

**UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA
FACULTAD DE FARMACIA
POSTGRADO DE TOXICOLOGÍA**



**CARACTERIZACIÓN TOXINOLÓGICA Y CLÍNICA DEL VENENO
TOTAL DE LA SERPIENTE VENEZOLANA *Bothrops colombiensis*
(PARACOTOS, ESTADO MIRANDA) Y SUS FRACCIONES TÓXICAS.**

***Fctico. Carmen Teresa Duque Zerpa.
Octubre, 2012***



UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA
FACULTAD DE FARMACIA
POSTGRADO DE TOXICOLOGÍA

**Trabajo de grado presentado ante la ilustre
Universidad Central de Venezuela como
requisito para optar al título de
Magíster Scientiarum en Toxicología.**

TUTORES

Drs.: Héctor Scannone y Alba M. Vargas

AGRADECIMIENTOS

A Díos quien me infundió paciencia y enterezasiempre permitiéndome ver la ventana que se abría para poder lograr esta meta.

A mis Padres, quienes me hicieron quien soy y me acompañan cada día. Y a mi hermanita jj ...a quien convertí en asesora en computación, física y matemáticas.

Al personal del Departamento de Patología del Instituto Nacional de Higiene Rafael Rangel, quienes trabajaron paciente y arduamente en la evaluación histopatológica contribuyendo de forma esencial a este estudio. Especialmente a la Dra. Karina Acosta y al Dr. Stefan Selgrad por su valiosa asesoría técnica y científica.

Al personal del Laboratorio de Ultraestructura Toxinológica del Instituto Anatómico de la Universidad Central de Venezuela.

A la Fctica Marlenis Gallardo de Biotecfar. Facultad de Farmacia de la Universidad Central de Venezuela. Así como a su Directiva quienes nos cedieron uno de los reactivos empleados en este estudio.

Al Dr. Tomas Hermoso y a la Lic. María de los Angeles Narvaez del Laboratorio de Bioquímica de Parásitos del Instituto de Medicina Tropical de la Universidad Central de Venezuela.

A la Dra. Ligia Peña del Hospital “Dr. Leopoldo Manrique Terrero”.

Al Postgrado de Toxicología de la Facultad de Farmacia de la Universidad Central de Venezuela. Especialmente a su Coordinadora Prof. Gladys Romero de Galí, mi profesora desde hace 15 años y quien desde entonces ha contribuido a mi formación, con su asesoría, consejos e inquietudes. Mil gracias jjj

Al personal del Laboratorio de Investigaciones de la Facultad de Farmacia de la Universidad Central de Venezuela, quienes por 2da vez me recibieron en sus instalaciones para trabajar y aprender con ellos. Especialmente a mis tutores Dr. Héctor Scannone y Dra. Alba M. Vargas.

A Jerry Van Der Dyjs, Elimar Rivero, Claudia Hernández, Máximo Giménez, Gladys Venegas, Ivonne León y Lina Chinchin quienes en su momento se convirtieron en esas ventanitas que me presentó Díos para continuar adelante.

ÍNDICE GENERAL

Agradecimientos	v
Índice de figuras	viii
Índice de gráficas	ix
Índice de tablas	xii
Resumen	xiii

CAPÍTULO

I

Introducción.....	1
Composición y toxicidad de los venenos botrópicos	8
Características del envenenamiento botrópico	12
Hemorragia	14
Incoagulabilidad sanguínea	20
Edema	34
Necrosis	36
Insuficiencia renal.....	39
Antiveneno.....	41
Objetivos.....	47

II

Materiales y métodos	50
Animales.....	50
Veneno	50
Fracciones liofilizadas.....	50
Metodología.....	52
Análisis de los datos.....	63

III

Resultados	64
Estudio toxinológico y clínico del veneno total de <i>Bothrops colombiensis</i>	64
Fraccionamiento del veneno total de <i>Bothrops colombiensis</i>	76
Electroforesis del veneno total de <i>Bothrops colombiensis</i> y sus fracciones	78
Evaluación histopatológica del veneno total de <i>Bothrops colombiensis</i>	81
Estudio toxinológico y clínico de las fracciones	83
Caracterización Toxinológica	83
Fracción I	83
Fracción II.....	97
Fracción III.....	113
Caracterización clínica de la Fracción I	89
Evaluación histopatológica de los efectos inducidos por la Fracción I	95
Caracterización clínica de la Fracción II.....	104
Evaluación histopatológica de los efectos inducidos por la Fracción II	111
Caracterización clínica de la Fracción III.....	119
Evaluación histopatológica de los efectos inducidos por la Fracción III.....	126
IV	
Discusión.....	128
V	
Conclusiones y recomendaciones	193
Bibliografía.....	197
Anexos	209

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1	Distribución geográfica de la especie <i>Bothrops colombiensis</i> en Venezuela.....	5
Figura 2	Algunas características primarias de las serpientes del género <i>Bothrops</i>	6
Figura 3	Imagen <i>Bothrops colombiensis</i>	7
Figura 4	Puntos de interferencia de diversos constituyentes de los venenos botrópicos en el sistema hemostático.....	24
Figura 5	Localización de la Región de Paracotos en el mapa del estado Miranda.....	51
Figura 6	Actividad edematizante del veneno de <i>Bothrops colombiensis</i> de Paracotos (Edo. Miranda).	67
Figura 7	Perfil electroforético (SDS-PAGE) del veneno total y fracciones de la serpiente <i>Bothrops colombiensis</i> de la región de Paracotos (Edo. Miranda).....	80
Figura 8	Aspecto de las lesiones hemorrágicas inducidas por la Fracción I en ratones cepa INH.....	85
Figura 9	Lesiones desarrolladas por la inyección IM de 100 µg de la Fracción I a ratones.....	88
Figura 10	Aspecto de las lesiones hemorrágicas inducidas por la Fracción II en ratones cepa INH.....	99
Figura 11	Aspecto de la región plantar de ratones cepa INH tratados con la Fracción II del veneno de <i>B. colombiensis</i> para la evaluación de la actividad edematizante.	101
Figura 12	Lesiones desarrolladas por la inyección IM de 50 µg de la Fracción II a ratones.....	103
Figura 13	Aspecto de las lesiones hemorrágicas inducidas por la Fracción III en ratones cepa INH.....	115
Figura 14	Perfil electroforético (SDS-PAGE) del veneno total y fracciones de la serpiente <i>Bothrops colombiensis</i> de la región de Paracotos (Edo. Miranda) empleando inhibidores de proteasas.....	160

ÍNDICE DE GRÁFICAS

Gráfica 1	Determinación de la dosis hemorrágica mínima del veneno total de <i>Bothrops colombiensis</i> de Paracotos (Edo. Miranda).....	66
Gráfica 2	Determinación de la actividad edematizante del veneno total de <i>Bothrops colombiensis</i> de Paracotos (Edo. Miranda)	67
Gráfica 3	Evaluación de la actividad necrosante del veneno total de <i>Bothrops colombiensis</i> de Paracotos (Edo. Miranda).....	68
Gráfica 4	Determinación de la actividad de la enzima AST/SGOT en suero de ratones tratados con veneno total de <i>Bothrops colombiensis</i>	71
Gráfica 5	Determinación de la actividad de la enzima ALT/SGPT en suero de ratones tratados con veneno total de <i>Bothrops colombiensis</i>	72
Gráfica 6	Determinación de creatinina en suero de ratones tratados con veneno total de <i>Bothrops colombiensis</i>	73
Gráfica 7	Determinación de urea (BUN) en suero de ratones tratados con veneno total de <i>Bothrops colombiensis</i>	74
Gráfica 8	Determinación de glicemia en suero de ratones tratados con veneno total de <i>Bothrops colombiensis</i>	75
Gráfico 9	Determinación de amilasa en suero de ratones tratados con veneno total de <i>Bothrops colombiensis</i>	76
Gráfica 10	Perfil de fraccionamiento del veneno total de <i>Bothrops colombiensis</i> de Paracotos en Sephadex G-100	78
Gráfica 11	Determinación de la dosis hemorrágica mínima de la Fracción I del veneno de <i>Bothrops colombiensis</i> de Paracotos (Edo. Miranda).....	84
Gráfica 12	Determinación de la actividad edematizante de la Fracción I del veneno de <i>Bothrops colombiensis</i> de Paracotos (Edo. Miranda)	87
Gráfica 13	Determinación de la actividad necrosante de la Fracción I del veneno de <i>Bothrops colombiensis</i> de Paracotos (Edo. Miranda)	88
Gráfica 14	Determinación de la actividad de la enzima AST/SGOT en suero de ratones tratados con la Fracción I del veneno de <i>Bothrops colombiensis</i>	90
Gráfica 15	Determinación de la actividad de la enzima ALT/SGPT en suero de ratones tratados con la Fracción I del veneno de <i>Bothrops colombiensis</i>	91

Grafica 16	Determinación de creatinina en suero de ratones tratados con la Fracción I del veneno de <i>Bothrops colombiensis</i>	92
Gráfica 17	Determinación de urea (BUN) en suero de ratones tratados con la Fracción I del veneno de de <i>Bothrops colombiensis</i>	93
Gráfica 18	Determinación de glicemia en suero de ratones tratados con la Fracción I del veneno de <i>Bothrops colombiensis</i>	94
Gráfica 19	Determinación de amilasa en suero de ratones tratados con la Fracción I del veneno de <i>Bothrops colombiensis</i>	95
Grafica 20	Determinación de la actividad edematizante de la FII del veneno de <i>Bothrops colombiensis</i> de Paracotos (Edo. Miranda).....	100
Gráfica 21	Determinación de la actividad necrosante de la Fracción II del veneno de <i>Bothrops colombiensis</i> de Paracotos (Edo. Miranda)	102
Gráfica 22	Determinación de la actividad de la enzima AST/SGOT en suero de ratones tratados con la Fracción II del veneno de <i>Bothrops colombiensis</i>	106
Gráfica 23	Determinación de la actividad de la enzima ALT/SGPT en suero de ratones tratados con la Fracción II del veneno de <i>Bothrops colombiensis</i>	107
Gráfica 24	Determinación de creatinina en suero de ratones tratados con la Fracción II del veneno de <i>Bothrops colombiensis</i>	108
Gráfica 25	Determinación de urea (BUN) en suero de ratones tratados con la Fracción II del veneno de <i>Bothrops colombiensis</i>	109
Gráfica 26	Determinación de glicemia en suero de ratones tratados con Fracción II del veneno de <i>Bothrops colombiensis</i>	110
Gráfica 27	Determinación de amilasa en suero de ratones tratados con Fracción II del veneno de <i>Bothrops colombiensis</i>	111
Gráfica 28	Determinación de la dosis hemorrágica mínima de la Fracción III del veneno de <i>Bothrops colombiensis</i> de Paracotos (Edo. Miranda)	115
Gráfica 29	Determinación de la dosis edematizante mínima de la Fracción III del veneno de <i>Bothrops colombiensis</i> de Paracotos (Edo. Miranda)	116
Gráfica 30	Evaluación de la actividad necrosante de la Fracción III del veneno de <i>Bothrops colombiensis</i> de Paracotos (Edo. Miranda).....	118
Gráfica 31	Determinación de la actividad de la enzima AST/SGOT en suero de ratones tratados con la Fracción III del veneno de <i>Bothrops colombiensis</i>	119

Gráfica 32	Determinación de la actividad de la enzima ALT/SGPT en suero de ratones tratados con la Fracción III del veneno de <i>Bothrops colombiensis</i>	121
Gráfica 33	Determinación de creatinina en suero de ratones tratados con la Fracción III del veneno de <i>Bothrops colombiensis</i>	122
Gráfica 34	Determinación de urea (BUN) en suero de ratones tratados con la Fracción III del veneno de <i>Bothrops colombiensis</i>	124
Gráfica 35	Determinación de glicemia en suero de ratones tratados con la Fracción III del veneno de <i>Bothrops colombiensis</i>	124
Gráfica 36	Determinación de amilasa en suero de ratones tratados con la Fracción III del veneno de <i>Bothrops colombiensis</i>	125
Gráfica 37	Representación esquemática de la distribución de AST y ALT en tejidos	145

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1	Cantidad de veneno que son capaces de inocular las principales serpientes venenosas de Venezuela.....	3
Tabla 2	Actividad Coagulante Específica de Diferentes Venenos Botrópicos	26
Tabla 3	Caracterización toxicológica del veneno total de <i>Bothrops colombiensis</i> de Paracotos-Edo. Miranda.....	64
Tabla 4	Determinación de la actividad desfibrinante del veneno total de <i>Bothrops colombiensis</i> de Paracotos (Edo. Miranda)	69
Tabla 5	Determinación de la actividad coagulante del veneno total de <i>Bothrops colombiensis</i> de Paracotos (Edo. Miranda)	70
Tabla 6	Lesiones inducidas por el veneno de <i>Bothrops colombiensis</i> en ratón blanco cepa INH.....	81
Tabla 7	Caracterización toxinológica de las fracciones obtenidas por cromatografía de exclusión molecular, del veneno de <i>Bothrops colombiensis</i> de Paracotos-Edo. Miranda	83
Tabla 8	Determinación de la actividad desfibrinante de la Fracción I de veneno de <i>Bothrops colombiensis</i> de Paracotos (Edo. Miranda)	85
Tabla 9	Determinación de la actividad coagulante de la Fracción I del veneno de <i>Bothrops colombiensis</i> de Paracotos (Edo. Miranda)	89
Tabla 10	Lesiones inducidas por la Fracción I del veneno de <i>Bothrops colombiensis</i> en ratón blanco cepa INH.....	96
Tabla 11	Determinación de la actividad desfibrinante de la Fracción II de veneno de <i>Bothrops colombiensis</i> de Paracotos (Edo. Miranda)	99
Tabla 12	Determinación de la actividad coagulante de la Fracción II del veneno de <i>Bothrops colombiensis</i> de Paracotos (Edo. Miranda)	104
Tabla 13	Lesiones inducidas por la Fracción II del veneno de <i>Bothrops colombiensis</i> en ratón blanco cepa INH.....	111
Tabla 14	Determinación de la actividad coagulante de la Fracción III del veneno de <i>Bothrops colombiensis</i> de Paracotos (Edo. Miranda)	118
Tabla 15	Lesiones inducidas por la Fracción III del veneno de <i>Bothrops colombiensis</i> en ratón blanco cepa INH.....	126
Tabla 16	Comparación de las actividades biológicas del veneno de <i>B. colombiensis</i> (Paracotos) con reportes previos para serpientes botrópicas.....	130

Resumen

Bothrops colombiensis es una de las serpientes responsable del 85% de los accidentes ofídicos reportados anualmente. Induce un cuadro clínico caracterizado por edema, necrosis, coagulopatias y hemorragias locales y sistémicas, sin embargo las alteraciones sistémicas desarrolladas por este veneno no han sido puntualmente evaluadas, por lo que se planteó caracterizar el veneno total de *Bothrops colombiensis* y sus fracciones obtenidas por exclusión molecular, por la evaluación de: 1) sus actividades letal, edematizante, coagulante, desfibrinante, hemorrágica, necrosante y fosfolipasa A₂ (PLA₂), 2) su compromiso fisiopatológico sobre órganos vitales en ratones y 3) la alteración de los marcadores séricos CPK, AST, ALT, BUN, creatinina, glicemia y amilasa. Para la caracterización toxinológica se emplearon los métodos *in vivo* recomendados por la OMS, utilizando ratones blancos. En la determinación de las actividades coagulante y PLA₂ se emplearon los métodos de Furukawa (1977) y de De Hass modificado por Yang and King (1980), respectivamente. Los efectos fisiopatológicos en riñón, hígado, corazón, pulmón, páncreas y músculo esquelético y las variaciones en marcadores de lesión tisular en ratones tratados con dosis única del veneno y las fracciones, se evaluaron en muestras recolectadas a diferentes lapsos post inoculación por vía IM, empleando técnicas de microscopía de luz y espectrofotométricas. Los resultados obtenidos, mostraron que el veneno indujo un perfil toxinológico similar al de otras especies botrópicas. Se obtuvieron tres fracciones viables FI, FII y FIII, todas indujeron actividad hemorrágica y edematizante, la FI y la FII mostraron actividad desfibrinante, coagulante y un severo cuadro neurotóxico, nunca antes descrito en esta especie y sólo la FIII presentó actividad PLA₂. Los estudios histopatológicos mostraron que el veneno desarrolló lesiones en músculo esquelético, corazón y riñón, con incrementos de AST, ALT, CPK, BUN y amilasa. La FI y la FII indujeron lesiones en músculo esquelético, corazón y páncreas, con incrementos de CPK, AST, ALT y BUN, en cuanto a los marcadores pancreáticos la FI incrementó la amilasa y la FII la glicemia. La FIII indujo lesiones en corazón y páncreas, de acuerdo a la histopatología e incrementos de CPK, AST, ALT y amilasa. Evidenciando una serie de alteraciones fisiopatológicas en diversos órganos vitales, que reflejan el compromiso sistémico de los constituyentes presentes en el veneno evaluado y sugieren la necesidad de una oportuna y efectiva intervención médica.

