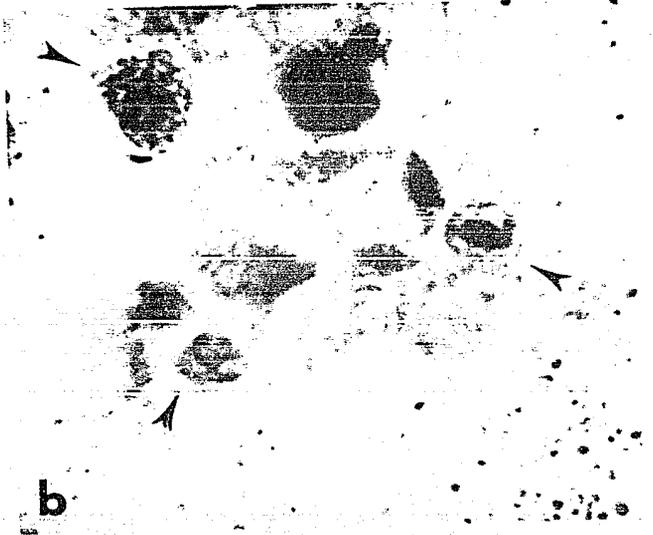
v.h. vaso hemolinfático.
f.m. fascículos musculares.
c. cutícula.

(Barra = 50 um).

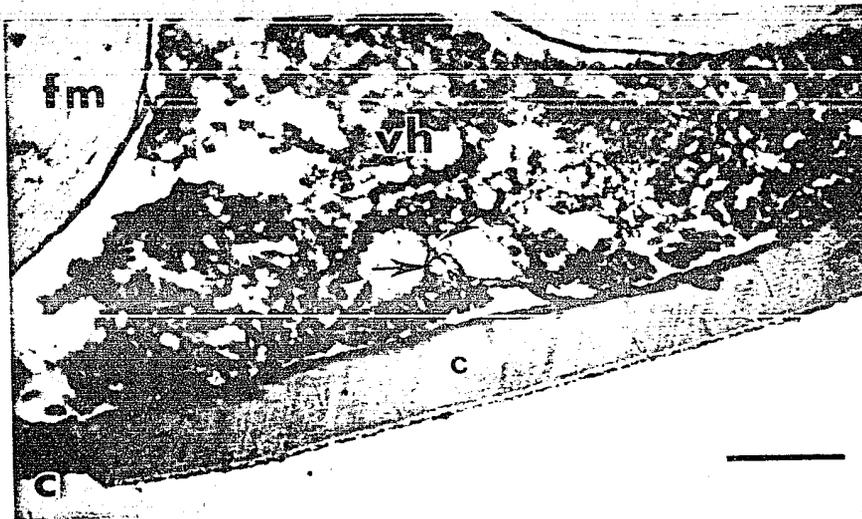
FIGURA 14



a



b



c

FIGURA. 15. Fotomicrografías que ilustran los fascículos musculares.

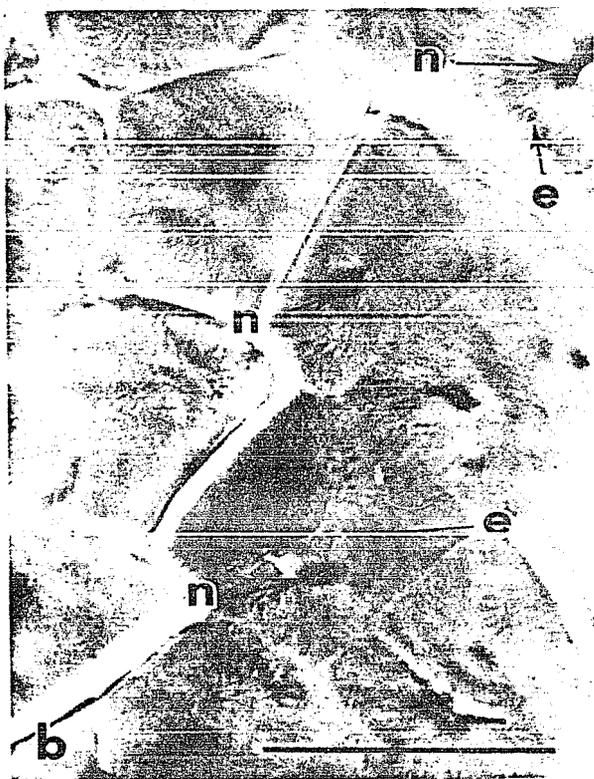
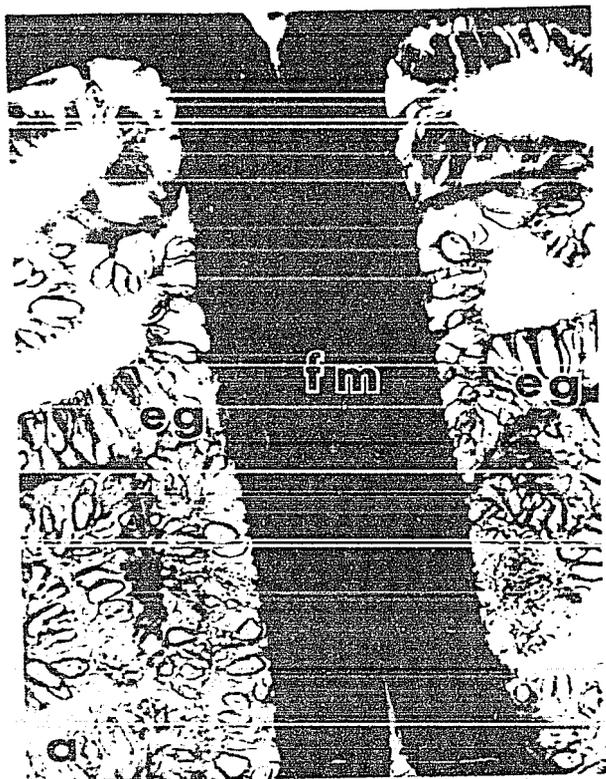
a. Fotomicrografía de un corte transversal de la glándula en la que se observan la zona de contacto entre los fascículos musculares (f.m.) que rodean al epitelio glandular. (80X).

b. Fotomicrografía de un corte transversal de los fascículos musculares en donde se demuestra la presencia de estriaciones y la posición central del núcleo (datos que corroboran la naturaleza estriada de los fascículos musculares). (800X).

n núcleo.
e estrias.

(Barra = 50 um).

FIGURA 15



III INMUNOCITOQUIMICA (localización de las toxinas en las glándulas del veneno de alacrán)

- Dilución de los anticuerpos

En la primera prueba de dilución de anticuerpos se utilizó un anticuerpo monoclonal contra la Noxiustoxina (1:500 y 1:5000, equivalentes a 2.2 ug/ml y 0.22 ug/ml de IgG respectivamente) y un segundo anticuerpo anti-IgG de ratón acoplado a peroxidasa (1:50, 1:100 y 1:250 equivalentes a 300 ug/ml, 150ug/ml y 60ug/ml). los resultados mostraron señales equivalentes para todas las diluciones del monoclonal; para el segundo anticuerpo la dilución 1:50 resultó en un fondo muy alto con respecto a la señal y la dilución 1:250 con fondo y señales muy bajos, por lo que se resolvió utilizar la dilución 1:100 como de rutina. En la figura 16 puede observarse el tipo de señal y el fondo que se obtuvieron.

- Tiempo de incubación del primer anticuerpo.