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

En Venezuela existe una herpetofauna abundante, ampliamente distribuida en todos los ambientes del país, la cual incluye un elevado número de serpientes que abarcan ocho familias, entre estas *Anomalepididae*, *Leptotyphlopidae*, *Typhlopidae*, *Aniliidae*, *Boidae*, *Colubridae*, *Elapidae* o *Micruridae* y *Viperidae* o *Crotalidae*, con aproximadamente ciento cincuenta especies de las cuales sólo veinticinco son venenosas. (Navarrete, 2002; Lión y col., 2004).

Desde el punto de vista médico, las especies de mayor interés son aquellas pertenecientes a las familias *Elapidae* o *Micruridae* y *Viperidae* o *Crotalidae*, las cuales agrupan las serpientes venenosas responsables de los 7000 accidentes reportados anualmente en nuestro país, siendo las principales especies implicadas *Bothrops atrox*, *Bothrops colombiensis*, *Bothrops venezuelensis* y *Crotalus durissus* (Gutiérrez, 2011).

La familia *Elapidae* o *Micruridae*, agrupa las conocidas serpientes de coral de las cuales se reconocen unas once especies en Venezuela, en el envenenamiento por mordedura de estas serpientes se desarrolla un cuadro caracterizado por la afectación a nivel del sistema nervioso de la víctima, lo cual implica el desarrollo de facies miasténicas con ptosis palpebral bilateral, oftalmoplejia, parálisis velopalatina, parálisis de los músculos respiratorios y parálisis flácida de los miembros; la

gravedad de este cuadro clínico explica por qué las corales venenosas son reconocidas como una de las especies más peligrosas, pero afortunadamente la mayoría de ellas son serpientes poco agresivas y huidizas por lo que los accidentes provocados por esta especie son muy raros. Se considera que representan alrededor del 0,5 % de los accidentes ofídicos reportados y obedecen básicamente a incidentes donde las víctimas fueron mordidas al manipular la serpiente jugando con ella, por considerarla inofensiva (Rodríguez-Acosta y cols, 1995).

En cuanto a la familia *Viperidae* o *Crotalidae*, en nuestro país se describen los géneros *Lachesis*, *Crotalus* y *Bothrops* (cuaimas, cascabeles y mapanares respectivamente). Aunque recientemente este último género, fue dividido de acuerdo a una nueva nomenclatura que lo separa en cuatro géneros que incluyen *Porthidium*, *Bothriechis*, *Bothriopsis* y *Bothrops*. (Rodríguez-Acosta y col., 1995; Lión y col., 2004; <http://serpientesdevenezuela.ucv.ve>), los cuales incluyen especímenes cuyos venenos son reconocidos como mucho menos tóxicos que los de las serpientes de coral, por carecer aparentemente de efecto neurotóxico; sin embargo, es importante considerar que la cantidad de veneno inoculado por mordida es mucho mayor (Tabla 1), además de ser en la mayoría de los casos serpientes muy agresivas (Lancini, 1986), aspectos que le confieren importancia médica a los accidentes causados por estos venenos.

Tabla 1

Cantidad de veneno que son capaces de inocular las principales serpientes venenosas de Venezuela.

ESPECIE	CANTIDAD DE VENENO (mg)		
	Mínimo	Media	Máximo
<i>Micrurus isozonus</i>	5	10	20-25
<i>Crotalus durissus cumanensis</i>	25	100	178
<i>Crotalus vegrandis</i>	5	7	20
<i>Bothrops colombiensis</i>	25	107	680
<i>Bothrops atrox</i>	20	150	360
<i>Lachesis muta muta</i>	-	450	760

Tomado de Lancini, A. 1986

Con base en la actividad de los venenos de las especies de la familia *Viperidae* o *Crotalidae*, se considera a las serpientes del género *Crotalus* (cascabeles) como las más peligrosas, ya que estas inducen un complicado cuadro clínico caracterizado por una fase neurológica predominante que implica facies miasténicas con ptosis palpebral bilateral, oftalmoplejia, parálisis velopalatina y de los músculos respiratorios que puede llevar a la muerte por asfixia y es responsable de una elevada mortalidad en las víctimas de este accidente. Esto ha sido resaltado en estudios epidemiológicos realizados en Brasil y Venezuela, los cuales señalan una elevada mortalidad por la mordedura de estas serpientes, la cual alcanza cerca de un 72 % sin tratamiento y alrededor del 10 % aún con dosificación de suero antiofídico polivalente; sin embargo los accidentes por estas serpientes no son tan frecuentes. En Venezuela, la incidencia de accidentes por este género es de aproximadamente el 15 % de los casos reportados, lo cual se ha atribuido a que son especies poco agresivas que al ser molestadas denotan su presencia con un ruido característico emitido por un

apéndice córneo (cascabel) ubicado en la punta de la cola de las serpientes (Lancini, 1986; Rodríguez-Acosta y col., 1995).

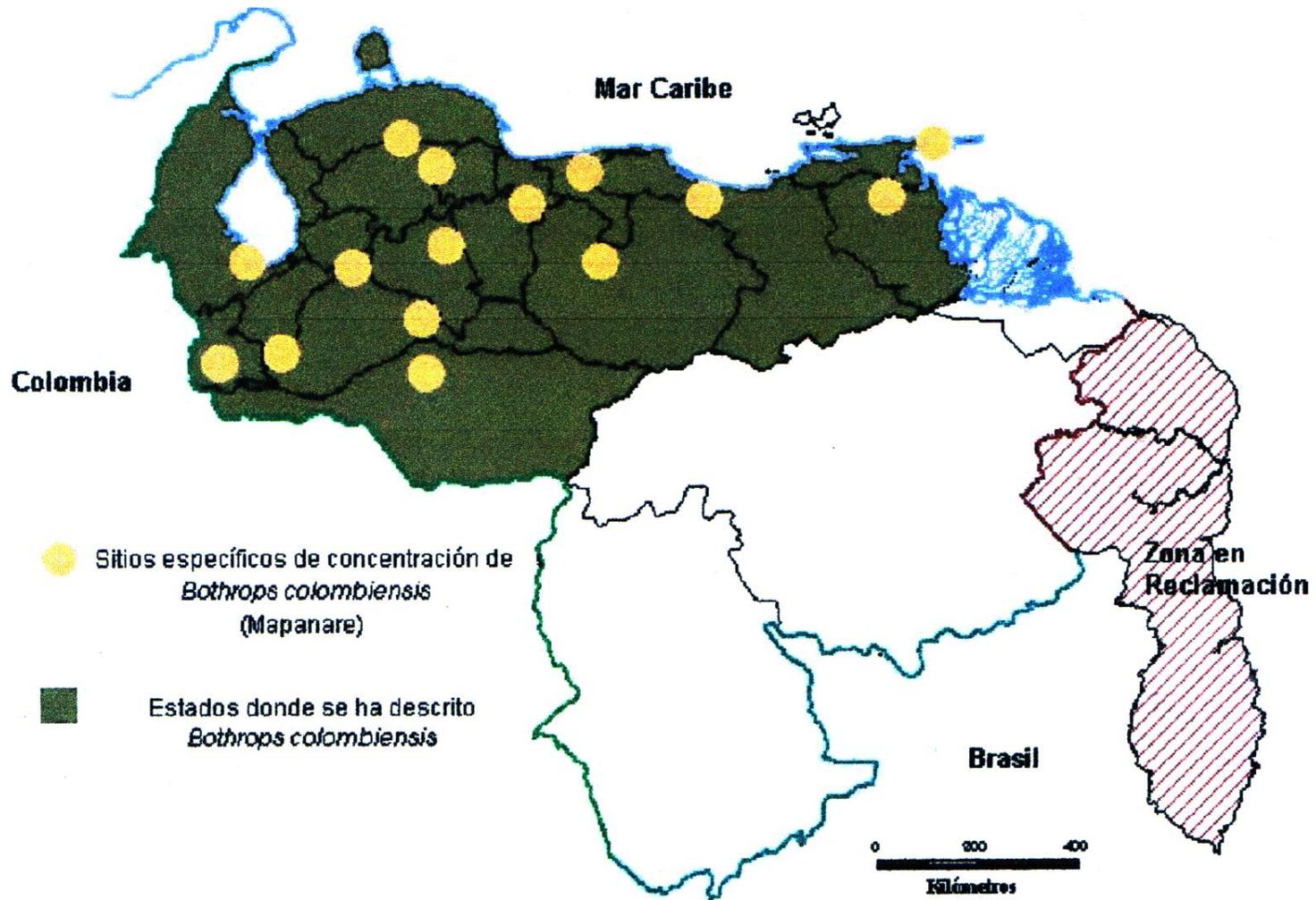
En nuestro país el mayor número de accidentes es causado por serpientes del antiguo género *Bothrops*, de hecho diferentes estudios epidemiológicos refieren una incidencia de alrededor del 80 % de los casos reportados (Colimodio y Aguilar, 1993; Rodríguez-Acosta y col., 1995; Rengifo, 2002; Caraballo y col., 2004; Lión y col., 2004), lo que se ha relacionado a la gran agresividad de estas serpientes y su muy amplia distribución geográfica, la cual incluye como zonas endémicas las áreas tropicales y subtropicales principalmente aquellas representadas por bosques húmedos del piso tropical y subtropical, piedemontes, márgenes de ríos y quebradas (Rodríguez-Acosta y col., 1995; Rengifo, 2002).

Dentro de este género diferentes investigadores señalan como una de las serpientes predominantes en nuestro país a *Bothrops colombiensis*, especie que cuenta con una muy amplia distribución en el territorio nacional, abarcando todo el oriente, centro, occidente y algunas regiones del sur del país, desde el nivel del mar hasta unos 2.500 metros de altura (Lancini, 1986; Rodríguez-Acosta y col., 2003; Lión y col., 2004). (Figura 1).

Bothrops colombiensis es conocida popularmente en Venezuela como macagua, guayacán o mapanare, esta serpiente fue descrita por Lancini (1986) como una especie sumamente agresiva y rápida en el ataque, la que puede alcanzar a medir

Figura 1

Distribución geográfica de la especie *Bothrops colombiensis* en Venezuela



Tomado de www.serpientesdevenezuela.ucv.ve

hasta 1,80 metros de longitud. Esta especie presenta básicamente hábitos nocturnos, se alimenta principalmente de roedores y se caracteriza, como todas las serpientes de la familia *Viperidae*, por: a) presentar un órgano termo receptor o foseta loreal que corresponde a un orificio situado entre las narinas y el ojo de la serpiente por lo que son conocidas popularmente como cuatro narices, b) por su imponente dentición solenoglifa (figura 2) constituida por dos colmillos retráctiles e inoculadores de veneno localizados en la parte anterior del maxilar superior y c) por sus colores opacos, en el caso de los *Bothrops* estas presentan un fondo de coloración variable que puede ser pardo negruzco o gris claro en la parte superior de la cabeza, mientras que el cuerpo y la cola presenta una coloración oscura y brillante con 17 a 23 dibujos triangulares dorso-laterales en forma de sierra o trapezoidales (figura 3), con una banda negra detrás de los ojos que no se ensancha mucho, el vientre es de color cremoso y poco o muy manchado de gris o negruzco. En el caso de los ejemplares juveniles las coloraciones son de un tono más claro que los adultos con la punta de la cola amarilla o anaranjada clara.

Figura 2
Algunas características primarias de las serpientes del género *Bothrops*



(A) Foseta termorreptora loreal de una *Bothrops*

(B) Cráneo de serpiente venenosa solenoglifa.

Tomado de www.une.edu.ve/salud/mapanare

Esta serpiente ha sido repetidamente citada como una de las especies venenosas más peligrosa que habita en Venezuela, ya que sumado a su agresividad, imponente tamaño e importante distribución en zonas pobladas del territorio nacional, posee un poderoso veneno hemotóxico y necrosante que aunque es menos potente que el de los géneros *Micrurus* y *Crotalus* puede causar la muerte o dejar secuelas graves e incluso permanentes en la víctima, si estos accidentes no son efectiva y oportunamente tratados (Lancini, 1986; Rodríguez-Acosta y col., 1995; Rengifo, 2002).

Figura 3
Bothrops colombiensis



Tomado de aquaterraria.com

COMPOSICIÓN Y TOXICIDAD DE LOS VENENOS BOTRÓPICOS

Los venenos de serpientes son agentes altamente tóxicos, los cuales se han descrito como secreciones viscosas blancas, amarillas, incoloras o anaranjadas producidas por glándulas exocrinas modificadas, localizadas a los lados de la cabeza de algunas serpientes. Estas secreciones son inoculadas a las víctimas por medio de un aparato especializado, que comprende un par de colmillos modificados los cuales permiten la inyección del veneno bajo la presión en los tejidos (Rosenfeld, 1971; Chippaux and Goyffon, 1998).

La composición de estos venenos es muy compleja, con base en numerosos estudios experimentales se ha establecido que la mayoría del veneno crudo está compuesto básicamente de proteínas, las cuales representan alrededor de 90-95 % del peso seco del veneno, mientras que el 5 a 10 % restante corresponde a una mezcla heterogénea de compuestos orgánicos e inorgánicos que incluyen:

- 1) Compuestos orgánicos como carbohidratos (principalmente bajo la forma de glicoproteínas), nucleósidos, aminas biógenas, niveles muy bajo de amino ácidos libres y lípidos (fosfolípidos) y péptidos como las conocidas desintegrinas a las que se les reconoce actividad biológica. (Rosenfeld, 1971)
- 2) Compuestos inorgánicos constituidos básicamente por cationes metálicos como calcio, cobre, hierro, potasio, magnesio, manganeso, sodio, fósforo, cobalto y zinc. No todos estos metales son hallados en cada tipo de veneno, además de que la cantidad de cada metal varía con la especie evaluada. Su rol biológico no se ha

dilucidado completamente, sin embargo se ha propuesto que alguno de estos son importantes para la estabilización de la estructura de las proteínas del veneno, además de estar involucrados en el mecanismo de catálisis de ciertas reacciones enzimáticas (como el calcio requerido para la actividad biológica de algunas enzimas tipo fosfolipasas A₂ o el zinc para algunas metaloproteasas) (Rosenfeld, 1971; Bjarnason and Fox, 1988-1989).

Las fracciones proteicas de los venenos son consideradas fisiopatologicamente más importantes que las no proteicas, ya que la primera presenta una gran variedad de actividades enzimáticas que hace los venenos biológicamente activos y cuya función principal en dichas secreciones es matar o inmovilizar a la presa que le servirá de alimento, además de asistir en la digestión de la misma, ya que estos animales no mastican su comida, sino que por el contrario la ingieren en una sola pieza y por supuesto son también reconocidas por ejercer, en algunos casos, un rol importante en la autodefensa de las serpientes (Tu, 1977; Chippaux y col., 1991).

Entre las diversas actividades enzimáticas presentes en la fracción proteica de los venenos botrópicos se ha descrito la presencia de fosfolipasas A₂, fosfodiesterasas, fosfatasas, fosfomonoesterasas, exonucleasas, L amino ácido oxidasas, enzimas proteolíticas de las serinas proteinasas y clase metaloproteinasas, arginina esterasas, 5' nucleotidasas, hialuronidasas y NAD nucleotidasas, en su mayoría enzimas hidrolíticas con la notable excepción de la L amino ácido oxidasas la cual causa la desaminación oxidativa de amino ácidos (Scannone and Grillo, 1979; Ruiz y col., 1993; Markland, 1998a; Izidoro y col., 2006). No todas estas enzimas están presentes en todos los venenos, esto ha sido

establecido en numerosas evaluaciones experimentales, las cuales sugieren diferencias en la composición de los venenos tanto en concentración como en la constitución bioquímica de sus diversos constituyentes. (Chippaux and Goyffon, 1998).

Esto se evidencia en una de las evaluaciones desarrollada por Jiménez-Porras en la década de los años 60, la cual se considera uno de los trabajos pioneros en el área de la variabilidad geográfica, relacionada específicamente a los venenos botrópicos de Costa Rica. En este estudio se observó por medio de técnicas electroforéticas, la existencia de marcadas diferencias en la composición de los venenos de diferentes poblaciones de *Bothrops atrox* (hoy *Bothrops asper*) y *Bothrops munnifer* (hoy *Atropoides nummifer*). Adicionalmente en el caso específico de *Bothrops atrox* el autor reportó relevantes consistencias en los perfiles electroforéticos de los venenos dentro de una misma área geográfica, así como importantes variaciones en los modelos electroforéticos en los venenos de dicha especie al ampliar su distribución geográfica, variaciones que incluso le permitían identificar la zona de captura o de localización geográfica de las serpientes evaluadas (Jiménez –Porras, 1964; Chippaux y col., 1991).

En nuestro país diversas evaluaciones experimentales, también han evidenciado estas variaciones en la composición de los venenos de acuerdo a la localización geográfica de la especie, entre estas Vargas y cols. (1996) reportaron importantes variaciones en los perfiles electroforéticos, así como en diferentes actividades tóxicas y enzimáticas, de venenos de ejemplares de la especie *Bothrops atrox* recolectados en las localidades de Puerto Ayacucho (Edo. Amazonas) y El Paují (Edo. Bolívar).

A estas importantes variaciones poblacionales, se suma una interesante variación ontogénica en la bioquímica y la farmacología de los venenos, a este respecto se acumulan una gran variedad de ejemplos en la literatura científica, entre estos Meier y col. (1986) estudiaron las variaciones individuales y edad dependientes en los venenos de 23 especímenes de *B. atrox* de la localidad de Maranhão en Brasil, reportando una disminución edad dependiente en el total de bandas proteicas, concluyendo que estas diferencias individuales en la composición de los venenos es una característica inherente de los mismos como una consecuencia de las edad de las serpientes.

Estas diferencias en la composición de los venenos, obviamente dependiendo de su magnitud e implicaciones bioquímicas, puede tener repercusiones en el cuadro fisiopatológico que puede presentarse en la víctima del envenenamiento ofídico, entre los ejemplos más llamativos se puede citar el de la cascabel centroamericana *Crotalus durissus durissus* cuyos ejemplares recién nacidos tienen un veneno con fuertes acciones neurotóxicas, similares al veneno de la subespecie suramericana, en tanto los ejemplares adultos presentan un veneno de acción local y hemorrágica, sin neurotoxicidad evidente (Gutiérrez, 2002). Estos aspectos también se han resaltado en el caso de diferentes venenos botrópicos, entre estos se ha descrito que personas mordidas por especímenes jóvenes de *B. jararaca* desarrollan incoagulabilidad sanguínea más frecuentemente que aquellos individuos mordidos por especímenes adultos. En nuestro país especialistas del Hospital Dr. Leopoldo Manrique Terrero (Hospital de Coche), tras la evaluación de numerosos accidentes botrópicos, refieren que los venenos de las serpientes recién nacidas y juveniles (por debajo de los 40 cm. de longitud) tienen poca actividad proteolítica, sólo evidenciándose en el sitio de la inoculación discretos signos locales (sólo edema y eritema

periférico). (Rengifo, 2002). Sin embargo, a pesar de estas importantes variaciones, consecuencia principalmente de las diferencias en la composición de los venenos y otros factores como profundidad de la mordida, cantidad de veneno inoculado, condiciones de salud de la víctima, tipo de primeros auxilios recibidos y sitio anatómico de la mordedura, se ha reportado que la secuencia de síntomas tras el envenenamiento es muy similar para la mayoría de los pacientes envenenados por serpientes del género *Bothrops*. (Badillo y col., 1989; Gutiérrez y col., 1996; Rengifo, 2002)

Características del envenenamiento botrópico

La mordedura por cualquiera de las serpientes de este género produce un complejo cuadro clínico, en estos casos la primera manifestación en evidenciarse en la víctima es un dolor intenso y pulsátil, en el sitio de la mordedura el cual ha sido comparado con una sensación de quemadura. Paralelamente entre 5-15 minutos posteriores al envenenamiento se comienza a evidenciar un edema con cianosis, el cual progresa con rapidez por la extremidad afectada durante las primeras tres horas. Luego de este tiempo hay manifestaciones de peso local en los miembros, con imposibilidad de movilizarlos por artralgia o dolor en las articulaciones. En la región donde penetraron los colmillos en la piel (impronta), durante la fase inicial, hay sangramiento que se detiene espontáneamente, pero a partir de los treinta minutos se alteran los mecanismos de coagulación apareciendo hemorragia en forma de goteo continuo o finos hilos de sangre por los orificios de la impronta, en casos graves puede haber sangramiento espontáneo por las encías, mucosa nasal y digestiva con hematemesis y en casos donde no se ha recibido tratamiento en tres o cuatro horas o cuando el contenido de veneno es alto pueden aparecer flictenas de tamaño

variable, primero en la zona de la mordedura y luego en el resto de la extremidad (sobre todo en los pliegues de flexión) y linfadenitis o cordones enrojecidos que recorren longitudinalmente al miembro afectado, lo cual empeora el cuadro doloroso siendo de difícil manejo con analgésicos corrientes. Adicionalmente las flictenas pueden romperse con facilidad si se manipulan, dejando al descubierto zonas extensas de piel que fácilmente se infectan. Los diferentes mecanismos que alteran las funciones normales progresan y aparecen equimosis a cierta distancia de la región mordida, necrosis y manifestaciones de intoxicación general que implican alteraciones de la función renal, hepática y elevación de la temperatura. La muerte puede ocurrir entre uno y doce días por hemorragia intravascular diseminada, hemorragia cerebral o por insuficiencia renal aguda. (Badillo y col., 1989; Rengifo, 2002).

Este cuadro puede ser particularmente agravado en casos donde al paciente se le aplique un torniquete por encima de la mordedura, lo cual crea mayor éxtasis sanguíneo empeorando el edema y la necrosis, así como con el uso de sustancias irritantes sobre el lugar de la mordedura como gasolina o kerosén entre otros, los que agravan la lesión inicial, generalmente complicándola con infecciones secundarias, produciendo úlceras que pueden llegar a músculos y tendones, dejando una herida de difícil cicatrización, resultando en deformidad por lo que muchas veces es necesario recurrir a la amputación del miembro (Rengifo, 2002).

Como se evidencia, el accidente botrópico se caracteriza por el desarrollo de daños locales rápidos y prominentes que incluyen: hemorragia, edema y necrosis; seguidos de alteraciones sistémicas entre las que se encuentran: hemorragias, coagulopatías, choque

cardiovascular e insuficiencia renal aguda (Rodríguez-Acosta y col., 2000; Gutiérrez, 2002), los cuales son una consecuencia del efecto aditivo o sinergista del complejo cóctel con actividad biológica presente en los venenos.

HEMORRAGIA

La hemorragia es una de los efectos más comunes del envenenamiento por serpientes de la familia *Viperidae*, la cual se define como el escape continuo de plasma y células rojas de los vasos sanguíneos hacia los tejidos circundantes como una consecuencia de la permeabilidad capilar alterada. En el caso de los venenos botrópicos esta alteración fisiopatológica es producida por la acción de una variedad de enzimas presentes en estos venenos, las cuales son conocidas como factores, principios hemorrágicos o hemorraginas. Este grupo consiste casi completamente de metaloproteinasas dependientes de zinc, cuyo tamaño o peso molecular varía entre 20 y 100 kilo daltons (kDa), las cuales son reconocidas como miembros de la subfamilia M12 de metaloproteinasas, también conocidas como Reprolisinas y se clasifican con base en su masa molecular en tres grupos que incluyen:

- Clase PI: la cual abarca las hemorraginas pequeñas, con peso molecular (PM) de 20 a 30 kDa y que se caracterizan por presentar únicamente el dominio catalítico metaloproteinasas, el cual presenta una secuencia responsable de la unión al ión zinc. Estas metaloproteinasas son consideradas factores débilmente hemorrágicos, los cuales presentan adicionalmente actividad fibrinolítica/fibrinogenolítica, actividad enzimática que puede potenciar el desarrollo de hemorragias mediado por estos venenos.

- Clase PII: este grupo incluye las enzimas de tamaño medio, las cuales tienen un PM entre 30 y 50 kDa y presentan dos dominios, el metaloproteínasa mencionado anteriormente y un dominio tipo desintegrina. Este último dominio de manera general, le confiere a las metaloproteinasas la capacidad de reconocer receptores de la familia de las integrinas en las membranas de las plaquetas y de otros tipos celulares, afectando en consecuencia la agregación plaquetaria y la adhesión de otras células a sustratos de la matriz celular. Se ha propuesto que la presencia de este dominio adicional es el responsable de la mayor actividad hemorrágica que caracteriza a estas metaloproteinasas cuando se les compara con la clase PI. En la mayoría de los casos estas sufren proteólisis, para producir las desintegrinas no enzimáticas, las cuales presentan fuerte actividad inhibitoria de la agregación plaquetaria.
- Clase PIII: esta clase incluye metaloproteinasas que son frecuentemente reconocidas como las más potentes toxinas hemorrágicas de los venenos botrópicos, entre éstas se puede mencionar la Jararhagina aislada de *B. jararaca* (Brasil), la cual presenta adicionalmente actividad fibrinogenolítica. Estas enzimas presentan un PM de 50 a 100 kDa y tienen además de los dos dominios mencionados anteriormente, un tercer dominio rico en cisteína el cual se ha correlacionado con la mayor expresión de la actividad hemorrágica de estas proteínas. Diferentes evaluaciones han evidenciado un rol funcional a este dominio rico en cisteína, el cual se fundamenta en la interacción de dicho dominio con el receptor de colágeno $\alpha_2\beta_1$ localizado en la superficie de las plaquetas, el bloqueo del factor de von Willebrand, aspectos que interfieren con los mecanismos hemostáticos. Además de constituir un anclaje para

la enzima al colágeno tipo IV en la matriz extracelular, permitiendo en consecuencia la ruptura localizada del colágeno, es decir que este dominio permite dirigir la proteinasa a componentes específicos de la matriz extracelular para posteriormente dar lugar al clivaje proteolítico. Esta última clase es sub-dividida con base en sus distintas modificaciones post-translacionales en tres subclases P-IIIa/b, P-IIIc y P-IIId, esta última sub-clase ahora agrupa las anteriormente reconocida Clase PIV, las cual incluía las toxinas hemorrágicas menos tóxicas, con un PM entre 80 y 100 kDa, las cuales se caracterizan por la presencia en sus moléculas de los dominios metaloproteinasa, el tipo desintegrina, el rico en cisterna y el dominio lectina. (Bjarnason and Fox, 1988-89; Gutiérrez and Rucavado, 2000; Petrestski y col., 2000b; Gutiérrez, 2002; Isla y col., 2003; Serrano y col., 2006; Moura y col., 2008; Kang y col., 2011).

El efecto de estas enzimas sobre los vasos sanguíneos ha sido extensivamente estudiado a nivel ultraestructural, sin embargo el mecanismo de acción implicado no está totalmente dilucidado. En estos diferentes estudios se ha observado que estas enzimas son capaces de hidrolizar algunas proteínas como fibronectina, colágeno tipo IV, nidógeno, laminina y proteoglican, componentes estructurales de la membrana basal y de la matriz extracelular que rodea las células endoteliales de los vasos capilares y las vénulas. A consecuencia de esta hidrólisis las células endoteliales se ven afectadas, desarrollando una serie de vesículas y reduciendo su grosor, hasta el punto en que su integridad se interrumpe y se producen rupturas a través de las cuales se produce la extravasación. (Gutiérrez y Chaves, 1980; Baramova y col., 1989; Kamiguti y col., 1996; Moura y col., 2008). A la par de esta hipótesis de hemorragia por rexis, también se ha propuesto que algunos venenos como el de

B. jararaca pueden inducir hemorragia por diapédesis, al inducir la apertura de las uniones intercelulares de las células endoteliales como consecuencia de una fuerte reacción inflamatoria, específicamente se ha señalado que mediadores inflamatorios liberados por la acción del veneno se unen a sus receptores, principalmente localizados en vénulas, lo cual puede inducir la contracción de las células endoteliales de las vénulas y la ampliación de las uniones intercelulares, con el consecuente escape pasivo de plasma y eritrocitos (Berjanason and Fox, 1988-89; Baramova y col., 1989; Gutiérrez and Recuvado, 2000; Gutiérrez, 2002).

Importancia clínica de la hemorragia

La consecuencia de la acción de estas complejas proteínas son las hemorragias locales y sistémicas como hemoptisis y gingivorragia, entre otras comúnmente observadas en el accidente botrópico severo (Gutiérrez, 1996). Este sangrado es uno de los síntomas más severos que se presentan durante un cuadro de ofidismo, pudiendo ser tan grave en algunos casos que podría contribuir al deterioro de órganos esenciales como pulmón, riñón, corazón o cerebro, lo cual podrían llevar hasta la muerte a la víctima del accidente ofídico (Isla y col., 2003).

Cuando se inicia una pérdida aguda de sangre, el sistema cardiovascular se auto-regula rápidamente, para mantener la presión sanguínea y preservar el flujo sanguíneo a órganos vitales, aunque obviamente la respuesta del organismo a esta situación depende de la cantidad de sangre perdida. El significativo ajuste cardiovascular, comienza a ocurrir cuando la pérdida de sangre excede alrededor de un 5 % (250 ml), inicialmente se produce la disminución del retorno venoso y una reducción de la estimulación de los receptores de

baja presión, lo que resulta en vaso constricción cutánea, muscular y de los vasos esplénicos, cambios que ocurren si hay cualquier variación significativa en la presión sanguínea o en el pulso. Sin embargo si la pérdida de sangre continúa, la falla en la producción cardíaca y la actividad de los nervios simpáticos se hace más intensa, la rata cardíaca continúa aumentando y la vasoconstricción periférica se incrementa, desviando la sangre por completo de la piel, músculos y vísceras hacia el cerebro y el corazón (Pocock and Richards, 1999; Guyton y Hall, 2001). En este momento, cuando la circulación falla en proveer una adecuada perfusión a los tejidos se instala el shock circulatorio o hipovolémico, lo que se traduce en una escasa liberación de oxígeno y otros nutrientes para las células tisulares e incluso el propio sistema cardiovascular (la musculatura cardíaca, las paredes de los vasos sanguíneos y el sistema vasomotor entre otros), los cuales comienzan a deteriorarse. Adicionalmente el metabolismo tisular continúa, a pesar del bajo flujo sanguíneo, por lo que grandes cantidades de ácido tanto carbónico como láctico se siguen vertiendo en los vasos sanguíneos, aumentando enormemente la acidez local de la sangre. Este ácido además de otros productos del deterioro procedentes de los tejidos isquémicos, produce la aglutinación local de la sangre, lo que da lugar a diminutos coágulos sanguíneos, creando pequeños tapones en los vasos. Incluso si los vasos no se taponan, la tendencia de las células a pegarse entre si hace más difícil el flujo sanguíneo a través de la microvascularización. Después de horas de esta condición de hipoxia capilar y falta de otros nutrientes, la permeabilidad de los capilares aumenta gradualmente y empiezan a escapar a los tejidos grandes cantidades de líquido, esto disminuye obviamente aún más el volumen sanguíneo con el consiguiente descenso adicional del gasto cardíaco agravando el shock. (Guyton y Hall, 2001). A medida que el shock se agrava, muchos signos de

deterioro celular generalizado aparecen en la mayor parte de los tejidos corporales, entre los se pueden citar:

1. El transporte activo de sodio y potasio a través de las membranas celulares está enormemente disminuido, en consecuencia el sodio y el cloruro se acumulan en las células y el potasio se pierde de las mismas, por lo que las células comienzan a hincharse.
2. La actividad mitocondrial de las células hepáticas, al igual que en otros muchos tejidos del cuerpo, está intensamente deprimida.
3. Los lisosomas de las células empiezan a romperse en extensas áreas de tejido, con la liberación intracelular de hidrolasas que causan un deterioro intracelular adicional.

Todos estos efectos contribuyen a un deterioro aún mayor de muchos órganos del cuerpo, entre los que figuran especialmente: 1) el hígado, con disminución de muchas funciones metabólicas y de detoxificación; 2) los pulmones con desarrollo final de edema pulmonar y una escasa capacidad para oxigenar la sangre; 3) el corazón, disminuyendo aún más la contractilidad cardíaca y 4) los riñones con lesiones especialmente en el epitelio de los túbulos renales, llevando a una insuficiencia renal aguda y en ocasiones a la muerte por uremia, aspectos que representan los más típicos síntomas del envenenamiento botrópico severo (Ferreira y col., 1992a; Guyton y Hall, 2001).

Esto refleja la importancia clínica de las hemorragias en los accidentes botrópicos y evidencian la necesidad de que la neutralización de estas toxinas por la terapia antiofídica disponible debe ser temprana y efectiva, de manera de prevenir el desarrollo de complicaciones sistémicas, que agravan las condiciones de la víctima de un accidente botrópico. (Anai y col., 2002; Sánchez y col., 2003).

INCOAGULABILIDAD SANGUINEA

El sistema de coagulación sanguíneo comprende principalmente de factores de coagulación, designados como Factores I a XIII (no hay factor VI). La mayoría de estos factores de coagulación se encuentran de forma inactiva en la circulación con la excepción del Factor III (factor tejido). La exposición de la sangre a la pared de un vaso dañado dispara inmediatamente la activación de los factores de coagulación y las plaquetas, por un mecanismo que consiste de diferentes etapas de reacciones, las cuales involucran la conversión de factores inactivos en serina proteinasas activas por una proteólisis limitada. La mayoría de estas reacciones requiere del ión calcio (factor IV) y probablemente tienen lugar sobre los fosfolípidos en la superficie de las plaquetas.