Los experimentos que se habían llevado a cabo hasta el momento, tenían como base las condiciones establecidas para el modelo de beta endorfina en hipófisis de rata, pero eran necesarios cambios en la incubación del primer anticuerpo, ya que el tejido de interés se maltrataba con tiempos de incubación tan largos (24hrs), por lo que se elaboró un ensayo con incubaciones de 3, 6, 12 y 24hrs en cámara húmeda a 4 C. Los datos obtenidos demostraron que tanto la intensidad como la ubicación de la señal permanecieron inalteradas para cualquier tiempo de incubación. Se estableció como rutina incubar al primer anticuerpo durante 3h.

- Controles

Los primeros controles utilizados (sustitución del primer anticuerpo por suero preinmune y/o por otro monoclonal (LHRH) dieron falsos positivos. Estos resultados se obtuvieron bajo condiciones de fijación con solución Karnowsky, por lo que se pensó en la posibilidad de una modificación de los componentes del tejido por la concentración alta de glutaraldehído en el fijador, por esta razón, se realizó un experimento control sometiendo al tejido a varias soluciones fijadoras (Tabla IV) desarrollando la técnica de ICD completa. Los resultados de estos ensayos mostraron señal positiva para todos los fijadores con o sin el primer anticuerpo; esto descartaba la posibilidad de modificación de antígenos del tejido por la técnica de fijación; también se observó una distribución específica de los grupos celulares teñidos positivamente para peroxidasa con un fondo realmente bajo (fig. 16). Estos datos indicaban una cierta especificidad de reacción en algunos grupos celulares por una de las sustancias utilizadas en la ICD.

Se iniciaron entonces una serie de ensayos de control para poder obtener la respuesta sobre el origen de este resultado "artificial" (ver tabla V).

1. Preadsorción con FII, LHRH, y BSA: como ya se indicó en materiales y métodos, se incubó el primer anticuerpo (2.2 ug/ml) con el bloqueador (FII 140 ug/ml equivalente a 4.2 ug/ml de II-II o Noxiustoxina, LHRH 18.2 ug/ml; BSA 600 ug/ml). No se observó ningún bloqueo de la señal por parte de las

proteínas utilizadas, a las concentraciones indicadas por lo que se aplicaron los siguientes controles.

2. Peroxidasa endógena: resultó negativa

3. Sustitución de primer anticuerpo: se sustituyó el primer anticuerpo por PBS-Tritón 0.3%, aplicando únicamente el segundo anticuerpo. Este ensayo dió la clave al problema técnico que se observaba: El segundo anticuerpo se une específicamente a un cierto grupo celular. Se pensó entonces que el segundo anticuerpo (Miles) que se estaba utilizando, causaba esta inespecificidad, por lo tanto, se iniciaron una serie de ensayos para descartar la posibilidad de reacción cruzada de este segundo anticuerpo; para ello, se iniciaron sustituciones por anticuerpos conejo-antirratón marcados con Rodamina, Fluoresceína y con los anticuerpos marcados con peroxidasa no comercial (donados por el Dr. H. Merchant, elaborado en el Instituto Pasteur) e inclusive un anticuerpo de cabra-anticonejo acoplado a peroxidasa. Estos anticuerpos resultaron tener el mismo comportamiento que el anticuerpo inicial; debe hacerse notar que existe fluorescencia endógena observada con filtros de excitación de Rodamina y de Fluoresceína y es difícil distinguir las señales de aquella fluorescencia proveniente del tejido, por lo que no queda tan claro el comportamiento con los anticuerpos conjugados a fluoróforos.

4. Bloqueo de la señal inespecífica: conociendo que el problema de la señal inespecífica era causada por la unión de anticuerpos marcados a un grupo celular, se iniciaron una serie de experimentos para tratar de bloquear esta señal inespecífica

o en su defecto, poder discriminar una señal positiva falsa de una real en el mismo corte.

En los primeros ensayos se intentó bloquear la señal inespecífica (Tabla V) preincubando el tejido por tres horas con suero preinmune de conejo o suero de conejo anti-IgG de ratón o IgG de conejo anti-IgG de ratón después de los cual se sigue el procedimiento de rutina de ICC. De esta manera se intentaron saturar los sitios ocupados por los anticuerpos con un exceso de IgG del propio animal que dona los anticuerpos marcados. Las concentraciones de IgG (según lecturas realizadas a A280 nm) fueron las siguientes:

Suero Preinmune	600 ug/ml
Suero de conejo anti-IgG de ratón	600 ug/ml
IgG de conejo anti-ratón	30 ug/ml

Los resultados demostraron que no se estableció ningún tipo de bloqueo de la señal inespecífica (parcial y/o total), aún en concentraciones cuatro veces mayores a las utilizadas para segundo anticuerpo.

FIGURA 16. Fotomicrografías que muestran la reacción para inmunoperoxidasa.

a. Fotomicrografía que muestra la tinción para inmunoperoxidasa en un corte correspondiente a la región medial de la glándula. Obsérvese que la distribución de las células teñidas con inmunoperoxidasa es exclusiva de la zona II (ZII) (flechas). (80X).

b. Fotomicrografía de la región rostral proximal de la glándula que muestra la reacción para inmunoperoxidasa. Nótese que sólo la zona II (ZII) muestra tinción de peroxidasa en las células, mientras que en la zona III (ZIII) se observa tinción en el espacio extracelular (flechas). (80X).

(Barra = 50 μ m).

FIGURA 16



IV RELACION DE LAS TINCIONES HISTOLOGICAS Y LA TINCION CON ANTICUERPOS MARCADOS

Existe una correlación entre los grupos celulares teñidos con colorantes histológicos y los teñidos con anticuerpos marcados (o señal obtenida por inmunotinción) (Ver. Fig. 17). Ya se ha establecido que en la Zona II de la glándula del veneno las células de tipo II, se tiñen con eosina y que las células tipo I obtienen una coloración violeta con la hematoxilina, por lo que podemos considerarla como una zona formada por células en su mayoría acidófilas, tendencia que se traduce en la presencia de compuestos de naturaleza básica en el interior de dichas células; esta misma zona se tiñe con los anticuerpos marcados, (sólo las células del tipo II).

La correlación fue establecida para cada experimento comparando los cortes del control histológico con los cortes de tinción con anticuerpos marcados con peroxidasa, rodamina o fluoresceína, además se elaboraron cortes secuenciales teñidos de manera alternada con colorantes histológicos y con anticuerpo marcado con la finalidad de precisar la relación existente por zona de pg. y por tipo celular.

También se pudo observar que esta tinción se manifestaba de dos formas distintas en las CtII:

- Dentro de los gránulos
- En el citoplasma de la célula, excluyendo a los gránulos

Este último dato debe ser estudiado con más detalle.

FIGURA 17. Fotomicrografías que ilustran la relación que existe entre la inmunotinción y la tinción ácido-base.