La activación del sistema de coagulación de la sangre guía a la conversión del Factor X inactivo a Factor X activado (Xa), lo cual conlleva a la proteólisis del Factor II (protrombina) y la formación de trombina, una serina proteinasa que al final de su estado de activación convierte el Factor I (fibrinógeno) en un coágulo sólido de fibrina, con la ayuda de la acción de las plaquetas. (Markland, 1998a). En el caso de las plaquetas, éstas constituyen fragmentos citoplasmáticos de megacariocitos, cuyas membranas poseen

diversas glicoproteínas que cumplen función de receptor para diferentes agonistas. Entre estos receptores se pueden citar: la glicoproteína Ia, que es hallada en un complejo con la glicoproteína IIa (complejo gpIa/IIa) y tiene funciones como receptor de colágeno; la glicoproteína Ib que se encuentra acomplejada con otra glicoproteína la IX (gpIb/IX), constituyendo el receptor del Factor de von Willebrand; la glicoproteína IIb un heterodímero calcio dependiente acomplejada con la glicoproteína IIIa, formando el complejo gpIIb/IIIa el cual funciona como receptor de fibrinógeno, fibronectina y factor de von Willebrand sobre plaquetas estimuladas; y la glicoproteína IV que es un receptor de colágeno. Cuando las plaquetas encuentran una lesión en la pared de un vaso, ellas cambian su forma de discos a esferas con proyecciones o pseudópodos radiantes que sobresalen de su superficie. Estos pseudópodos promueven el contacto con el sitio de la lesión y la subsiguiente extensión de las plaquetas completa su adhesión. Posteriormente el receptor gpIb/IX se une al Factor de von Willebrand en la matriz extracelular, esta unión provee un soporte entre el subendotelio y las plaquetas. En esta etapa el fibrinógeno se une al receptor gpIIb/IIIa después de la estimulación por ADP y provee la unión interplaquetas, favoreciendo tras su activación a fibrina la formación de una red de fibrina con múltiples entrecruzamientos que contribuyen a fortalecer el coágulo. (Kamiguti and Sano-Martins, 1995; Guyton y Hall, 2001). La formación de este coágulo detiene la tendencia hemorrágica y secundariamente dispara la conversión del plasminógeno a plasmina, enzima que es responsable por la remoción del coágulo de fibrina. (Figura 4). (Markland, 1998a).

Este complejo mecanismo fisiológico puede ser significativamente afectado por diferentes constituyentes presentes en muchos de los venenos de la familia *Viperidae* y especialmente en los venenos del género *Bothrops*, en los cuales se ha reportado la presencia de

constituyentes que actúan a diferentes niveles de la cascada de coagulación (figura 4), aunque se debe destacar que no todos los venenos de este género originan coagulopatías, ya que algunos de ellos entre los que se han citado *B. lateralis* o *B. nasutus*, se ha reportado que no afectan los tiempos de coagulación. (Kamiguti and Sano-Martins, 1995; Gutiérrez y col., 1996).

El efecto de los venenos que alteran el mecanismo hemostático en la víctima del accidente botrópico va a depender de la dosis de veneno que haya sido inoculada por la serpiente, si la dosis del veneno es muy alta, el efecto de los diferentes factores procoagulantes que presenta el veneno puede inducir un síndrome de coagulación intravascular diseminada (CID), el cual es capaz de llevar al paciente a una muerte rápida, mientras que con dosis más pequeñas como las inyectadas a nivel subcutáneo a las víctimas humanas durante accidentes leves, se produce una acción continua sobre el fibrinógeno, lo que conlleva a que la sangre sea débilmente coagulable o incoagulable por niveles muy bajos o ausentes de fibrinógeno (Badillo y col., 1989).

Varios grupos de investigación han contribuido a establecer los mecanismos responsables de estas alteraciones y han señalado que el síndrome hemostático observado en el accidente botrópico es causado por componentes del veneno que pueden agruparse en diferentes categorías dependiendo de su acción sobre el mecanismo hemostático, entre estos se pueden citar: las enzimas coagulantes del fibrinógeno (factor I), los activadores de protrombina (factor II), los activadores del factor X y el factor VIII, entre otros que pueden actuar como procoagulantes. Pero similarmente también se han descrito constituyentes que pueden mediar un efecto anticoagulante como los activadores del plasminógeno y los

componentes fibrinolíticos. (Tu, 1977; Kamiguti and Sano-Martins, 1995; Markland, 1998a; Gutiérrez, 2002).

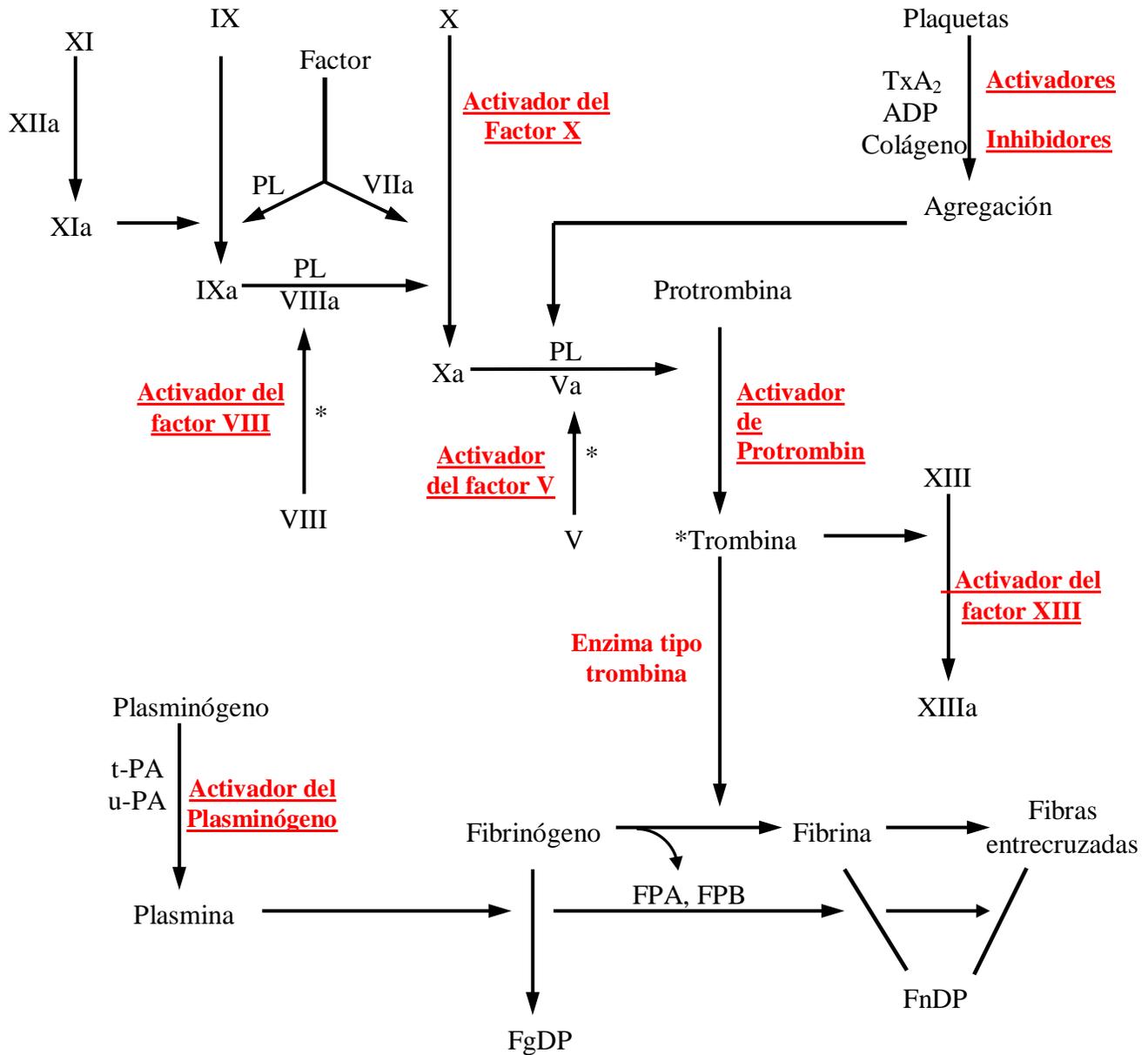
Enzimas Coagulantes del fibrinógeno

Los componentes del veneno que median la conversión del fibrinógeno (molécula compuesta por tres cadenas peptídicas: α , β y γ) a fibrina, son llamados enzimas tipo trombina (Gutiérrez, 2002). Estas han sido descritas no sólo en venenos del género *Bothrops* sino también en los venenos de los géneros *Crotalus* y *Lachesis*. Dichas enzimas difieren de la trombina en diferentes aspectos, uno de ellos es que la mayoría de ellas atacan solamente el extremo N-terminal de la cadena $A\alpha$ del fibrinógeno ($\text{Arg}^{16}\text{-Gly}^{17}$), originando un incremento en el fibrinopéptido A, mientras que la trombina produce fibrinopéptido A y B, ya que también corta la cadena $B\beta$ del fibrinógeno ($\text{Arg}^{14}\text{-Gly}^{15}$), exponiendo dos sitios de polimerización, dos nuevos N terminal para las cadenas α y β del monómero de fibrina, los cuales tienen un sitio complementario para polimerización los cuales están localizados en el C-terminal de las cadenas α y β del monómero de fibrina respectivamente. Esto resulta en la asociación lateral de los monómeros, y dado que las enzimas tipo trombina de estos venenos no clivan la cadena β del fibrinógeno, al monómero de fibrina formado le falta un sitio de polimerización en el extremo N-terminal de la cadena β , lo que produce en consecuencia un monómero de fibrina poco estable e incapacitado para polimerizar adecuadamente y formar coágulos (Rodríguez-Acosta y col., 1995; Markland, 1998a, b). Por otra parte estas enzimas tipo trombina de los venenos no activan el factor XIII u otros factores de coagulación, ni causan la agregación de las plaquetas, a diferencia de la trombina. (Markland, 1998a).

Figura 4

Puntos de interferencia de diversos constituyentes de los venenos botrópicos en el sistema hemostático.

Tomado y modificado Markland, F. 1998a



El texto en rojo señala los constituyentes de los venenos botrópicos que actúan en el sistema hemostático y el sitio de su interferencia

Estas enzimas tipo trombina han sido descritas y purificadas de los venenos de *B. jararaca*, *B. atrox*, *B. insularis*, *B. asper* y *B. colombiensis*, procedentes del Instituto Butantan en Brasil, entre otros (Tabla II) y han sido descritas como serina proteinasas con un peso molecular en un rango entre 30.000 y 45.000 daltons; las cuales presentan actividad esterásica con pequeños sustratos (ésteres básicos) tales como benzoil-L-arginina etil éster. Estas enzimas son ampliamente empleadas en laboratorios para la detección de fibrinógeno en muestras de sangre heparinizadas (Gabrijelcic y col., 1982; Kamiguti and Sano-Martins, 1995; Markland, 1998a, b Petretski y col., 2000a).

Activadores del factor X.

La activación del factor X de la coagulación por venenos del género *Bothrops* fue reportada por primera vez hace más de 40 años. Esta actividad de acuerdo a Kamiguti y Sano-Martins (1995), no está presente en los venenos de los géneros *Crotalus* o *Lachesis*, mientras que en el caso de los venenos botrópicos su presencia fue establecida en estudios como el de Nahas y col. (1979) quienes señalaron su presencia en 21 diferentes especies botrópicas de 26 diferentes especies estudiadas (tabla 2).

Enzimas con estas características han sido aisladas y caracterizadas de diferentes especies botrópicas entre las que se pueden citar *B. jararaca*, *B. erythromelas* y *B. atrox* (de este último se han aislado 2 factores con estas características) (Tu, 1977; Kamiguti and Sano-Martins, 1995; Markland, 1998a). Siendo caracterizadas como enzimas tipo metaloproteinasa, las cuales presentan un peso molecular en un rango de 70.000 a 90.000 daltons, son inactivas sobre sustratos sintéticos, protrombina o fibrinógeno, pareciendo

actuar específicamente sobre el factor X y presentan un mecanismo de acción que es similar al catalizado por las enzimas proteolíticas de la vía de la coagulación sanguínea, el cual implica específicamente el clivaje de la cadena del factor X entre la Arg⁵¹-Ile⁵² con la correspondiente formación del factor Xa (Hofmann and Bond, 1987; Markland, 1998a).

Tabla 2
Actividad Coagulante Específica de Diferentes Venenos Botrópicos.

Especie Botrópica	Enzima tipo Trombina	Activador del factor X	Activador de Protrombina
<i>B. alternatus</i>	+	+	+
<i>B. atrox</i>	+	+	-
<i>B. atrox asper</i>	+	-	+
<i>B. bilineatus bilineatus</i>	+	-	-
<i>B. brazili</i>	+	+	+
<i>B. castelnaudi</i>	-	-	+
<i>B. colombiensis</i>	+	+	+
<i>B. cotiara</i>	+	-	+
<i>B. erythromelas</i>	-	+	+
<i>B. fonsecai</i>	+	-	+
<i>B. insularis</i>	+	+	-
<i>B. itapetiningae</i>	+	-	+
<i>B. jararaca</i>	+	+	+
<i>B. jararacussu</i>	+	+	+
<i>B. marajoensis</i>	+	+	-
<i>B. megaera</i>	+	+	-
<i>B. moojeni</i>	+	+	+
<i>B. neuwiedi</i>	+	+	+
<i>B. neuwiedi diporus</i>	+	+	+
<i>B. neuwiedi mattogrossensi</i>	+	+	+
<i>B. neuwiedi pauloensis</i>	+	+	+
<i>B. neuwiedi pubescens</i>	+	+	+
<i>B. neuwiedi urutu</i>	+	+	+
<i>B. pirajai</i>	+	+	+
<i>B. pradoi</i>	+	+	+
<i>B. venezuelensis</i>	+	+	+

(+) Presente. (-) Ausente. Tomado y modificado de Nahas y col., 1979

Activadores de Protrombina

Nahas y col. (1979) refieren que solo los venenos botrópicos Sur Americanos son capaces de convertir protrombina a trombina. Este grupo de investigadores reportó la presencia de esta actividad, en 21 especímenes del género *Bothrops* tras la evaluación de 26 diferentes especímenes (tabla 2), en un sistema que incluía protrombina, fosfolípidos, calcio y veneno, evaluando el producto final de la reacción en base al tiempo de coagulación del fibrinógeno. En esta evaluación, estas enzimas se caracterizaron por ser independientes del factor V de coagulación y presentar cuatro diferentes grados de activación incluyendo: activadores fuertes (*B. venezuelensis*), medios (*B. jararaca*), débiles (*B. jararacussu*) y no activadores (*B. atrox*). Curiosamente en este estudio se consideró el veneno de la especie *B. atrox* (Brasil) como un no activador de protrombina, sin embargo varios años después Hofmann and Bond (1987) purificaron y caracterizaron un activador de protrombina del veneno de esta importante especie Sur Americana, constituyendo quizás una consecuencia de la variabilidad intraespecie en la composición de los venenos.

Enzimas activadoras de protrombina han sido purificadas de diferentes venenos entre los que se incluyen *B. atrox*, *B. asper*, *B. neuwiedi* y *B. erythromelas* y han sido descritas como metaloproteinasas de una sola cadena, con un peso molecular en un rango de 50.000 a 90.000 daltons, su mecanismo de acción se considera independiente de los factores no enzimáticos del complejo protrombina y se ha reportado que es similar al de los venenos de *Oxyuramus santellatus* y *Echis carinatus*, el cual implica la hidrólisis del enlace peptídico Arg³²²-Ile³²³ en la molécula de protrombina, generando el intermediario meizotrombina, el cual es convertido a trombina por autocatálisis (Hofmann and Bond, 1987; Rosing and

Tans, 1991; Kamiguti y col., 1995; Markland, 1998a; Loria y col., 2003). Mientras que bajo condiciones fisiológicas, la protrombina es activada por la acción proteolítica del factor Xa, en presencia del factor Va, fosfolípidos y calcio en un proceso de dos pasos, un primer paso que involucra la formación de un intermediaria pretrombina 2 o meizotrombina, por la hidrólisis del enlace peptídico Arg²⁷³-Thr²⁷⁴ para generar la molécula de trombina activa (Kamiguti and Sano-Martins, 1995).

A través de los activadores de protrombina, los venenos botrópicos pueden promover de forma indirecta la activación de otros factores de coagulación, ya que la formación de trombina es un paso crítico en este sistema, el cual no solo inicia la formación de trombina, sino que también activa los factores V, VIII, XIII y las plaquetas, potenciando el efecto del veneno sobre el sistema hemostático (Figura, 4) (Braund y col., 2000).