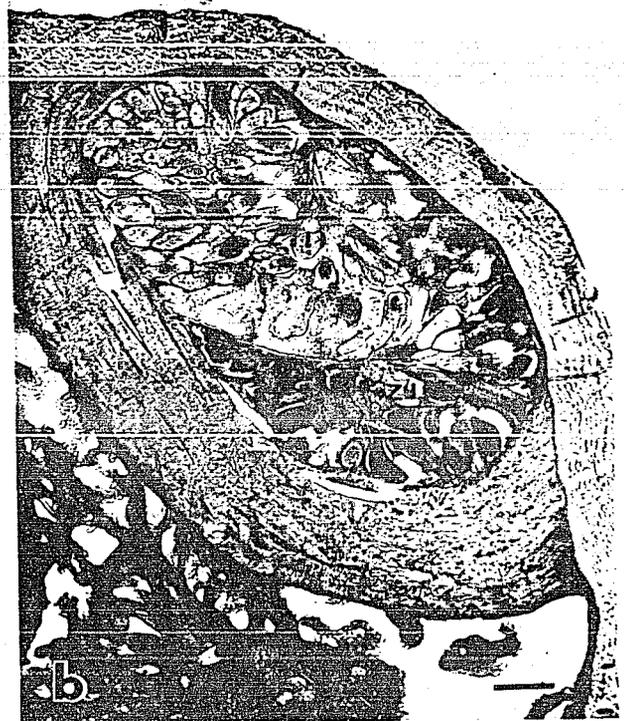
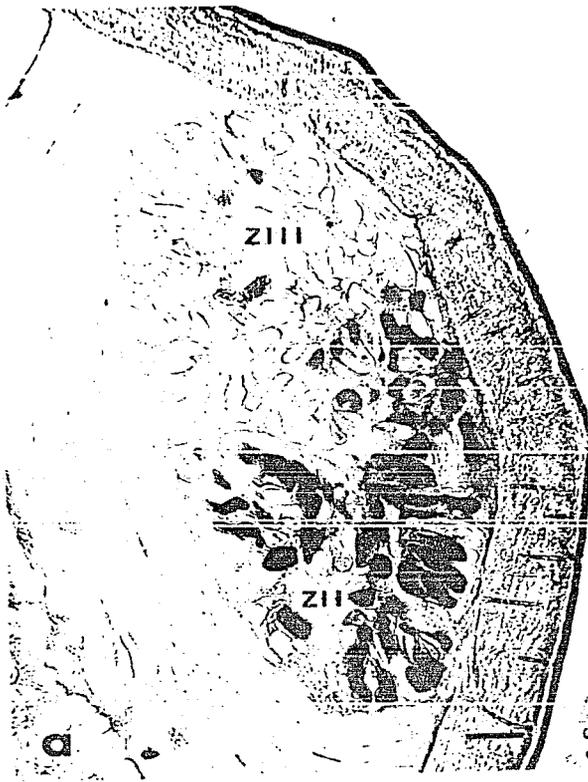
a. Fotomicrografía de un corte transversal de la glándula que muestra la inmunotinción con peroxidasa de la zona II (ZII) en la región rostral proximal. Obsérvese que la tinción es exclusiva de la zona II en contraste con el fondo casi nulo de la zona III (ZIII). (80X).

b. Fotomicrografía de un corte transversal (50um posteriores, en sentido proximal, al de la fotografía anterior) que muestra la región rostral proximal en la cual se advierte la afinidad por la Eosina de la zona II (ZII) y por hematoxilina de la zona III (ZIII). (80X).

Compárese el epitelio glandular en a. y b. para corroborar la coincidencia de la inmunotinción con la tinción ácida (Eosina).

(Barra = 50um).

FIGURA 17



DISCUSIÓN

I HISTOLOGÍA DE LAS GLÁNDULAS PRODUCTORAS DEL VENENO

Las glándulas del veneno de algunas especies de alacranes han sido estudiadas por varios investigadores, sin embargo la literatura nos hace evidente que algunos datos sobre la histología, fisiología y bioquímica de las glándulas aún no han sido aclarados.

En el presente trabajo se describe la histología de las glándulas del veneno del alacrán *Centruroides noxius* Hoffmann. Haciendo uso de dos tinciones ácido-básicas de uso común, una con Azul de Toluidina y la otra Hematoxilina-Eosina. Se ha podido observar que el epitelio glandular posee una división muy clara en cuanto a la avidez por el tipo de tinción (ácida o básica) y en cuanto a los tipos celulares que se presentan para cada zona de tinción diferencial; de esta manera se han establecido tres zonas, dos con tinción básica (azul de toluidina y hematoxilina) y una con tinción ácida (eosina), cada una de ellas con características histológicas muy particulares (ver cuadro I, figuras 9, 10 y 11 y gráficas de la I a la IV). Esto nos habla de poblaciones celulares con contenido diferente, así tenemos que las células de la Zona I y la III (enriquecidas con tipos celulares I y III) que se tiñen con azul de toluidina y con hematoxilina, deben tener un contenido ácido en comparación con las células de la Zona II, rica en células tipo II y en células tipo I con un contenido básico las primeras

y con modificación tintorial: las segundas (pues tiñen de violeta). Estas conclusiones se ven apoyadas por descripciones elaboradas por Keegan y Lockwood (1971), quienes se basaron en observaciones hechas sobre preparaciones teñidas con azul de Toluidina en solución buffer de Ac. acético-clorhídrico pH 4.5, preparación clásica para la obtención de metacromacia hacia el rojo-púrpura del Azul de Toluidina para mucopolisacáridos ácidos (compuestos carboxilados); estos autores reportan dos tipos celulares:

- Células de gránulos intermedios y finos que se tiñen de azul indicando la presencia de proteínas (que corresponderían a las CtII, descritas en este trabajo)

- Células de contenido "mucoso", con citoplasma homogéneo o con glóbulos, los cuales presentan metacromacia para el colorante indicando presencia de carbohidratos (correspondientes a las células tipo I y III reportadas aquí).

Se ha observado también un cambio en la intensidad de coloración para un mismo tipo celular; como ya se mencionó, las características tintoriales dependen de la afinidad de un grupo celular por el colorante (ácido o básico), sin embargo un cambio en la intensidad de la coloración podría reflejar una composición mixta en cuanto a la naturaleza ácido-base de los componentes intracitoplasmáticos o quizás, se trate de estados funcionales diferentes de una misma población celular o tal vez un grupo celular independiente, con características tintoriales particulares; este es el caso de las CtI las cuales adquieren una tinción violeta (de Hematoxilina) particularmente intensa en la

zona II y una tinción de color azul (también con hematoxilina) en las zonas II y III.

Además de las características tintoriales las células que conforman el epitelio glandular poseen en general características morfológicas muy bien definidas: cilíndricas, con núcleo parabasal y con microvellosidades en su borde libre, sin embargo en algunos casos pueden observarse células que presentan un ensanchamiento en la parte apical dando la apariencia de "cáliz" y en ocasiones la parte apical de la célula se separa del filamento de citoplasma que la sostiene a la membrana basal (fig. 13). Este tipo de morfología puede observarse en los tres tipos celulares independientemente de la zona en que se ubiquen. Estos datos sugieren la manera en que se lleva a cabo el proceso de secreción: el contenido celular (vesiculado o no) se desplaza hacia el borde libre para ser arrojado al lumen de la glándula, la célula, después de secretar, vuelve a iniciar la producción de su contenido, lo desplaza hacia el borde libre lo secreta y así sucesivamente, esto es, se produce un ciclo funcional de secreción.

Ahora bien, que las células posean o no vesículas o gránulos no implica diferentes fases de liberación de su contenido, como lo afirma Sámano (1964, ver antecedentes), sino más bien, pensamos que el proceso de secreción descrito en el párrafo anterior, es igual para las poblaciones celulares independientemente de si poseen o no gránulos o vesículas, ya que la morfología (desde células cilíndricas, formación del cáliz y

sus estados intermedios) puede observarse en los tres tipos celulares (CtI, CtII, CtIII).

Entonces hasta aquí podemos concluir, que en el epitelio glandular:

- Existen tres zonas delimitadas por la forma de tinción (ácido-básica) y las proyecciones de tejido conectivo que sostienen las células del epitelio.

- Dos de estas zonas (I y III) son basófilas (se tiñen con Azul de Metileno y con Hematoxilina) y una (II) es acidófila (se tiñe con Eosina).