Activación del Factor VIII

El factor VIII de la coagulación es la reconocida proteína plasmática que es disminuida o ausente en la hemofilia. Esta es aislada como una mezcla de heterodímeros que contiene una cadena pesada de tamaño variable y una cadena ligera común. La trombina cataliza la activación de este factor en una reacción que es asociada con el clivaje de ambos tipos de cadena. (Eubanks y col., 1989).

La presencia de enzimas tipo serina proteinasas capaces de activar el factor VIII se ha descrito en diferentes venenos del género *Bothrops* como *B. jararacussu*, *B. jararaca*, *B. atrox*, *B. cotiara*, *B. alternatus*, *B. medusa*, *B. neuwiedi* y *B. nummifer* (Eubanks y col.,

1989; Stocker, 1994) y han sido aisladas y purificadas de diferentes venenos como *B. jararacussu* y *B. atrox*, estas enzimas se caracterizaron como proteínas con un peso molecular de 33.000 y 36.000 daltons respectivamente. (Kirby y col., 1979; Eubanks y col., 1989). En el caso de la enzima aislada de *B. jararacussu*, se ha señalado que esta serina proteinasa cataliza el clivaje tipo trombina de la cadena pesada del factor VIII, pero no afecta la cadena ligera (Stocker, 1994). Mientras que en el caso de la enzima aislada de *B. atrox*, llamada Trombocitina, se ha reportado que media un incremento en la actividad procoagulante de este factor y presenta una variedad de actividades que interfieren con el proceso hemostático como la agregación plaquetaria, la activación del factor XIII, una baja actividad coagulante del fibrinógeno, la activación del factor V y el clivaje de la protrombina, con liberación de productos similares a los producidos por trombina. (Kirby y col., 1979; Niewiarowski y col., 1979; Markland, 1998a). Enzimas tipo Trombocitina han sido reportadas en otros venenos botrópicos como *B. neuwiedi*, *B. cotiara*, *B. alternatus*, *B. medusa*, *B. moojeni*, *B. nummifer* y *B. jararacussu* (Kamiguti and Sano-Martins, 1995).

Inhibidores de las plaquetas.

Los venenos de serpientes presentan constituyentes que pueden inhibir la función de las plaquetas por diferentes mecanismos. Entre los compuestos más comúnmente reportados encontramos las llamadas desintegrinas, aunque esta actividad inhibitoria también ha sido relacionada con otros constituyentes de los venenos como las enzimas tipo fosfolipasas A₂ (PLA₂) o las 5' nucleotidasas, entre otras. (Kamiguti and Sano-Martins, 1995).

Desintegrinas: son una familia de pequeños polipéptidos no enzimáticos, ricos en disulfuro y se considera son sintetizados como parte de algunas metaloproteinasas en estos venenos, siendo posteriormente liberadas como consecuencia de proteólisis. (Gutiérrez, 2002). Las desintegrinas son inhibidores específicos de integrinas de las subfamilias $\beta 1$ y $\beta 3$ y como es reconocido, los miembros de estas subfamilias funcionan como receptores, expresados en la superficie de las plaquetas y otros tipos celulares como fibroblastos y células endoteliales, para ligandos tipo colágeno, fibrinógeno, fibronectina o laminina. (Rucinski y col., 1990; Markland, 1998a). La alta afinidad de las desintegrinas por estos receptores, particularmente por el receptor de fibrinógeno (gpIIb/IIIa) en las plaquetas, conlleva a que estos péptidos actúen como antagonistas del receptor de fibrinógeno, interfiriendo en consecuencia con la agregación plaquetaria inducida por agonistas como ADP, trombina, colágeno, ácido araquidónico o epinefrina (Markland, 1998a).

Las desintegrinas han sido descritas en diferentes venenos botrópicos como *B. atrox*, *B. jararaca*, *B. jararacusso*, *B. cotiara* y *B. colombiensis*, entre otros (Kamiguti and Sano-Martins, 1995; Sánchez y col., 2009). En la mayoría de los casos, se han reportado como péptidos de alrededor de 70 amino ácidos, cuya secuencia de análisis revela una sola cadena polipeptídica rica en cisteína y que presenta una secuencia arginina-glicina-ácido aspártico (RGD), cercana al carbonilo terminal, la cual constituye su sitio de reconocimiento celular (Rouslahti and Pierschbacher, 1987; Rucinski y col., 1990; Teng and Huang, 1991).

5´nucleotidasas: estas enzimas causan la degradación del ADP (adenosin-difosfato), un inductor de la agregación plaquetaria liberado de los gránulos de las plaquetas por varios

agonistas. La presencia de estas enzimas fue demostrada en diferentes venenos incluyendo el veneno de *B. atrox*, y fueron caracterizadas como una fosfomonoesterasas altamente específicas, las cuales se encuentran frecuentemente asociadas a una fosfatasa alcalina (Heredia y col., 1982).

Fosfolipasas A₂: otro mecanismo de inhibición de la agregación plaquetaria por venenos de serpientes es vía PLA₂, estas enzimas se encuentran ampliamente distribuidas en estos venenos, sin embargo aunque los venenos botrópicos poseen actividad PLA₂, se ha reportado que no todas estas enzimas pueden inhibir la agregación plaquetaria. (Kamiguti and Sano-Martins, 1995). Al respecto, se ha señalado que la inhibición de la agregación plaquetaria por estas enzimas se relaciona con su capacidad para inhibir la formación del complejo protrombina, compuesto de los factores Va, Xa, ión calcio y fosfolípidos, precisamente por la degradación de los fosfolípidos involucrados en la formación de dicho complejo, el cual transforma la protrombina en trombina y promueve la activación de la cascada de coagulación (Manjunatha, 2005).

Enzimas Fibrinolíticas

Los venenos de serpiente también poseen enzimas capaces de hidrolizar la red de fibrina que conforma los trombos (Gutiérrez, 2002). Los estudios que sugieren la presencia de estas enzimas en los venenos datan de los años 1700-1800 y corresponden a sencillas observaciones, como las desarrolladas por Mitchell and Robert en el año 1800 (Markland, 1991) quienes observaron que cuando un animal moría rápidamente después del envenenamiento, su sangre se observaba coagulada, pero cuando la muerte era retardada su

sangre era incoagulable. Adicionalmente en casos en los que la sangre de animales era rápidamente mezclada con veneno y mantenida en reposo a temperatura ambiente después de la formación del coágulo, éste se observaba disuelto completamente tras las primeras 24 horas, sugiriendo así los autores la presencia de actividad fibrinolítica en los venenos de los géneros *Crotalus* y *Sistrurus*. Estos estudios fueron extendidos posteriormente a diferentes venenos incluyendo el género *Bothrops*, con la obtención de resultados similares. (Devi y col., 1972; Markland, 1991)

Se ha propuesto, que la presencia de estas enzimas en los venenos de serpientes tiene por objeto prevenir la coagulación de la sangre en el animal envenenado y así facilitar que otros componentes del veneno puedan difundir rápidamente por la sangre, permitiendo inmovilizar rápida y efectivamente a la presa. (Markland, 1991).

Enzimas con estas características han sido aisladas de venenos de diferentes géneros como *Crotalus*, *Agkistrodon* y *Bothrops* y han sido descritas como metaloproteinasas dependientes de zinc, completamente desprovistas de actividad arginina esterasa, con un peso molecular entre los 20.000 y 34.000 daltons, las cuales aparentemente degradan las cadenas α y β de la fibrina e incluso del fibrinógeno. (Markland, 1991). Por otra parte, también se ha observado que enzimas presentes en los venenos de *B. asper*, *B. jararaca* y *B. moojeni*, entre otros, deben su efecto fibrinolítico a la activación del plasminógeno a plasmina o fibrinolisisina, enzima proteolíticamente similar a la tripsina. (Markland, 1998b; Guyton y Hall, 2001). Mientras que Sugiki y col. (1995) sugieren que en el caso particular del veneno de *B. jararaca*, existen ciertas metaloproteinasas que median la disociación del complejo activador del plasminógeno tipo tisular/inhibidor del activador del plasminógeno

tipo I (tPA/tPAI-1), lo que incrementa la actividad del tPA y adicionalmente pueden inactivar el inhibidor de plasmina α_2 -P1, interfiriendo con la regulación fisiológica del sistema fibrinolítico. La plasmina formada como consecuencia de estos eventos digiere, como es reconocido, las fibras de fibrina, así como otros coagulantes proteicos como el fibrinógeno, el factor V, el factor VIII, la protrombina y el factor XII. Por tanto esta generación de plasmina además de contribuir a la lisis prematura del tapón hemostático digiere muchos de los factores de coagulación, lo que provoca en consecuencia la hipocoagulabilidad de la sangre, agravando el cuadro de hemorragia sistémica frecuentemente observado en estos accidentes ofídicos. (Sugiki y col., 1995; Guyton y Hall, 2001).

Como se evidencia, los venenos botrópicos afectan la coagulación de una manera compleja, ejerciendo una acción continua sobre el fibrinógeno, con la formación de una fibrina con una polimerización inestable y con una mayor susceptibilidad de ser hidrolizada por el sistema fisiológico, lo que conduce a que la sangre sea débilmente coagulable o incoagulable. Obviamente estas alteraciones en la coagulación inducida por los venenos botrópicos, a pesar de no ser consideradas letales por si mismas para la víctima, pueden contribuir a agravar el cuadro de sangrado local y/o sistémico que iniciaron las toxinas hemorrágicas al lesionar los vasos, manteniéndose en consecuencia hemorragias profundas e indetenibles que pueden agravar la condición clínica de la víctima de un accidente botrópico, con las consecuencias citadas anteriormente. (Rosenfeld y col., 1959; Braund y col., 2000; Rengifo, 2002).

EDEMA

El edema se define como el incremento clínicamente manifiesto en el volumen del líquido intersticial, el cual puede aumentar en varios litros antes de que el proceso sea evidente, por lo que es frecuente que antes de que su aparición sea manifiesta se produzca un aumento de varios kilogramos de peso. Este particular efecto constituye el aspecto más común en el envenenamiento por serpientes de la familia *Viperidae*. (Gutiérrez y col., 1996; Braunwald, 1998), el cual de acuerdo a reportes epidemiológicos está usualmente presente hasta en un 100 % de las víctimas de estos accidentes (Badillo y col., 1989).

Este efecto se inicia entre los 5 a 15 minutos posteriores al accidente ofídico y se acompaña de un proceso inflamatorio caracterizado por dolor, calor, rubor e impotencia funcional. (Haad, 1980/1981; Rodríguez-Acosta y col., 2000; Rengifo, 2002; Theakston y col., 2003).

De manera general el edema inducido por las serpientes del género *Bothrops*, es dependiente del sinergismo entre mediadores que incrementan la permeabilidad vascular y aquellos que interfieren con el flujo sanguíneo. (Gutiérrez and Lomonte, 1989; Lobo y col., 2000). Entre los constituyentes que causan alteraciones en el flujo sanguíneo están las toxinas hemorrágicas, las cuales como se mencionó anteriormente, son capaces de lesionar por diferentes mecanismos la microvasculatura e incluso las arterias induciendo la extravasación (Acosta y col., 1998). En relación a los mediadores que alteran la permeabilidad vascular, diversos estudios experimentales sugieren la participación de constituyentes en los venenos que por un mecanismo indirecto inducen la liberación de mediadores pro-inflamatorios a partir de precursores endógenos como los mastocitos,

kininógenos y los fosfolípidos. Entre estos constituyentes se ha descrito la presencia de: 1) enzimas tipo PLA₂, las cuales al hidrolizar los fosfolípidos de las membranas celulares median la liberación de ácido araquidónico, iniciando la vía que conlleva a la síntesis de prostaglandinas; además de mediar la degranulación de mastocitos con la consecuente liberación de histamina (Landucci y col., 1998) y 2) las proteasas que actúan sobre el kininógeno en el plasma induciendo la liberación de kininas (Gutiérrez y col., 1996).

La contribución de estos diversos mediadores (fosfolípidos, histamina, kininas) al edema por venenos botrópicos ha sido revisada en evaluaciones farmacológicas del edema en roedores, entre estos estudios se puede citar el desarrollado por Barbosa y col. (2003) quienes caracterizaron el edema desarrollado por la serpiente venenosa *B. insularis*, para lo cual pre-trataron ratones con antagonistas de los receptores de histamina H1, serotonina 5HT2 y 5HT1/5HT2, inhibidores de las enzimas óxido nítrico sintasa, ciclooxigenasa y PLA₂; reportando una disminución significativa del edema con la mayoría de los tratamientos, exceptuando el antagonista de serotonina 5HT1/5HT2 quienes no tuvieron efecto significativo en el bloqueo del desarrollo del edema, lo que llevó a los autores a sugerir que el edema inducido por *B. insularis* es mediado por histamina, óxido nítrico y metabolitos de ácido araquidónico formados por la vía de la ciclooxigenasa 1 y 2.

Resultados similares fueron obtenidos por Chaves y col. (1995), al evaluar el edema inducido por el veneno de *B. asper* en ratones empleando: el agente quelante EDTA, inhibidores de las enzimas ciclooxigenasa y PLA₂, y antagonistas de los receptores de histamina H1 y H2; refiriendo en este caso una efectiva reducción del edema bajo sus condiciones experimentales para casi todos los tratamientos aplicados, con la excepción de

los antagonistas de los receptores de histamina H1 y H2, concluyendo que el edema desarrollado en ratones por este veneno es mediado, al menos parcialmente, por la actividad PLA₂ y productos eicosanoides. Resaltando que en contraste a lo descrito en otros venenos de serpientes y toxinas, la histamina parece no jugar un rol en el edema inducido por dicho veneno, lo cual podría reflejar nuevamente una consecuencia de la variabilidad interespecie en los venenos.

Obviamente el edema media graves implicaciones clínicas a la víctima de estos accidentes, ya que la acumulación de grandes volúmenes de fluido puede resultar en la elevación de la presión intersticial de algunos compartimientos musculares, lo cual puede llevar a un síndrome compartimental. (Gutiérrez and Lomonte, 1989), lo que implica una reducción de la perfusión capilar por debajo del nivel necesario para la viabilidad tisular, con un obvio compromiso en el tejido muscular y nervioso, por reducción del aporte de oxígeno y nutrientes a los tejidos, el cual podría evolucionar hasta a una necrosis local secundaria a la hipoxia, si la condición se mantiene, lo que lógicamente podría dejar secuelas permanentes en las víctimas de un accidente botrópico (Gutiérrez and Lomonte, 1995; Salinas y León, 2007).

NECROSIS

El proceso de necrosis o muerte celular, caracterizada por la tumefacción de los organelos celulares y la lisis de las membranas, es una consecuencia común en los envenenamientos moderados y severos por especies del género *Bothrops* (Gutiérrez y Bolaños, 1980). En casos donde la necrosis no es efectivamente neutralizada por el antiveneno, este efecto

redunda en una pérdida importante del tejido muscular, alteración que va acompañada de la destrucción concomitante de tendones y cartílagos; lo que combinado con una deficiente regeneración, principalmente debida a las lesiones en la microvasculatura, puede dejar secuelas permanentes en la víctima, como una posible disfunción o la pérdida completa de la región corporal afectada (Gutiérrez, 2002; Huatuco y col., 2004).

Diversos grupos de investigación, principalmente de Costa Rica y Brasil, han desarrollado diversas evaluaciones dirigidas a la identificación del tipo de toxinas responsables de estos efectos y de sus mecanismos de acción. Estas evaluaciones llegaron a conclusiones importantes entre las que tenemos:

1. La magnitud de la necrosis varía para cada veneno botrópico, si bien todos ellos los provocan, condición atribuida a la variabilidad inter e intra especie de los venenos de serpientes. (Gutiérrez, 2002).
2. De las diversas miotoxinas que se han aislado de los venenos de serpientes de la familia *Viperidae*, especialmente del género *Bothrops*, se ha encontrado que todas ellas son de naturaleza básica y que constituyen un grupo de proteínas estructural y antigénicamente relacionadas con las fosfolipasas, las cuales son enzimas de naturaleza ácida pero que no producen daño al músculo esquelético (Huatuco y col., 2004). Se considera que estas miotoxinas tienen una acción directa sobre las células musculares, específicamente lesionan sus membranas plasmáticas y originan una entrada masiva de calcio al citoplasma, este incremento en la concentración de calcio intracelular es el responsable de la activación de una serie de eventos

degenerativos como la disminución de las reservas de energía, la activación de enzimas hidrolíticas y la generación de radicales libres, lo cual lleva a la degradación oxidativa e hidrolítica de macromoléculas y membranas, causando así una falla completa en el mantenimiento de las funciones y estructuras celulares. (Gutiérrez y col, 1996; Gregus and Klaassen, 2001). El sitio de unión de estas miotoxinas a la membrana plasmática no se ha establecido claramente, aunque se ha propuesto la existencia de dos tipos de unión que incluyen fosfolípidos negativos presentes en las membranas de muchos tipos celulares y receptores proteicos presentes en células musculares. (Gutiérrez, 2002).

3. Por último los estudios de secuencia de estas enzimas han permitido describir dos tipos de miotoxinas, reconocidas como fosfolipasas D49 y fosfolipasas K49, las cuales presentan respectivamente un aspartato en el residuo 49 o una lisina en dicha posición. Estas diferencias tienen implicaciones drásticas en la actividad catalítica, ya que el aspartato en el residuo 49 juega un papel central en la capacidad de estas proteínas de unir el ión calcio, requisito indispensable para la actividad catalítica, por lo que su sustitución por lisina tiene en consecuencia una incapacidad de la molécula para ligar calcio y por lo tanto la pérdida de la actividad enzimática. Sin embargo, este grupo de lisina 49 pese a ser inactivas enzimáticamente posee una fuerte acción miotóxica, lo que evidencia que la actividad de hidrólisis de fosfolípidos no es estrictamente necesaria para lesionar la integridad de las membranas plasmáticas de las fibras musculares evidenciando que otras regiones moleculares diferentes al sitio catalítico son las responsables de este efecto. (Toyama y col., 2001; Gutiérrez, 2002; Huatuco y col., 2004).

4. Además de la acción directa de las miotoxinas, la necrosis observada en estos accidentes ofídicos se ha relacionado a la isquemia local que se desarrolla en el músculo esquelético, originada por la fuerte compresión de los tejidos como consecuencia del edema y por las lesiones oclusivas de las arterias de la región afectada, así como la acción proteolítica de los venenos sobre la vasculatura (Gutiérrez and Lomonte, 1989), aunque la suma de estos efectos edema y hemorragia son considerados de menor relevancia. Esto se evidenció en los estudios de Lomonte y col. (1987) quienes observaron que la incubación de veneno crudo con anticuerpos policlonales de conejo y caballo, obtenidos para cuatro miotoxinas, neutralizó aproximadamente el 75% del efecto miotóxico inducido por el veneno, sugiriendo que este grupo de toxinas son responsables por la mayor parte del daño muscular inducido por el veneno.

INSUFICIENCIA RENAL

La insuficiencia renal es considerada una de las complicaciones clínicas más graves en el accidente provocado por serpientes venenosas, constituyendo incluso la principal causa de muerte en estos casos, aunque en el accidente botrópico ésta es menos frecuentemente observada. (Rodríguez-Acosta y col., 1995; Aline y col., 1999).

Su mecanismo fisiopatológico no está completamente dilucidado, aunque se supone que influye la interacción de varios factores como los efectos isquémicos producidos por la coagulación intravascular diseminada (CID), la hipotensión sistémica y la mioglobinuria, así como la hipoxia por la liberación local de componentes vasoactivos, mecanismos que

varían según el envenenamiento se produzca por *Elapidos*, *Crotalus* o especies de *Bothrops* y aún entre las diferentes especies botrópicas. (Badillo y col., 1989; Gutiérrez, 2003; Koscinczuk y col., 2003; Koscinczuk y col., 2007).

Por otra parte, tampoco se descarta la posible acción directa de toxinas en las células renales, particularmente en los túbulos, ya que la marcada excreción renal de los venenos de serpientes y la elevada capacidad de los túbulos para la concentración de sustancias en la orina, conlleva a que la concentración tubular pueda alcanzar entre 10 a 20 veces la concentración sérica de los venenos. (Koscinczuk y col., 2007). Además de diferentes evidencias de efecto directo, como observaciones con el veneno de *B. moojeni* el cual presenta un efecto citotóxico directo sobre las células MDCK (Madin-Darby canine kidney) una línea de células epiteliales tubulares y estudios con órgano aislado, los cuales señalan que diversas enzimas tipo fosfolipasas A₂, procedentes de abejas o de venenos de serpientes, son directamente tóxicas al túbulo proximal de roedores. (Castro y col., 2004). Sugiriendo que este aspecto podría ser el responsables de la necrosis tubular aguda o la glomerulonefritis que desencadenan en falla renal aguda en las víctimas del accidente botrópico. (Aline y col., 1999, Koscincznk y col., 2007).

Como se evidencia, estos venenos constituyen una mezcla extremadamente compleja de sustancias activas, cuyos efectos aditivos y posiblemente sinergistas son los responsables del desarrollo del efecto fisiopatológico que caracteriza los accidentes botrópicos, cuyas graves consecuencias y rápido desarrollo implican la necesidad de una pronta y eficiente intervención médica. (Ferreira y col., 1992b; Camey y col., 2002).

ANTIVENENO

La entrada masiva al organismo de la víctima, de la compleja mezcla de toxinas que constituyen los venenos de serpientes, no le permiten al sistema inmune de un individuo desarrollar una respuesta rápida y protectora, por lo que se ha recurrido desde hace más de 100 años a la inmunización pasiva, representada por el suero antiofídico o antiveneno (Gutiérrez y col., 1996). Este antiveneno constituye actualmente el único recurso terapéutico científicamente validado para el manejo de los envenenamientos ofídicos, los cuales están constituidos por una suspensión de anticuerpos específicos capaces de neutralizar los diferentes constituyentes del veneno. (Quintini, 1957), su gran impacto se refleja en la marcada mejoría en el pronóstico de las mordeduras de serpientes; lo cual se aprecia en el descenso de la mortalidad desde un 20-25 % a comienzos del siglo XX hasta un 0,6 y un 0,1 % en Brasil y USA respectivamente, a finales del mismo siglo. (Otero, 2008).

En Venezuela para el tratamiento de los accidentes por mordedura de serpiente se dispone de un suero antiofídico polivalente, además de dos antivenenos específicos un antibotrópico y un anticrotálico los cuales son elaborados por el Centro de Biotecnología de la Facultad de Farmacia de la Universidad Central de Venezuela. (www.serpientesdevenezuela.ucv.ve).

El proceso de elaboración de un antiveneno se inicia con la extracción manual del veneno de las serpientes, el cual se lleva a un proceso de desecación, ya sea en frío (liofilización) o por evaporación a 4 °C y al vacío, para eliminar el agua de la solución. Los cristales obtenidos se disuelven y la solución resultante se inyecta previa determinación de la DL₅₀ a

animales, siendo los equinos la especie animal más utilizada por su facilidad de manejo y los grandes volúmenes de sangría que permiten obtener (Rojas, 2003). Cada animal se somete a un esquema de inmunización que dura aproximadamente tres a cuatro meses, tiempo durante el cual se inyectan dosis subletales y crecientes del veneno. Al final de dicho esquema de inmunización, se realizan sangrías de prueba a cada animal con el fin de determinar el título de anticuerpos neutralizantes, si el título es satisfactorio se realizan sangrías de producción en recipientes estériles y empleando un anticoagulante a base de citrato. Posteriormente y ya en la planta de producción se da inicio al proceso de purificación de las globulinas equinas, siendo el primer paso separar los glóbulos rojos del plasma; los cuales se retornarán al animal para evitarle estados de anemia, mientras que el plasma se someterá a diferentes procesos químicos para purificar las inmunoglobulinas, como precipitación con sulfato de amonio y pepsinización para obtener finalmente los fragmentos Fab de las inmunoglobulinas de caballo que van a conformar el suero antiofídico. El suero así obtenido es luego ajustado a una potencia neutralizante estándar, esterilizado mediante filtración y envasado asépticamente en ampollas. (Rojas, 2003; www.serpientesdevenezuela.ucv.ve). El antiveneno así obtenido es sometido posteriormente a un proceso de control de calidad, el cual implica el desarrollo de una serie de evaluaciones que se pueden dividir en tres grupos: (Gutiérrez y col., 1996). 1) las pruebas físicas donde se observan las características organolépticas del producto como color y presencia de partículas, entre otras, 2) las pruebas químicas que incluyen determinación de proteínas totales, albúmina, electroforésis, pH, cloruro de sodio y fenol y las pruebas biológicas que implican evaluaciones de esterilidad, pirógenos, inocuidad y el reconocido análisis de potencia, empleado ampliamente como la única prueba de rutina para evaluar la capacidad neutralizante del antiveneno (Gutiérrez y col., 1981). Esta

determinación de potencia se traduce como la dosis efectiva de antiveneno que puede proteger del efecto letal del veneno al 50 % de la población de ratones (DE₅₀) y es considerada la vía más efectiva para analizar la eficacia del antiveneno (Sánchez y col., 2003). Sin embargo, el hecho de que existen variaciones importantes en las características bioquímicas y farmacológicas de venenos de ejemplares de una misma especie provenientes de regiones geográficas diferentes, plantea la necesidad de investigar si este antiveneno es realmente eficaz en la neutralización de las diferentes actividades tóxicas de los venenos de serpientes (Rojas y col., 1987), ya que la actividad neutralizante de un antiveneno contra un veneno en particular, depende de la composición antigénica de los venenos incluidos en la mezcla inoculada a los caballos. (Otero y col., 1995). Lo que es particularmente relevante, ya que generalmente los productores de veneno cuentan con serpientes venenosas criadas en cautiverio, las cuales provienen de unos pocos especímenes de una sola localidad, por lo que probablemente estas contengan solamente una fracción del número total de antígenos presentes en la especie, lo que conduce al desarrollo de un antiveneno que puede ser menos efectivo contra el veneno de otras especies o incluso de la misma especie pero de diferentes localidades geográficas a las incluidas en la producción del suero (Fry y col., 2003). Esto se ha observado en diferentes evaluaciones experimentales, entre estos Rojas y col. (2005) reportaron que un antiveneno específico (antibotrópico: *B. atrox*, *B. brazili*, *B. barnetti* y *B. pictus*) empleado clínicamente en Perú y que es altamente efectivo en la neutralización de las actividades letal, hemorrágica, miotóxica, coagulante, desfibrinante y edematizantes de *B. atrox* y *B. pictus*; falló en neutralizar las actividades coagulantes de *B. barnetti* y edematizante de *B. brazili*, en estudios con preincubación de veneno-antiveneno.

López y col. (2004), en la evaluación de la neutralización de las actividades letal, hemorrágica y coagulante de las mapanares venezolanas *B. colombiensis*, *B. venezuelensis*, *B. atrox* (Edo. Bolívar) y *Porthidium lansbergii humani* por los antivenenos comerciales producidos en Costa Rica y Venezuela, refieren que aunque ambos antivenenos neutralizaron eficazmente la actividad letal de *B. atrox*, no fueron efectivos en la neutralización de la actividad hemorrágica de este mismo veneno.

Y más recientemente Duque y Scannone (2006) observaron que el antiveneno polivalente venezolano aunque altamente efectivo en la neutralización de las actividades letal, hemorrágica, desfibrinante y coagulante del veneno de *B. atrox* (Edo Amazonas), sólo fue parcialmente efectivo en la neutralización de sus actividades edematizante y hemolítica indirecta, en ensayos que implicaron la incubación de veneno-antiveneno previo a la aplicación del tratamiento a ratones.

Esta menor capacidad neutralizante de los antivenenos como se señaló anteriormente, se ha relacionado principalmente a la baja cantidad de anticuerpos capaces de neutralizar las toxinas responsables (Ferreira y col., 1992b), lo que aunado a que usualmente en víctimas humanas el antiveneno se administra varias horas después de ocurrida la mordedura, hace evidente el desarrollo de importantes complicaciones en el tratamiento del accidente ofídico que sugieren que en tales casos las secuelas serán prácticamente inevitables. (Gutiérrez y Bolaños, 1980).

Adicionalmente cuando se habla de antivenenos también es importante destacar la extensiva neutralización cruzada entre diversos venenos botrópicos y antivenenos

producidos en varios países de América Latina. Como la señalada por López y col. (2004), quienes refieren que el antiveneno polivalente empleado en Costa Rica fue completamente efectivo para neutralizar los efectos letal, hemorrágico y coagulante del veneno de *B. colombiensis* (Venezuela), mientras que en el caso de *B. atrox* (Edo. Bolívar, Venezuela), este antiveneno es efectivo sólo en la neutralización de los efectos letal y procoagulante, lo que sugiere importantes similitudes inmunológicas entre toxinas relevantes en venenos botrópicos de diferentes países y soporta la propuesta de diferentes investigadores de que algunos antivenenos son efectivos contra venenos heterólogos de otros países y que podrían ser útiles en situaciones en las cuales la producción local de antiveneno no esté disponible; sin embargo su capacidad neutralizante debe ser evaluada antes de su aplicación clínica. (Rojas y col., 2005).

Como se evidencia, la elevada complejidad de los venenos de serpientes la cual radica no sólo en su composición química sino en la variedad y magnitud de los efectos desarrollados por sus constituyentes con actividades biológicas o tóxicas, la cual es además profundizada por la variabilidad interespecífica e intraespecífica en la composición química y actividades farmacológicas de los venenos (Bogarín y col., 1999), también conlleva importantes implicaciones prácticas en el diseño, producción y control del único tratamiento específico para estos casos: los antivenenos (Otero y col., 1995), aspectos que obligan a que las poblaciones con una abundante herpetofauna venenosa, como Venezuela, deban realizar esfuerzos no sólo para identificar sus serpientes de importancia médica, sino por caracterizar ampliamente sus venenos de manera de ampliar y profundizar los conocimientos sobre los factores implicados en la morbilidad y mortalidad en los accidentes ocasionados con estas especies, lo que obviamente podría repercutir en la

optimización de los cuidados clínicos de las víctimas del accidente ofídico y fundamentalmente en elevar la efectividad de la terapia antiofídica.

En el caso de la optimización de los antivenenos, los expertos han tratado de solucionar esa menor neutralización observada usualmente contra los efectos locales desarrollados por los venenos, por una vía que implica el enriquecimiento de los inóculos con proteínas/toxinas o incluso fracciones representativas antigénicamente, ampliando su efectividad al reducir el efecto de dilución del título de los antivenenos, aspecto atribuido a la presencia en los inóculos de veneno crudo de constituyentes fuertemente antigénicos pero de escaso o ningún compromiso toxicológico o fisiopatológico. (Gutiérrez y col., 1985) Este proceso de enriquecimiento del inóculo podría representar a futuro una valiosa herramienta para el mejoramiento de la terapia antiofídica y aunque si bien es cierto que es un proceso que para ser puesto en práctica se requiere de enormes esfuerzos institucionales, entre sus primeros pasos está precisamente el conocer el alcance fisiopatológico de los venenos, sus diferentes fracciones, cómo se distribuyen los constituyentes con actividades tóxicas o biológicas en ellas, hasta caracterizar incluso de forma particular las proteínas o constituyentes con importancia clínica presentes en los mismos. Evaluaciones que adicionalmente podrían repercutir en la optimización de los cuidados clínicos de las víctimas del accidente ofídico, ya que podrían revelar aspectos fisiopatológicos importantes que contribuyan al diagnóstico e incluso el pronóstico del accidente ofídico.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Caracterizar las principales actividades tóxicas del veneno total de la serpiente venezolana *Bothrops colombiensis* de Paracotos (Edo. Miranda) y sus fracciones, obtenidas por exclusión molecular y evaluar su compromiso en el efecto fisiopatológico ocasionado en diferentes órganos blanco como músculo, pulmón, hígado, riñón, corazón y páncreas en ratones

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1. Estudio toxinológico y clínico del veneno total de *Bothrops colombiensis* (Paracotos)**
 - a. Determinar la toxicidad aguda (letalidad) del veneno total de *Bothrops colombiensis*.
 - b. Determinar la actividad edematizante del veneno total de *Bothrops colombiensis*.
 - c. Determinar la actividad necrosante del veneno total de *Bothrops colombiensis*.
 - d. Determinar la actividad desfibrinante del veneno total de *Bothrops colombiensis*.
 - e. Determinar de la actividad hemorrágica del veneno total de *Bothrops colombiensis*.
 - f. Determinar la actividad coagulante in vitro sobre plasma humano del veneno total de *Bothrops colombiensis*.
 - g. Determinar la actividad tipo fosfolipasa A₂ del veneno total de *Bothrops colombiensis*.

- h. Determinar los niveles de los marcadores hepáticos alanina aminotransferasa (ALT) y aspartato amino transferasa (AST) en suero de ratones tratados con veneno total de *Bothrops colombiensis*, a diferentes tiempos.
- i. Determinar los niveles de los marcadores de función renal: urea (BUN) y creatinina en suero de ratones tratados con veneno total de *Bothrops colombiensis* a diferentes tiempos.
- j. Determinar los niveles de glicemia y amilasa en suero de ratones tratados con veneno total de *Bothrops colombiensis* a diferentes tiempos.
- k. Describir el perfil de proteínas del veneno total de *Bothrops colombiensis* con la ayuda de técnicas de electroforesis en gel.
- l. Describir los daños tisulares que produce el veneno total de *Bothrops colombiensis* en diferentes órganos blanco: riñón, pulmón, corazón, páncreas, músculo e hígado, empleando técnicas histopatológicas.
- m. Fraccionar el veneno total de *Bothrops colombiensis* por cromatografía de exclusión molecular.