- En el epitelio glandular existen tres tipos celulares (de acuerdo a las estructuras citoplasmáticas):

CtI: con citoplasma homogéneo.

CtII: en cuyo citoplasma se pueden observar gránulos finos.

CtIII: con citoplasma organizado en gránulos mayores en diámetro a los del tipo celular precedente.

- Cada zona esta enriquecida con ciertos tipos celulares:

ZI: Células del tipo I y III

ZII: Células del tipo II y I

ZIII: Células del tipo I y III

- En el cuadro I, podemos observar que en base a los contenidos citoplasmáticos, a las tinciones ácido-básicas y a la tinción por segundo anticuerpo acoplado a peroxidasa, se

puoden distinguir por lo menos 3 tipos celulares y hasta seis subtipos. Esto nos podría llevar a una reclasificación de tipos celulares sin tomar en cuenta las zonas de distribución. Esto debe tomarse con reservas, ya que podría tratarse de estados funcionales diferentes para cada uno de los tres tipos celulares.

Nosotros proponemos que:

- Los tres tipos celulares son poblaciones independientes. De acuerdo a sus características tintoriales, cada tipo celular parece tener un contenido diferente, por lo que existe la posibilidad de que la síntesis del veneno no se realice exclusivamente en un tipo celular, sino que sea el resultado de distintas secreciones, de esta manera habría una población dedicada a producir toxinas (o una población para cada tipo de toxinas), otra elaboraría factores tales como la hialuronidasa, etc. Para poder corroborar esta hipótesis se hace indispensable el uso de otras técnicas de tinción (P.ej. Azul alciano para reconocimiento de glicoproteínas sulfatadas o ácidos), histoquímicas (como la reacción de Acido Periódico-Schiff ó PAS) y aún más específicas como la Inmunocitoquímica. (ver más adelante).

- Los tres tipos celulares parecen tener el mismo mecanismo para la secreción. Se han observado células de los tipos I, II y III en diferentes fases del ciclo de secreción antes propuesto (formación de un ensanchamiento en la región apical) de la célula, con reducción de la parte basal del citoplasma hasta observarse desprendimiento de la región apical).

Esta proposición se veía corroborada con experimentos en los que se obtenga veneno del alacrán por estimulación eléctrica o manual, con el análisis inmediato de dichas glándulas para su control histológico.

Con respecto a la anatomía, morfología e histología del telson y de las estructuras anexas a las glándulas del veneno podemos decir:

- El telson del alacrán varía en su forma externa, y esta anatomía puede relacionarse con la distribución de las zonas del epitelio glandular (Ver fig. 7 y cuadro 11). Esta subdivisión pareciera arbitraria, pero consideramos que se tomaron los parámetros morfológicos, más sobresalientes para tratar de establecer una relación lógica, entre el epitelio glandular y la morfología externa y facilitar la descripción de los mismos.

- Vaso hemolinfático: esta estructura es considerada como tal en este trabajo, por contener células del tipo mononuclear, con núcleo excéntrico de dos tipos: pequeñas con citoplasma acidófilo y algunas basófilo, y células grandes con citoplasma basófilo, que recuerdan a las células hemáticas en mamíferos. Esta observación concuerda con la elaborada por Keegan y Lockwood en 1971, los cuales reportan células tipo "leucocito" dentro de este espacio. En el interior de este vaso se observan también concreciones granulares, como si se tratara de proteínas "coaguladas" de origen hemolinfático o una malla de fibras finas, algunos autores afirman (Sámano, 1964) que este contenido es una

mezcla de hemolinfa y veneno, esta aseveración es difícil de creer pues anatómicamente, el veneno se localiza dentro del epitelio glandular que esta rodeado por el músculo por un lado, y por la cutícula por el otro, por lo que la difusión del mismo hasta el vaso sería muy difícil. Por otro lado, sabemos que los alacranes son sensibles a su propio veneno, entonces, como se explicaría la presencia de hemolinfa y veneno mezclados en un vaso que finalmente distribuye nutrimentos al cuerpo del alacrán?

Con respecto al pequeño espacio en la parte superior del telson, pensamos que es un espacio virtual, dependiente de la extensión hacia la parte superior del conducto hemolinfático y del estado de contracción de los fascículos musculares. Esta proposición esta apoyada por la presencia de células mononucleares en este pequeño conducto, además de las observaciones de que los fascículos musculares no parecen tener unión estrecha entre ellos y que en algunas preparaciones se observan estos dos fascículos completamente separados, comunicando en forma directa el vaso hemolinfático con el pequeño espacio al que nos referimos.

- Fascículos musculares periglandulares: en este trabajo se reportan a las fibras que conforman los f.m como estriados (ver fig. 15), dato que concuerda con lo establecido por varios autores con ayuda de la microscopía de luz y electrónica (Probst, 1972; Mazurkiewicz y Bertke, 1972; Dent, 1979), en contraposición con lo establecido por Keegan y Lockwood en 1971 que se refieren a la cubierta muscular constituida por fibras lisas.

Por otro lado, estos fascículos están dispuestos en dos direcciones con respecto al eje longitudinal de la glándula: haces musculares longitudinales y fibras musculares circulares (de acuerdo con Stahnke, 1978). La disposición de estas fibras, con predominio de las circulares, permiten suponer que la compresión del tejido glandular se realiza por la acción de contracciones rítmicas originadas en la porción proximal de la cubierta muscular, siendo progresivas en dirección al aculeus.

II INMUNOCITOQUIMICA

La técnica Inmunocitoquímica es una herramienta versátil que puede utilizarse para confirmar la localización de sitios conocidos de almacenamiento o unión de algunos antígenos. Cuando se encuentra una combinación extraña de antígenos en algún tejido, utilizando esta técnica es necesario validar este patrón de inmunotinción o en su caso explicar el significado biológico del descubrimiento. (Lindis, 1983; Vandesande 1979).

En el presente trabajo se propuso iniciar la identificación de los grupos celulares en los que se encuentren contenidas las toxinas del alacrán *Centruroides noxius* Hoffmann; con este fin se eligió a la toxina II-11 o Noxiustoxina como representante de las toxinas de cadena corta que bloquean el canal de K y a la toxina II-9.2.2 como representante del grupo de péptidos homólogos de cadena larga que se ha demostrado bloquean el canal de Na en el axón gigante de calamar. Para desarrollar esta tarea se eligió la técnica Inmunocitoquímica.

Como ya se ha visto, esta técnica requiere de una serie de pruebas para validar los resultados de la misma, por lo que se hace necesario el uso de controles (Ver materiales y Métodos; Fool, 1983), y pruebas de especificidad adicionales (Larsson, 1981; Petrusz, 1980, 1983).

Durante la elaboración de este trabajo, fue necesario la implementación de experimentos control para cada paso de la técnica, de manera que se asegurase de la conservación

histológica y de inmunoreactividad en el tejido. (Ver Resultados); la señal obtenida para estos ensayos resultó ser inespecífica, esto es, no es debida a la especificidad de los anticuerpos por sus antígenos reales, sino que mas bien a la unión del segundo anticuerpo (acoplado al fluoróforo o a la peroxidasa) a un grupo celular específico. Se trata entonces de un problema de especificidad del método (descrito con este nombre por Pool et al., 1983), en la que los mecanismos de la inmunotinción son ajenos a las interacciones normales entre el anticuerpo y el antígeno que se quiere localizar.

En la literatura se consideran algunos ejemplos en los que se describe la unión de algunos anticuerpos conjugados, debida a interacciones electrostáticas con proteínas básicas del tejido (interacciones proteína-proteína; Vandesande, 1980). Según Sternberger (1979) este tipo de reactividad no específica puede prevenirse con la incubación del tejido en suero preinmune del animal que ha servido como fuente del segundo anticuerpo. Considerando lo anterior, se intentó el bloqueo de la señal que se identificó como inespecífica, haciendo uso de suero preinmune de Conejo, de ratón, IgG de Conejo anti ratón, e IgG de conejo contra IgG de ratón purificada (ver resultados), sin embargo no se ha podido obtener un resultado positivo en el bloqueo; es posible que las cantidades de "bloqueador" sean insuficientes (600 ug/ml de IgG en promedio para el suero preinmune y para el suero conejo antiratón, aplicado a seis cortes de 10 micras de ancho cada una), y que no se haya alcanzado la saturación de los sitios deseados, por lo que sería necesario el uso de un

ensayo sistemático (prácticamente un estudio cinético del bloqueo) para revertir los efectos "electrostáticos" o de unión de algún otro tipo, de estos anticuerpos.

III RELACION DE LAS TINCIONES HISTOLOGICAS Y LA TINCION CON ANTICUERPOS MARCADOS

Algunos autores (Pino, 1985; Straus, 1979, 1980, 1983, 1987), han demostrado que la carga de los enlaces de la peroxidasa de rábano en los conjugados con anticuerpos pueden influenciar la localización inmunocitoquímica de los mismos; estos autores observaron que la peroxidasa tipo VI aislada o unida a la porción Fab de un anticuerpo inespecifico (cargadas las dos moléculas en forma positiva) se unían a los sitios aniónicos del tejido, y que se revertía este efecto con el uso de Fab-Peroxidasa tipo VIII y Peroxidasa tipo VIII aislada (cargadas negativamente) o con la digestión producida por la condroitinasa, la cual remueve los sitios aniónicos en la lámina basal y las fibras de colágena. Estos resultados sugieren una fuerte influencia de la carga en la unión de los conjugados con peroxidasa, por lo que sería posible pensar que cualquier sustancia que sea capaz de cambiar el tipo de cargas existentes en el tejido elimine o disminuya estas señales inespecificas.

Para el caso de la Inmunocitoquímica para la localización de las toxinas de alacrán, se sabe que existe una correlación entre los grupos celulares teñidos con colorantes histológicos y los teñidos con anticuerpos marcados (o señal obtenida por inmunotinción): la Zona II que se tiñe con Eosina y es negativa al Azul de Toluidina, también es teñida por anticuerpos marcados (inmunotinción?). Considerando lo anterior podemos concluir lo siguiente:

- La zona II tiene células acidófilas, tendencia que depende de la presencia de compuestos de naturaleza básica en el interior de dichas células; esto podría indicar la existencia de sitios fuertemente cargados en el interior de estas células, por lo que podría intentarse un bloqueo de tal tinción con procedimientos similares a los utilizados por Pino y Straus, de tal manera que, libre de estas tinciones inespecíficas, se pueda iniciar la búsqueda de la localización efectiva de las toxinas de C.n.H., no sin antes haber considerado que el problema técnico que se está manejando confirma una vez más que la técnica inmunocitoquímica aún posee aspectos interesantes que se tienen que explorar para hacer un uso efectivo de esta técnica.

BIBLIOGRAFIA

- Avrameas S. (1972). Enzyme markers: their linkage with protein and its use in immunohistochemistry. A review. *Histochem. J.* 4, pp. 321-330
- Babin D.R., Watt D.D., Goos S.M., Mlejnek R.B. (1975). Aminoacid sequences of neurotoxic protein variants from the venom of *Centruroides sculpturatus* Ewing. *Arch. Biochem. Biophys.* 164, pp. 694-706.
- Babin D.R., Watt D.D., Goos S.M., Mlejnek R.B. (1975). Aminoacid sequences of neurotoxin I from *Centruroides sculpturatus* Ewing. *Arch. Biochem. Biophys.* 166, pp. 125
- Balozet L. (1971). Scorpionism in the old World. En: *Venomous Animals and their venoms*. Eds. Bucherl W., Buckley E.E. Vol III Academic press. New York. pp. 349-371
- Berwald-Netter Y., Martin-Moutot N., Koulakoff A., Coureaud F. (1981). Na-Channel associated scorpion toxin receptor sites as probes for neural evolution in vivo and in vitro. *Proc Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 78-2, pp. 1245-1249.
- Bigbee J.W., Kosek J.C., Eng E.L.F. (1977). Effects of primary antiserum dilution on staining of "antigen-rich" tissue with the peroxidase antiperoxidase technique. *J. Histochem. Cytochem.* 25, pp. 443-447.
- Bloom F., Rossier J., Battenberg E.L.F., Bayon A., French E., Henriksen S.J., Siggins G.R., Segal D., Browne R., Ling M., Gillemin R. (1978). β -endorphin: cellular localization, electrophysiological and behavioral effects. En: *The endorphins*, *Adv. Biochem. Psychopharmacol.* Vol. 18. Eds. Costa E., Iabucchi M. Raven press, New York. pp. 89-109
- Boer G.J., (1979). Development of a specificity test for immunocytochemical of neuropeptides using high voltage electrofocussing in polyacrilamide micro salt gels. *J. Endocr.* 80, pp. 54
- Boorsma D.M., Cuello A.C., Van Leeuwen F.W. (1982). Direct immunocytochemistry with a Horseradish Peroxidase-conjugated Monoclonal antibody against substance P. *J. Histochem. Cytochem.* 130 (12), pp. 1211-1216.
- Bravo-Recherelle M.A., Mazzotti I. (1961). Distribución de la mortalidad por picadura de alacrán en México. *Rev. Inst. Sal. Enf. Trop. (Mex)* 21-(3-4), pp. 129-140.
- Bucherl W. (1964). Histología des glandulas de veneno de algunas arañas e escorpiones. *Mem. Inst. Butantan*, 31, pp. 77-84.

Bucherl W. (1971). Classification, biology and venom extraction of scorpions. En: *Venomous Animals and their venoms*. Eds. Bucherl W., Buckley E.E. voi III. Academic Press., New York, London. pp. 317-347.

Camacho H.H. (1974). *Invertebrados fósiles*. Editorial Universitaria de Buenos Aires. pp. 96-98.

Carabez T.A., Possani L.D. (1982). Electron Microscopic evidence for scorpion toxin binding to synapses of rat brain cortex. *Neurosc. Lett.*, 32, pp. 103-108.

Carbone E., Wanke E., Prestipino G., Possani L.D., Maelicke A. (1982). Selective blokage of voltage-dependent K channels by a novel scorpion toxin. *Nature*, 296, pp. 90-91.

Catterall W. (1980). Neurotoxins that act on voltage sensitive sodium channels in excitable membranes. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 20, pp. 15-43.

Childs G.V. (1983). The use of multiple Methods to validate Immunocytochemical Stains. *J. Histochem. Cytochem.* 31-1A, pp. 168-176.

Cole E.C. (1931). Isohematein as a biological stain. *Stain Technol.* 6, pp. 93-96.

Coons A.A., Creech H.J., Jones R.N., Berliner E. (1942). The demonstration of pneumococcal antigen in tissue by the use of fluorescence antibody. *J. Immunol.*, 45, pp. 159-170.

Coons A.H. (1956). Histochemistry with labeled antibody. *Int. Rev. Cytol.* 5, pp. 1-23.