2. Estudio toxicológico y clínico de las fracciones liofilizadas del veneno total de *Bothrops colombiensis*.

- a. Determinar la toxicidad aguda (letalidad) inducida por las fracciones del veneno total de *Bothrops colombiensis*.
- b. Determinar la actividad edematizante de las fracciones del veneno total de *Bothrops colombiensis*.

- c. Determinar la actividad necrosante de las fracciones del veneno total de *Bothrops colombiensis*.
- d. Determinar la actividad desfibrinante de las fracciones del veneno total de *Bothrops colombiensis*.
- e. Determinar de la actividad hemorrágica de las fracciones del veneno total de *Bothrops colombiensis*.
- f. Determinar la actividad coagulante in vitro sobre plasma humano de las fracciones del veneno total de *Bothrops colombiensis*.
- g. . Determinar la actividad tipo fosfolipasa A₂ de las fracciones del veneno total de *Bothrops colombiensis*.
- h. Determinar los niveles de los marcadores hepáticos alanina aminotransferasa (ALT) y aspartato amino transferasa (AST) en suero de ratones tratados con las fracciones del veneno total de *Bothrops colombiensis*, a diferentes tiempos.
- i. . Determinar los niveles de los marcadores de función renal: urea (BUN) y creatinina en suero de ratones tratados con las fracciones del veneno total de *Bothrops colombiensis* a diferentes tiempos.
- j. Determinar los niveles de glicemia y amilasa en suero de ratones tratados con las fracciones del veneno total de *Bothrops colombiensis* a diferentes tiempos.
- k. Describir el perfil de proteínas de las diferentes fracciones obtenidas para el veneno total de *Bothrops colombiensis* con la ayuda de técnicas de electroforesis en gel.
- l. Describir los daños tisulares que. produce el veneno total de *Bothrops colombiensis* en diferentes órganos blanco: riñón, pulmón, corazón, páncreas, músculo e hígado, empleando técnicas histopatológicas.

CAPÍTULO II

MATERIALES Y MÉTODOS

MATERIALES

Animales

Se utilizaron ratones blancos sin distinción de sexo, cepa INH, con un peso entre 18 y 30 g, provenientes del Bioterio del Instituto Nacional de Higiene Rafael Rangel, los cuales fueron mantenidos en jaulas de acero inoxidable, con suministro de agua y alimento (Ratarina®) a voluntad, hasta el momento de las evaluaciones.

Veneno

Para todas las evaluaciones se utilizó el veneno cristalizado de especímenes de *B. colombiensis*, recolectadas en la región de Paracotos en el estado Miranda (figura 5), el cual fue suministrado por el Laboratorio de Investigaciones de la Facultad de Farmacia de la Universidad Central de Venezuela. Dicho veneno se mantuvo almacenado a 4° C sobre CaCl₂ y al vacío hasta el momento de las diferentes evaluaciones planteadas.

Fracciones Liofilizadas

Estas fueron obtenidas por la liofilización de las fracciones del veneno total de *Bothrops colombiensis* obtenidas por cromatografía de exclusión molecular en Sephadex® G-100. Los liófilos obtenidos se mantuvieron congelados a -20°C hasta el momento de su evaluación.

METODOLOGÍA

Fraccionamiento del veneno

El fraccionamiento del veneno se realizó por cromatografía de exclusión molecular. Para esto se empleó una columna de fraccionamiento de 2,5 cm de diámetro por 100 cm de longitud, la cual se ubicó en un cuarto frío a 8 °C, se empacó con Sephadex G-100 (Pharmacia®, Upsala, Suecia), se equilibró con acetato de amonio 0,2 N la cual constituyó la fase móvil y se ajustó para la obtención de un flujo de 8 ml/hora.

A través de dicha columna se eluyeron de forma individual 6 soluciones de 250 mg del veneno/ 5 ml de acetato de amonio 0,2 N, previamente centrifugadas a 3000 rpm por 10 minutos, para eliminar los restos insolubles. Los eluatos obtenidos, se retomaron en tubos de ensayo de 30 ml con la ayuda de un colector automático (Wilson Linear Fractionator®, Middleton, Wisconsin), programado para un cambio de tubo cada 30 min. Finalmente, a las fracciones obtenidos se les determinó su absorbancia a una longitud de onda de 280 nm en un espectrofotómetro UV-VIS (Beakman Coulter®), se registró el perfil de elución, se delimitaron los picos de interés y las fracciones correspondientes a cada uno de los picos obtenidos se recolectaron y liofilizaron (Liofilizador LABCONCO®)

Determinación de letalidad (dosis letal cincuenta)

Dosis seriadas del veneno entre 0,79 y 12,63 mg/Kg, así como de las fracciones liofilizadas en un rango de 1,05 a 2,11 mg/Kg disueltas en solución de cloruro de sodio (NaCl) al 0,85%, se administraron por la vía intraperitoneal en un volumen de inyección de 0,2 ml a grupos de 4 ratones por dosis. Posteriormente a las 24 y 48 horas post-tratamiento se

registró el número de animales vivos y muertos. Los resultados obtenidos se expresaron como dosis letal cincuenta (DL_{50}), definida como la menor cantidad de veneno o fracción capaz de causar la muerte al cincuenta por ciento de la población animal inoculada y se estimó de acuerdo al método de Spearman-Kärber (WHO, 1981).

Determinación de la actividad hemorrágica.

Dosis seriadas del veneno entre 150 y 1120 $\mu\text{g/ml}$; así como de las las fracciones liofilizadas en un rango de 7,5 a 2360 $\mu\text{g/ml}$ disueltas en NaCl al 0,85%, se administraron por la vía intradérmica, en la región abdominal en un volumen de inyección de 0,1 ml a grupos de 4 ratones por dosis. Como control negativo, un grupo adicional de 4 ratones se inoculó con 0,1 ml del vehículo. Dos horas después de la aplicación del tratamiento, los animales se sacrificaron, se removió la piel de la región abdominal, se midió el área de la lesión hemorrágica en la cara interna de la piel y se determinó el diámetro de la lesión desarrollada empleando la siguiente ecuación $D = 2 \sqrt{\frac{\text{área}}{\pi}}$. Los resultados obtenidos se expresaron como dosis hemorrágica mínima (DHM), la cual se define como la cantidad de veneno que induce un área hemorrágica de 10 mm de diámetro dos horas después de la inoculación del veneno (Gutiérrez, 1985).

Determinación de la actividad edematizante.

Dosis seriadas del veneno entre 8 y 160 $\mu\text{g/ml}$; así como de las fracciones liofilizadas en un rango de 2,40 a 960 $\mu\text{g/ml}$ disueltas en NaCl al 0,85%, se administraron en la almohadilla plantar de la extremidad posterior derecha, en un volumen de inyección de 0,05 ml, a grupos de 4 ratones por dosis a evaluar. La almohadilla plantar de la extremidad izquierda

se inyectó con el vehículo y fue usada como control. Posteriormente, una hora después de la aplicación del tratamiento, los animales se sacrificaron y se seccionaron las 2 extremidades posteriores, las cuales fueron pesadas en balanza analítica. El edema se estimó en términos porcentuales, como el aumento de peso de la extremidad derecha con relación a la extremidad izquierda, finalmente los resultados se expresaron como dosis edematizante mínima (DEM) definida como la cantidad de veneno que produce un edema de un 30 % después de una hora de exposición (Yamakawa y col., 1976).

Determinación de la actividad necrosante.

La actividad necrosante del veneno se determinó por medio de la cuantificación de la enzima creatina fosfoquinasa (Gutiérrez y col., 1981). Para esto, una dosis de 40 µg/0,1 ml del veneno de *Bothrops colombiensis* disuelto en solución salina al 0,85 %, se administró por la vía intramuscular, en un volumen de inyección de 0,1 ml a 11 grupos de 12 ratones asignados al azar. Posteriormente a intervalos de 1, 3, 6, 15, 24 48, 72, 96, 120, 144 y 168 horas de la aplicación del tratamiento, el grupo de animales correspondiente fue anestesiado con éter y se recolectó una muestra de sangre de cada uno de los animales tratados, a través del plexo axilar Las muestras se depositaron en tubos eppendorf limpios y secos por grupo de tratamiento, estos se centrifugaron a 3000 rpm por 10 min. y se recolectó el suero, en el que se cuantificó la actividad de la enzima creatina fosfoquinasa (CPK), para lo que fue utilizado un kit diagnóstico de Stanbio Labotary® (Procedimiento N°. 2910. Ver anexos). Los controles se constituyeron por dos grupos adicionales de 12 ratones, de los cuales un grupo fue inoculado con 0,1 ml del vehículo (control del vehículo), mientras que al segundo grupo no se le aplicó tratamiento alguno (control sano). Los resultados fueron expresados como actividad enzimática (U/L), definida como la cantidad de enzima la cual oxida un

$\mu\text{mol/L}$ de NADP por minuto y se evaluó el desarrollo del efecto necrosante en función del tiempo.

Para el estudio de las fracciones se emplearon: 100 $\mu\text{g}/0,1$ ml de la FI, 50 $\mu\text{g}/0,1$ ml de la FII y 80 $\mu\text{g}/0,1$ ml de la FIII.

Determinación de la actividad desfibrinante.

Dosis seriadas del veneno entre 5,5 y 25,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$; así como de las fracciones liofilizadas en un rango de 3,75 a 120 $\mu\text{g}/\text{ml}$ disueltas en NaCl al 0,85%, se administraron por la vía intravenosa, en un volumen de inyección de 0,2 ml a grupos de 4 ratones por dosis. Como control negativo, un grupo adicional de 4 ratones se inoculó con 0,2 ml del vehículo. Una hora después de la aplicación del tratamiento y bajo anestesia con éter, se tomó una muestra de sangre del plexo axilar de cada uno de los ratones tratados y se colocó en tubos de ensayo de plástico. Dos horas después de la recolección de las muestras, se evaluó la coagulación de las mismas y se determinó la dosis desfibrinante mínima (DDM), la cual se define como la cantidad de veneno capaz de inducir la incoagulabilidad de la sangre en todos los animales inoculados (Theakston and Reid, 1983).

Determinación de la actividad coagulante.

Dosis seriadas del veneno entre 0,5 y 32 $\mu\text{g}/0,1$ ml; así como de las fracciones liofilizadas en un rango de 0,1 a 100 $\mu\text{g}/0,1$ ml disueltas en NaCl al 0,85% se adicionaron a 0,1 ml de plasma humano citratado (Fibrinógeno 389 mg %), pre-incubado a 37°C con 0,1 ml de buffer tris HCL 0,01 M pH 7,3 en NaCl 0,15 M, posteriormente la mezcla se incubó por 1

min. a 37°C, se le adicionó 0,1 ml de CaCl₂ 0,05 M y se determinó el tiempo de coagulación del plasma con la ayuda de un cronómetro. Los resultados fueron expresados como dosis coagulante mínima (DCM), la cual corresponde a la cantidad de veneno que induce la coagulación del plasma en la menor unidad de tiempo posible. Todas las evaluaciones se realizaron por triplicado, incluyendo un control negativo, en el cual los 0,1 ml del veneno fueron sustituidos por 0,1 ml de solución de NaCl al 0,85 % (Furukawa and Hayaslei, 1977).

Determinación de la actividad fosfolipasa A₂.

La actividad PLA₂ se determinó por el método titulométrico descrito por De Haas y modificado por Yang and King (1980), en el cual una emulsión acuosa de yema de huevo es usada como sustrato. Para esto una yema de huevo fue homogenizada con 300 ml de agua destilada y suplementada con 2,7 mM de deoxicolato de sodio y 20 mM de CaCl₂. Posteriormente a alícuotas de 10 ml del sustrato pre-incubado a 25 °C y alcalinizado a un pH 8 con NaOH 0,01 M, se le adicionó 10 µL de soluciones con dosis del veneno entre 0,5 y 5 mg/ml; así como de las fracciones liofilizadas en un rango entre 0,4 a 20 mg/ml disueltas en solución de NaCl al 0,85%. Finalmente con la ayuda de un autotitador (Radiometer Analytical® TIM 840), se tituló con NaOH 0,01 M el ácido graso liberado por la acción del veneno sobre los fosfolípidos de la yema de huevo. Los resultados fueron expresados como actividad enzimática, cuya unidad es definida como la liberación de 1 µequiv/min. de ácido graso.

Determinación de la actividad de la enzima alanina aminotransferasa (ALT/SGPT).

Una dosis de 40 µg/0,1 ml del veneno de *Bothrops colombiensis* disuelta en NaCl al 0,85 % fue administrada por la vía intramuscular, en un volumen de inyección de 0,1 ml a 11 grupos de 12 ratones asignados al azar. Posteriormente a intervalos de 1, 3, 6, 15, 24 48, 72, 96, 120, 144 y 168 horas de la aplicación del tratamiento, el grupo de animales correspondiente fue anestesiado con éter y se recolectó una muestra de sangre de cada uno de los animales, a través del plexo axilar. Las muestras recolectadas fueron depositadas en tubos eppendorf limpios y secos por grupo de tratamiento, finalmente estos se centrifugaron a 3000 rpm por 10 min. y se recolectó el suero, donde se cuantificó la actividad de la enzima ALT/SGPT utilizando un kit de diagnóstico *in vitro* Stanbio Laboratory® (Procedimiento N° 2930. Ver anexos). Los controles incluidos, estuvieron constituidos por dos grupos adicionales de 12 ratones, de los cuales un grupo se inoculó con 0,1 ml del vehículo (control del vehículo) mientras que al segundo grupo no se le aplicó tratamiento alguno (control sano). Los resultados se expresaron como actividad enzimática en U/L (cantidad de enzima que produce un nmol/L de NADH por minuto) y se describieron sus variaciones en función del tiempo.

Para el estudio de las fracciones se emplearon: 100 µg/0,1 ml de la FI, 50 µg/0,1 ml de la FII y 80 µg/0,1 ml de la FIII.

Determinación de la actividad de la enzima aspartato amino transferasa (AST/SGOT).

Una dosis de 40 µg/0,1 ml del veneno de *Bothrops colombiensis* disuelta en NaCl al 0,85 % fue administrado por la vía intramuscular, en un volumen de inyección de 0,1 ml a 11 grupos de 12 ratones asignados al azar. Posteriormente a intervalos de 1, 3, 6, 15, 24 48, 72, 96, 120, 144 y 168 horas de la aplicación del tratamiento, el grupo de animales correspondiente fue anestesiado con éter y se colectó una muestra de sangre de cada uno de los animales, a través del plexo axilar. Las muestras recolectadas se depositaron en tubos eppendorf limpios y secos por grupo de tratamiento, se centrifugaron a 3000 rpm durante 10 min. y recolectó el suero, donde se cuantificó la actividad de la enzima AST/SGOT utilizando un kit de diagnóstico *in vitro* de Stanbio Laboratory® (Procedimiento N° 2920. Ver anexos). Los controles incluidos fueron constituidos por dos grupos adicionales de 12 ratones, de los cuales un grupo se inoculó con 0,1 ml del vehículo (control del vehículo) mientras que al segundo no se le aplicó tratamiento alguno (control sano). Los resultados se expresaron como actividad enzimática en U/L (cantidad de enzima que produce un nmol/L de NADH por minuto) y se describieron sus posibles variaciones en función del tiempo.

Para el estudio de las fracciones se emplearon: 100 µg/0,1 ml de la FI, 50 µg/0,1 ml de la FII y 80 µg/0,1 ml de la FIII.

Determinación de creatinina en suero de ratones

Una dosis de 40 µg/0,1 ml del veneno de *Bothrops colombiensis* disuelta en NaCl al 0,85 % fue administrado por la vía intramuscular, en un volumen de inyección de 0,1 ml a 11

grupos de 12 ratones asignados al azar. Posteriormente a intervalos de 1, 3, 6, 15, 24 48, 72, 96, 120, 144 y 168 horas de la aplicación del tratamiento, el grupo de animales correspondiente se anestesió con éter y se colectó una muestra de sangre de cada uno de los animales, a través del plexo axilar. Las muestras se recolectaron en tubos eppendorf limpios y secos por grupo de tratamiento, posteriormente por centrifugación a 3000 rpm se recolectó el suero, donde se cuantificaron los niveles de creatinina empleando un kit de diagnóstico *in vitro* de Stanbio Laboratory® (Procedimiento N° 0420. Ver anexos). Los controles incluidos, estuvieron constituidos por dos grupos adicionales de 12 ratones, de los cuales un grupo se inoculó con 0,1 ml del vehículo (control del vehículo) mientras que al segundo no se le aplicó tratamiento alguno (control sano). Los resultados fueron expresados en mg/dl. y se describieron sus posibles variaciones en función del tiempo.