Cuello A.C., Milstein C., Galfre G. (1983). Preparation and application of monoclonal antibodies for immunohistochemistry and immunocytochemistry. Cap. 9 en *Immunohistochemistry*. Ed. Cuello A.C. IBRO Handbook series: *Methods in Neurosciences*. Vol. 3. Wiley & Sons. Chichester, N.Y., Brisbane, Toronto, Singapore. pp. 215-256.

Delori P., Van Rietschoten J., Rochat L.H. (1981). Scorpion Venoms and Neurotoxins: An immunological study. *Toxicon* 19, pp. 393-407.

Del Pozo, E.D. (1948). The action of the venom of a mexican scorpion (*Centruroides noxius* Hoffmann) on cholinesterases. *Brit. J. Pharmacol.* 3, pp. 219-222.

Del Pozo, E.D. (1956). Mechanisms and pharmacological actions of scorpion venom. Eds. Buckley E.E., Forges N. *Amer. Ass. Advanc. Sci.* pp. 123.

- Del Pozo E.D., Anguiano I.G. (1947). Acciones del veneno de alacrán sobre la actividad motora de musculo estriado. Rev. Inst. Sal. Enf. Trop. (Mex). 6, pp. 233-269.
- Dent M.A.R. (1979). Contribución al estudio de las toxinas del veneno y ultraestructura del telson del alacrán de Mayarit *Centruroides noxius* Hoffmann. Tesis profesional, para obtener el título de Biólogo. Fac. de Ciencias. Depto. de Biología. UNAM.
- Dent M.A.R. (1982). Aislamiento y caracterización química de diversas toxinas del veneno del alacrán *Centruroides noxius* Hoffmann. Tesis para obtener el grado de Maestro en Ciencias Químicas (Bioquímica). Fac. de Química. UNAM.
- Dent M.A.R., Possani L.D., Ramirez G.A., Fletcher P.L. (1980). Purification and characterization of two mammalian toxins from the venom of the Mexican scorpion *Centruroides noxius* Hoffmann. *Toxicon* 18, pp 343-350.
- Díaz-Najera A. (1970). Contribución al conocimiento de los alacranes de México (Scorpionida). Rev. Inv. Sal. Pub. (Mex). 30-(2), pp. 111-122.
- Drury R.A.B., Wallington (1980). Carleton's Histological Technique. Quinta edición. Oxford University Press. Oxford, N.Y., Toronto.
- El Ayeb M., Delori F. (1982). Immunology and immunochemistry of Scorpion Neurotoxins. Cap. 18. En: Handbook of Natural Toxins. Vol. 2. Insect poisons, allergens and other invertebrates venoms. Eds. G. A. I. Marcel Dekker Inc. N.Y. pp. 607-638.
- Erikson, R.W. (1978). Sequence homology of snake, scorpion and bee toxins. *Toxins: Animal Plant and Microbial. Proceed. V. Inter. Sym. Ed. P. Rosenherg. Pergamon press. Oxford, New York.* pp. 1071-1086.
- Flores R. (1963). Observaciones sobre la sintomatología y tratamiento de la intoxicación por picadura de alacrán. Rev. Inst. Salubr. Enf. Trop. 23- (3-4). pp. 175-178.
- Fontecilla-Camps J.C., Almasy R.J., Ealick S.E., Suddath F.L., Watt D.L., Bugg C.E. (1980). Three dimensional structure of a protein from scorpion venom: A structural class of neurotoxins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 77, pp. 6496-6500.
- Fontecilla-Camps J.C., Almasy R.J., Suddath F.L., Watt D.L., Bugg C.E. (1981) Architecture of scorpion neurotoxins: a class of membrane binding proteins. *TIBS* 6, pp. 291-296.
- García G.F. (1976). Etude des neurotoxins du venin du scorpion mexicain *Centruroides suffusus suffusus*. Francia. Tesis de Doctorado. Universidad de Nice, Francia.

Geffen L. (1983). Foreward. En: Immunohistochemistry, Ed. Cuellio A.C. IBRO Handbook series: Methods in Neuroscience. Vol. 3. J.Wiley & Sons. Chichester, N.Y., Brisbane, Toronto, Singapore. pp. xi-xiii.

Gómez M.M. (1963). Morfología e histología de la glándula venenosa de *Centruroides limpidus limpidus tecomanus Hoffmann* (arachnida; scorpionida). Tesis profesional para obtener el título de Biólogo. Fac. de Ciencias. Depto de Biología. UNAM.

Gómez M.D., Dai M.E.M., Diniz C.R. (1973). Effect of scorpion venom, Titiustoxin on the release of acetylcholine for incubated slices of rat brain. *J. Neurochem* 20, pp. 1051-1061.

Granier C.E., Bahraqui J., Van Rietschoten, Rochat H, El Ayeb M., (1984). Synthesis and immunological characterization of two peptides which are models of the four major antigenic sites of a scorpion toxin. *Int. J. Peptide Protein Res.* 23, pp. 187-197.

Grishin E.V., Soldatov N.M., Soldatova L.N., Orchnimkov Y.A. (1976). Studies of the toxins from *Buthus eupeus* scorpion venom. 5th. Inter. Sym. on Animal, Plant and Microbial toxins. San José, Costa Rica. Pergamon Press. N.Y.

Grossi C.H., Mayersbach H. (1964) Technical factors affecting immunological methods. I. The influence of different pH and buffer salts for unspecific reaction. *Acta Histochem.* (Jena).19, pp. 382-398.

Habeeb A.F.S.A., Hiramoto R. (1968). Reaction of protein with glutaraldehyde. *Arch. Biochem Biophys.*, 126, pp. 16-26.

Ham A.W., Cormack D.H. (1983). *Tratado de Histología*. Octava edición. Nueva editorial Interamericana. México. pp. 13-30 y 209-225.

Harris H.F. (1900). On the rapid conversion of haematoxylin into haematein in staining reactions. *J. appl. Micro.* 3, pp. 777-780.

Hoffmann C.C. (1932). *Monografías para la entomología médica de México*. Monografía num. 2. Los escorpiones de México. Segunda parte: *Buthidae*. *Anales Inst. Biol.* (México) tomo 11 pp. 291-408. Tomo III, pp 243-261.

Hoffmann C.C. (1938). Nuevas consideraciones acerca de los alacranes de México. *Anales Inst. Biol.* (México). Tomo IX (1-2). pp 318- 337

Hoffmann C.C., Nieto-Roaro D. (1939). Segunda contribución al conocimiento de los veneno de los alacranes Mexicanos. *Anales del Instituto de Biología* (México). Tomo XI, pp. 83-92.

Hopwood D. (1969). Fixatives and Fixation: A review. *Histochem. J.* 1, pp. 323-360.

- Hopwood D. (1972). Theoretical and practical aspects of glutaraldehyde fixation. *Histochem. J.* 4, 267-303.
- Ivanov O. Ch. (1981) The evolutionary origin of toxic proteins. *Toxicon*, 19, pp. 171-178.
- Johnson B.D., Tullar J.C., Sthanke H.L. (1966). A quantitative protozoan bio-assay method for determining venom potencies. *Toxicon* 3, pp. 297-300.
- Jover E., Martin-Moutot., Coureaud F., Rochat H. (1978). Scorpion Toxin: specific binding to rat synaptosomes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 85, pp. 337-382.
- Karnovsky M.J. (1965). A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolarity for use in electron microscopy. *J. Cell Biol.* 27, pp. 137 A.
- Keegan H.L., Lockwood W.R. (1971). Secretory epithelium in venom gland of two species of scorpion of the genus *Centruroides* Marx. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 20, pp. 770-785.
- Kopeyan C., Martinez G., Rochat H. (1978). Aminoacid sequence of neurotoxin V from the scorpion *Leiurus quinquestriatus*. *FEBS letters* 89-(1), pp. 54-58.
- Kubota S. (1960). An experimental study of the venom of the Manchurian scorpion. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 11, pp. 379-388.
- Larsson I. J. (1981). A novel immunocytochemical model system for specificity and sensitivity screening of antisera against multiple antigens. *J. Histochem. Cytochem.* 29, pp. 408-410.
- Lillie R.D. (1965). *Histopatologic technique and practical histochemistry*. Tercera edición. Mc. Graw-Hill, N.Y. pp. 145
- Lutz H., Higgins J., Pederson N.C., Theilen G.H. (1979). The demonstration of antibody specificity by a new technique. *J. Histochem. Cytochem.* 27, pp. 1216-1220.
- Manton S.M. (1978). *The arthropoda: Habits, Functional Morphology and Evolution*. Oxford University Press. Oxford, N.Y., Toronto. pp. 527-530.
- Martínez O.G. (1964). *Notas generales sobre la anatomía e histología de la glándula venenosa del alacrán Centruroides limpidus limpidus (Karsch)*. Tesis profesional, para obtener el título de biólogo. Facultad de Ciencias, Depto. de Biología. UNAM.
- Marrack J. (1934). Nature of antibodies. *Nature (Lond)* 1033, pp. 292-293.

- Mason D.Y., Cordell J.L., Pulford K.A.F. (1983). Production of Monoclonal antibodies for immunocytochemical use. En: *Techniques in Immunocytochemistry*. Vol. 2. Eds Bullock G.R., Petrusz P. Academic Press Inc. N.Y., London, Toronto, Sydney, San Francisco. pp. 175-216.
- Manson T.C., Phifer R.F., Spicer S.S., Swallow K.A., Dreskin R.B. (1969). An immunoglobulin-enzyme bridge method for localizing-tissue antigens. *J. Histochem. Cytochem.* 17, pp. 563-569.
- Mazurkiewicz J., Bertke E.M. (1972). Ultraestructure of the venom gland of the scorpion *Centruroides sculpturtus*. *J. Morphol.* 137, pp. 365-384.
- Mayersbach H.V. (1967). Principles and limitations of immunohistochemical methods. *J. Roy. Microsc. Soc.* 87, pp. 295-308.
- Mazzotti I., Bravo-Becherelle M.A. (1961). Escorpionismo en la República Mexicana. *Rev. Inst. Sal. Enf. Trop. (México)* 21, (1-2), pp. 3-19.
- Meglisch P.A. (1981). *Zoología de Invertebrados*. Cap. 13. Algunas características de Artrópodos. Editorial Blume. México. pp. 491-562.
- Miller H.R.P. (1972). Fixation and tissue preservation for antibody studies: a review. *Histochem. J.* 4, pp. 305-320.
- Milstein C., Wright B., Cuella A.C. (1983). The discrepancy between the cross reactivity of a monoclonal antibody to serotonin and its immunochemical specificity. *J. Mol. Immunol.* 20, pp. 113-123.
- Miranda F., Lissitzky S. (1961). Scorpamins, the toxic proteins of scorpion venoms. *Nature (Lond)* 190, 443-444.
- Parenti ii. (1973). *Atlas de Zoología*. Segunda edición. Instituto Geográfico de Agostini. Editorial Feide, S.A. Barcelona España. pp. 108-109.
- Pavan A., Dazzini M.V. (1971). *Chemical Zoology*. Vol. 6. Eds. Florkin M., Sceer B.T. Academic press. N.Y., London, Toronto, Sydney, San Francisco. pp. 365.
- Pawlowsky E. (1914). Contribution to the structure and development of scorpions (russian). *Rev. Russ. Entomol. (Russk. entomol. oborzr.)* 14, pp. 57-71.
- Pawlowsky E.N. (1926). Studies on the organization and development of scorpion (genus *Centrurus*). *J. Microsc. Sci.* 70, pp. 135-146.

Petrusz P. (1983). Essential requirements for the Validity of Immunocytochemical Staining Procedures. *J. Histochem. Cytochem.* 31-1A, pp. 177-179.

Petrusz P., Sar M., Ordroneau P., DiMeo P. (1976). Specificity in immunocytochemical staining. *J. Histochem. Cytochem.* 24, pp. 1110-1115.

Petrusz P., Sar M., Ordroneau P., DiMeo P. (1977). Reply to the letter of Suaab et al. "Can sapecificity ever be proved in immunocytochemical staining?". *J. Histochem. Cytochem.* 25, pp. 390-391.

Petrusz P., Ordroneau P., Finley J.C.W. (1980). Criteria for reliability for light microscopic immunocytochemical staining. *Histochem. J.* 12, pp. 333-338.

Pino R.M. (1985). Binding of Fab-Horseradish Peroxidase Conjugates by charge and not by Immunospecificity. *J. Histochem and Cytochem.* 33-1, pp. 55-58.

Pool Ch., Buijs R.M., Swaab D.F., Boer G.J., Van Leeuwen F.W. (1983). On the way to specific immunocytochemical localization. Cap. I. In: Immunocytochemistry. Ed. Cuelllo A. C. IBRO Handbook series: Methods in Neurosciences. Vol. 3. J. Wiley & Sons. Chichester, N.Y., Brisbane, Toronto, Singapore. pp. 1-46.

Possani L.D. (1982). Structure of Scorpion toxins. Cap. 15. Handbook of natural toxins. Vol. 2: Insect poisons, allergens, and other invertebrate venoms. Ed. Fu A.T. Marcel Dekker Inc. N.Y. pp. 513-550.

Possani L.D. (1983). Las toxinas del veneno de alacranes, estructura y función. *Bol. Estud. Med. Biol. (México).* Suplemento 32, pp. 285-297.

Possani L.D., Dent M.A.R., Martin B.M., Maclicke A., Svendsen I. (1981 a). The amino terminal sequence of several toxins from the venom of the mexican scorpion *Centruroides noxius* Hoffmann. *Carlsberg Res. Commun.* 46, pp. 207.

Possani L.D., Fernández de Castro J., Julia J.Z. (1981b). Detoxification with glutaraldehyde of purified scorpion (*Centruroides noxius* Hoffmann) venom. *Toxicon* 19-2, pp. 323-329.

Possani L.D., Martin B.M., Svendsen I. (1982). The primary structure of neurotoxins: a K channel blocking peptide purified from the venom of the scorpion *Centruroides noxius* Hoffmann. *Carlsberg Res. Commun.* 47, pp. 285-289

Possani L.D., Martin B.M., Svendsen I., Rode G.S., Erickson B.W. (1985). Scorpion toxins from *Centruroides noxius* and *Tityus serrulatus* (primary structure sequence comparison by metric analysis). *Biochem.J.* 229, pp. 739-750.

- Possani L.D., Steinmetz W.E., Dent M.A.R., Alagón A.C., Wuthrich K. (1981). Preliminary spectroscopy characterization of six toxins from Latin American scorpions. *Biochem. Biophys. Acta* 669, pp. 183-192.
- Probst P. J. (1972). Zur Fortpflanzungsbiologie und zur Entwicklung der Giftdrüsen beim Skorpion *Isomerus maculatus*. (de Geer, 1778) (Scorpion: Buthidae). *Acta Trop. (Basel)* 29-1, pp. 1-87.
- Rode G.R.S. (1984). Aislamiento y caracterización de los componentes tóxicos del veneno del alacrán sudamericano *Tityus serrulatus*. Tesis para obtener el grado de Maestro en Ciencias Químicas (Bioquímica). Facultad de Química. INAM.
- Rochat J., Bernard P., Couraud F. (1979). Scorpion toxins: Chemistry and mode of action. *Adv. in Cytopharmacology*. Vol. 3. Eds. Ceccarelli F., Clementi F., Raven Press, N.Y. pp. 325-334.
- Rochat H., Kopeyan C., García L.G., Martínez G., Kosso J.P., Pakaris A., Martín M.F., García A., Martín-Moutot N., Gregoire J., Miranda F. (1976). Recent results on the structure of scorpion and snake toxins. *Animal, Plants and Microbial toxins*. Vol. 2. Ed. A. Ohsaka, Hayashi K., Samai Y. Plenum Press, N.Y. pp. 79-87.
- Rochat H., Rochat C., Kopeyan C., Miranda F., Lissitzky S., Edman P. (1970a). Scorpion neurotoxins a family of homologous proteins. *FEBS. letters* 10, pp. 351-359.
- Rochat H., Rochat C., Miranda F., Lissitzky S., Edman P. (1970b). The amino acid sequence of neurotoxin I of *Androctonus australis* Hector. *Eur. J. Biochem.* 17. pp. 267-276.
- Rochat H., Rochat C., Sampieri F., Miranda F., Lissitzky S. (1972). The amino acid sequence of neurotoxin II of *Androctonus australis* Hector. *Eur. J. Biochem.* 28. pp. 381-388.
- Rochat C., Sampieri F. (1975). Structure function relationship of scorpion neurotoxins. Com. at the fourth International Symposium on Animal, Plant and Microbial Toxins. Tokyo. (1974). *Abstract Toxicol* 13. pp. 120.
- Romer A.S. (1977). *The Vertebrate body*. Cuarta edición. Saunders, Philadelphia. pp.39.
- Rosene D.L., Mesulam M.M. (1978). Fixation variables in horseradish peroxidase neurohistochemistry. I. The effects of fixation time and perfusion procedures upon enzyme activity. *J. Histochem. Cytochem.* 26-1, pp. 28-39.

Ruiz D.M.F. (1963). Morfología e Histología de la glándula venenosa de *Vejovis mexicanus mexicanus* C.L. Koch (Arachnida, Scorpionida). Tesis profesional para obtener el título de Biólogo. Fac. de Ciencias. Depto. de Biología. UNAM.

Sámano B.A., Gómez de Ferriz M. (1964). Estudio morfológico, histológico e histoquímico de la glándula venenosa de algunas especies de alacranes de los géneros *Vejovis* C.L. Koch, *Diplocentrus* Peter y *Centruroides* Marx. An. Inst. Biol. (México). Vol. XXXV, pp. 139-155.

Sánchez García M.R. (1986). Purificación de toxinas del veneno del alacrán *Centruroides noxius* Hoffmann (1932), por medio de inmunoabsorbentes. Tesis profesional para obtener el título de Biólogo. Fac. de Ciencias. Depto de Biología. UNAM.

Sitges B.M. (1984). Estudio del efecto de las toxinas del alacrán mexicano *Centruroides noxius* Hoffmann sobre la liberación de neurotransmisores a partir de sinaptosomas. Proyecto para aspirar a alumno de doctorado en Investigación Biomédica Básica.

Sitges M., Possani L.D., Bayón A. (1986). Noxiustoxin a short chain toxin from the mexican scorpion *Centruroides noxius*, induces transmitter release by blocking K permeability. J. Neurosci. Vol. 6, pp. 1570-1574.

Shulov A., Levy G. (1978). Venoms of Buthidae. En: Arthropod venoms handbook of experimental pharmacology. Vol. 48. Ed. Bettini S. Springer-Verlag, N.Y., pp. 309-317.

Slotta K.H., González J.D., Roth S.C. (1967). Animal toxins. Eds. Russel F.E., Saunders P.R. Pergamon Press, London. pp. 369.

Sofroniew M.V., Couture R., Cuello A.C. (1983). Immunocytochemistry: Preparation of antibody and staining specificity. Cap. V. En: Handbook of Chemical Neuroanatomy. Vol. I. Methods in chemical neuroanatomy. Eds. Bjorklund A., Hokfelt T. Elsevier Science Publishers. B.V. N.Y., Amsterdam, Oxford. pp. 210-226.

Stahnke H.L. (1971). Some observations of the genus *Centruroides* (Buthidae, Scorpionidae). Entomol. News. 82, pp. 281-307.

Stahnke H.L. (1978). The genus *Centruroides* (Buthidae) and its venom. En: Arthropod venoms. Handbook of Experimental Pharmacology. Vol. 48. Ed. Bettini S. Springer-Verlag N.Y. pp. 277-307.

Sternberger L. (1979). Immunocytochemistry. Segunda edición. John Wiley and Sons, Chichester, Brisbane, Toronto, N.Y.

- Sternberger I., Hardy P.H., Cuculis J.J., Meyer H.G. (1970). The unlabeled antibody enzyme method of immunochemistry. Preparation and properties of soluble antigen-antibody complex (Horseradish peroxidase-antihorseradish peroxidase) and its use in identification of spirochetes. *J. Histochem. Cytochem.* 18, pp.315-333.
- Straus W. (1979). Peroxidase procedures. Technical problems during their application. *J. Histochem. Cytochem.* 27-10, pp. 1349-1351.
- Straus W. (1980). Factors affecting the sensitivity and specificity of the cytochemical reactions for the Anti-Horseradish Peroxidase antibody in Lymph Tissue Sections. *J. Histochem. Cytochem.* 28-7, pp. 645-652.
- Straus W. (1983). Mannose-specific binding sites for horseradish peroxidase in various cells of rat. *J. Histochem. Cytochem.* 31-1, pp. 78-84.
- Straus W. (1987). Unusual binding sites for Horseradish Peroxidase may contribute to "Background" adsorption of the enzyme. *J. Histochem. Cytochem.* 35-6, pp.703-704.
- Swaab D.F., Pool Ch. W., Van Leeuwen F.W. (1977). Can specificity ever be proved in Immunocytochemical staining? *J. Histochem. Cytochem.* 25. pp. 388-391.
- Tu A.T. (1977). Scorpion venoms. In: *Venoms: Chemistry and molecular Biology*. Ed. Tu A.T. John Wiley & Sons. N.Y. pp.456-483.
- Vachon M. (1953). La Biologia de los escorpiones. *Endeavour* 12 (46). pp. 80-87.
- Vandesande F. (1979). A critical review of Immunocytochemical methods for light microscopy. *J. Neurosci. Meth.* 1. pp.3-23.
- Vargas O., Gregoire J., Martin M.F., Bechis G., Kochat H. (1982). Neurotoxins from the venom of two scorpions: *Buthus occinatus tunetanus* and *Buthus occinatus mardochei*. *Toxicon* 20(1). pp.79.
- Watters J.J., Possani L.D., Mochca-Morales J., Hess B. (1982). Determination of alpha-helix and beta-sheet structure in toxins purified from venoms of latinamerican scorpions. *Toxicon* 20. pp.81.
- Weller I.H., Coons A.H. (1984). Fluorescent antibody studies with agents of varicella and herpes zoster propagated in vitro. *Proc. Soc. Exp. Biol.* N.Y. 86. pp.789-794.
- Zlotkin E. (1972). Chemistry of animal venoms. *Experientia* 29 (12). pp.1453-1488.

Zlotkin E., Miranda F., Roehat H. (1978). Chemistry and pharmacology of Buthidae scorpion venoms. In: arthropod venoms. Handbook of Experimental Pharmacology. Vol. 40. Ed. Bettini S. Springer-Verlag, N.Y. pp.317-369.