Para el estudio de las fracciones se emplearon: 100 µg/0,1 ml de la FI, 50 µg/0,1 ml de la FII y 80 µg/0,1 ml de la FIII.

Determinación de urea (BUN) en suero de ratones

Una dosis de 40 µg/0,1 ml del veneno de *Bothrops colombiensis* disuelta en NaCl al 0,85 % fue administrada por la vía intramuscular, en un volumen de inyección de 0,1 ml a 11 grupos de 12 ratones asignados al azar. Posteriormente a intervalos de 1, 3, 6, 15, 24 48, 72, 96, 120, 144 y 168 horas de la aplicación del tratamiento, el grupo de animales correspondiente se anestesió con éter y se colectó una muestra de sangre de cada uno de los animales, a través del plexo axilar. Las muestras fueron recolectadas en tubos eppendorf limpios y secos por grupo de tratamiento, posteriormente tras su centrifugación a 3000 rpm durante 10 min. se recolectó el suero y se cuantificaron los niveles de urea, empleando el

kit de diagnóstico *in vitro* de Stanbio Laboratory® (Procedimiento N° 2020. Ver anexo). Los controles incluidos estuvieron constituidos por dos grupos adicionales de 12 ratones, de los cuales un grupo se inoculó con 0,1 ml del vehículo (control del vehículo) mientras que al segundo no se le aplicó tratamiento alguno (control sano). Los resultados se expresaron en mg/dl. y se describieron sus posibles variaciones en función del tiempo.

Para el estudio de las fracciones se emplearon: 100 µg/0,1 ml de la FI, 50 µg/0,1 ml de la FII y 80 µg/0,1 ml de la FIII.

Determinación de glicemia en suero de ratones.

Una dosis de 40 µg/0,1 ml del veneno de *B. colombiensis* disuelta en NaCl al 0,85 % se administró por la vía intramuscular, en un volumen de inyección de 0,1 ml a 11 grupos de 12 ratones asignados al azar. Posteriormente a intervalos de 1, 3, 6, 15, 24 48, 72, 96, 120, 144 y 168 horas de la aplicación del tratamiento, el grupo de animales correspondiente se anestesió con éter y se colectó una muestra de sangre a cada uno de los animales, a través del plexo axilar. Las muestras fueron colectadas en tubos eppendorf limpios y secos por grupo de tratamiento, los cuales se centrifugaron a 3000 rpm durante 10 min. y se recolectó el suero, donde se cuantificaron los niveles de glucosa empleando un kit de diagnóstico *in vitro* de Stanbio Laboratory® (Procedimiento N° 1070. Ver anexos). Los controles incluidos estuvieron constituidos por dos grupos adicionales de 12 ratones, de los cuales un grupo se inoculó con 0,1 ml del vehículo (control del vehículo) mientras que al segundo no se le aplicó tratamiento alguno (control sano). Los resultados se expresaron como

concentración en unidades de mg/dl y se describieron sus posibles variaciones en función del tiempo.

Para el estudio de las fracciones se emplearon: 100 µg/0,1 ml de la FI, 50 µg/0,1 ml de la FII y 80 µg/0,1 ml de la FIII.

Determinación de amilasa en suero de ratones.

Una dosis de 40 µg/0,1 ml del veneno de *B. colombiensis* disuelta en NaCl al 0,85 % fue administrada por la vía intramuscular, en un volumen de inyección de 0,1 ml a 11 grupos de 12 ratones asignados al azar. Posteriormente a intervalos de 1, 3, 6, 15, 24 48, 72, 96, 120, 144 y 168 horas de la aplicación del tratamiento, el grupo de animales correspondiente se anestesió con éter y se recolectó una muestra de sangre de cada uno de los animales tratados, a través del plexo axilar. Las muestras se recolectaron en tubos eppendorf limpios y secos por grupo de tratamiento, se centrifugaron a 3000 rpm durante y se separó el suero, donde se cuantificó los niveles de amilasa empleando un kit de diagnóstico *in vitro* de Stanbio Laboratory® (Procedimiento N° 2970. Ver anexo). Los controles incluidos estuvieron constituidos por dos grupos adicionales de 12 ratones, de los cuales un grupo se inoculó con 0,1 ml del vehículo (control del vehículo) mientras que al segundo no se le aplicó tratamiento alguno (control sano). Los resultados se expresaron como actividad enzimática en U/L y se describieron sus posibles variaciones en función del tiempo.

Para el estudio de las fracciones se emplearon: 100 µg/0,1 ml de la FI, 50 µg/0,1 ml de la FII y 80 µg/0,1 ml de la FIII.

Electroforesis

La electroforesis del veneno total y de sus fracciones liofilizadas se realizó en geles de poliacrilamida, en condiciones no reducidas, de acuerdo a lo descrito por Laemmli (1970). Para esto se empleó una matriz discontinua de poliacrilamida formada por dos geles de distinta densidad. Un gel de concentración al 4,5 % y un gel de separación al 12,5 %. Las muestras de veneno total y las fracciones se diluyeron en el buffer de disolución, constituido por sodio dodecil sulfato (SDS), glicerol, buffer Tris pH 6,8 y azul de bromofenol. Luego de la corrida los geles se colorearon con azul de Coomasie y se decoloraron por inmersión en una mezcla de metanol: ácido acético: agua destilada. (25:7:68) Como referencia se empleó una mezcla estándar de pesos moleculares de amplio rango (BIO-RAD[®], Prestained SDS-PAGE, Catalog 161-03-18, Control 310006442), para estimar los pesos de las bandas obtenidas.

Evaluación Histológica

Una dosis de 40 µg/0,1 ml del veneno de *Bothrops colombiensis* disuelta en NaCl al 0,85% se administró por la vía intramuscular, en un volumen de inyección de 0,1 ml a 11 grupos de 3 ratones asignados al azar. Posteriormente a intervalos de 1, 3, 6, 15, 24 48, 72, 96, 120, 144 y 168 horas de la aplicación del tratamiento, el grupo de animales correspondiente se anestesió con éter y se tomó biopsia de los siguientes órganos: pulmón, riñón, hígado, músculo esquelético, páncreas y corazón. Las muestras de tejido recolectadas fueron fijadas de inmediato con un medio constituido por PBS con 10 % de formaldehido y fueron inmediatamente remitidas al Departamento de Patología del Instituto Nacional de Higiene Rafael Rangel para su evaluación histopatológica. Los controles incluidos estuvieron constituidos por dos grupos adicionales de 3 ratones, de los cuales un grupo se inculó con

0,1 ml del vehículo (control del vehículo) mientras que al segundo no se le aplicó tratamiento alguno (control sano).

Para el estudio de las fracciones se emplearon: 100 µg/0,1 ml de la FI, 50 µg/0,1 ml de la FII y 80 µg/0,1 ml de la FIII.

Análisis de los datos.

En la caracterización toxinológica y clínica del veneno total y las diferentes fracciones evaluadas, los datos se expresaron como la media \pm la desviación estándar de al menos 3 evaluaciones independientes.

La comparación de promedios se realizó por análisis de varianza de una vía (ANAVA), utilizando el programa estadístico STATISTIX[®] versión 1,0 (1996), considerando valores con diferencia estadísticamente significativa con un α de 0,05.

CAPITULO III

RESULTADOS

Estudio toxinológico y clínico del veneno total de *Bothrops colombiensis* (Paracotos-Edo. Miranda).

Caracterización toxinológica

Durante el estudio toxinológico del veneno total de la serpiente *Bothrops colombiensis* de la región de Paracotos en el estado Miranda, se observó que este es capaz de inducir en roedores actividad letal, hemorrágica, desfibrinante y edematizante. De igual forma, el veneno exhibió in vitro actividad coagulante sobre plasma humano y actividad tipo fosfolipasa A₂. En la tabla 3 se resumen los resultados obtenidos para las diferentes actividades evaluadas.

Tabla 3

Caracterización toxicológica del veneno total de *Bothrops colombiensis* de Paracotos-Edo. Miranda

Actividad evaluada	Dosis obtenida
DL ₅₀ (mg/kg)	4,92 ± 0,16
DHM (µg/ratón)	34,62 ± 6,25
DEM (µg/ratón)	0,62 ± 0,04
DDM (µg/ratón)	3,5
DCM (µg)	0,5
Actividad Fosfolipasa (U)	56,82 ± 2,65

DL₅₀: dosis letal cincuenta (Intraperitoneal). DHM: dosis hemorrágica mínima. DEM: dosis edematizante mínima. DDM: dosis desfibrinante mínima. DCM: dosis coagulante mínima. U: unidades

Actividad letal: la letalidad inducida por la administración intraperitoneal del veneno total de *Bothrops colombiensis* exhibió una relación dosis dependiente, se observó un

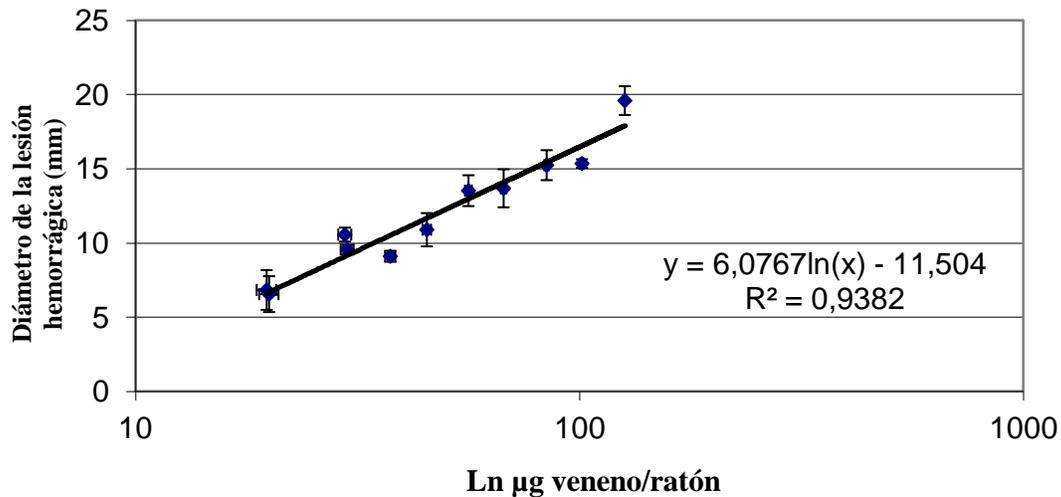
incremento de la letalidad al aumentar la dosis administrada. Se obtuvo una DL_{50} de **4,92 ± 0,16 mg/kg** (n=3) bajo las condiciones de este estudio.

En la estimación de esta actividad, se evaluaron dosis del veneno entre los 0,79-12,63 mg/Kg y se observó que con dosis iguales o inferiores a los 3,16 mg/Kg no hay signos clínicos de intoxicación en los animales tratados, mientras que con dosis equivalentes a los 6,32 mg/Kg se evidenció agarrotamiento de trenes y parálisis flácida de tren posterior y a dosis tan altas como 12,63 mg/Kg se observó en el grupo correspondiente de individuos dificultad de desplazamiento en tren posterior y anterior, exostalmo, convulsiones tónico clónicas y opistótono.

Actividad hemorrágica: en la evaluación de la actividad hemorrágica se observaron lesiones no muy bien definidas en la piel de los ratones tratados, las cuales presentaron un aspecto similar a petequias (aspecto moteado). Dichas lesiones no incrementaron su intensidad de forma dosis dependiente, a diferencia del diámetro de las mismas el cual si incrementó de manera directamente proporcional a la dosis de veneno evaluada (Gráfica 1). Adicionalmente se observó que con dosis superiores a los 44 µg, el 25% de los animales tratados, desarrolló necrosis adicional a la lesión hemorrágica, lesión que se incrementó en intensidad y número de animales afectados de forma directamente proporcional al incremento de la dosis de veneno evaluada. Se obtuvo una DHM de **34,62 ± 6,25 µg/ratón** (n=3). Mientras que en los animales tratados con solución de NaCl al 0,85 %, no se observó el desarrollo de lesión hemorrágica.

Gráfica 1

Determinación de la dosis hemorrágica mínima del veneno total de *Bothrops colombiensis* de Paracotos (Edo. Miranda).



Actividad edematizante: el edema inducido por el veneno de *Bothrops colombiensis* presentó una relación dosis dependiente, observándose un incremento del porcentaje de edema que fue directamente proporcional a la dosis de veneno evaluada (Gráfica 2). En algunos de los animales tratados, se observó que el edema se extendió más allá de la almohadilla plantar, comprometiendo toda la extremidad implicada, efecto que se manifestó con dosis tan bajas como 0,5 µg de veneno y que se hizo evidente en un mayor número de animales con el incremento de la dosis de veneno evaluada. También es de destacar, que en los animales tratados no se observó el desarrollo de hemorragia en la zona de aplicación del tratamiento, al comparar con su respectivo control (figura 6).

Gráfica 2

Determinación de la actividad edematizante del veneno total de *Bothrops colombiensis* de Paracotos (Edo. Miranda)

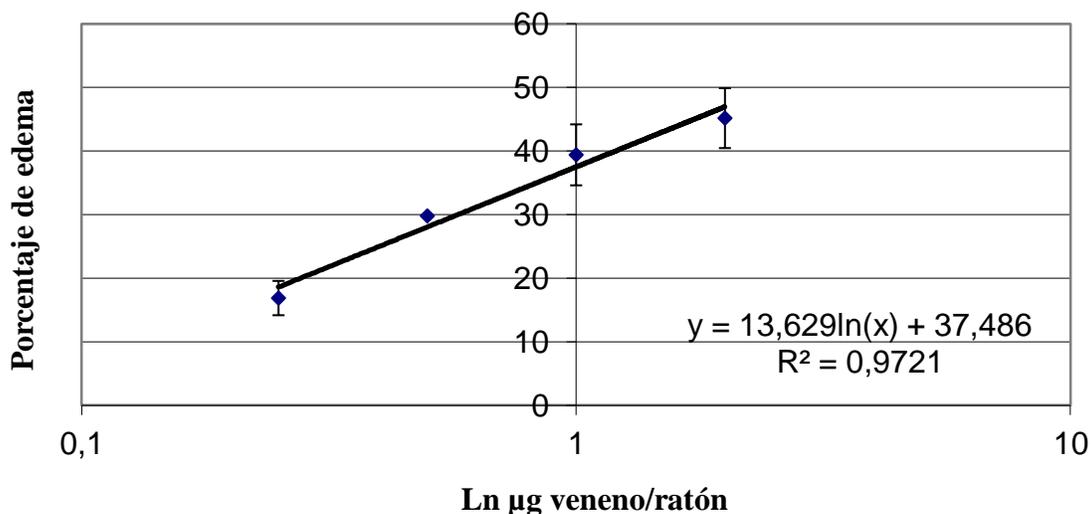


Figura 6

Actividad edematizante del veneno de *Bothrops colombiensis* de Paracotos (Edo. Miranda)

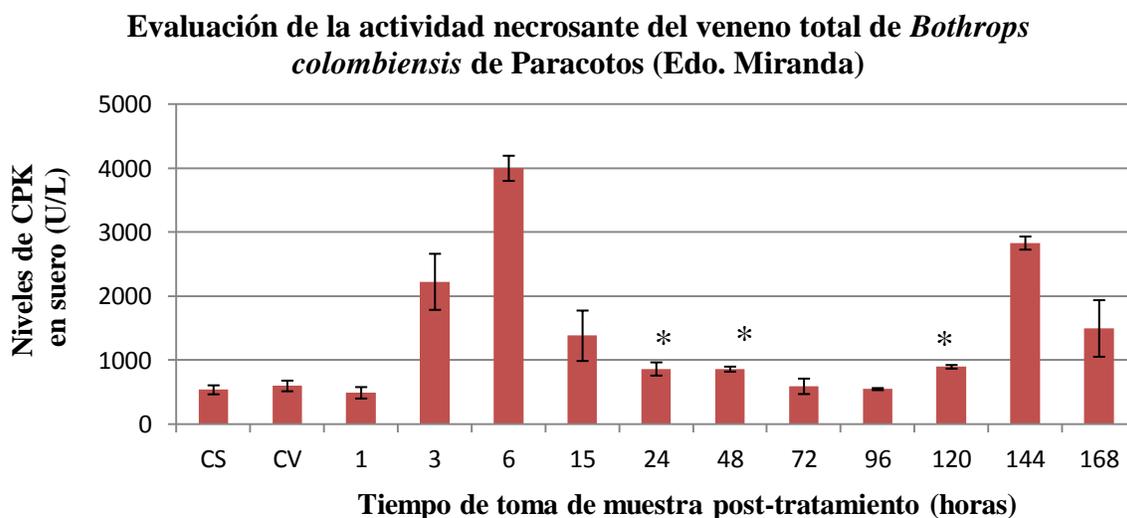


Extremidades de roedores tratadas con dosis de veneno total de **A:** 0,25 μg
B: 1 μg y **C:** 2 μg . A la izquierda control (solución NaCl 0,85%) y derecha veneno total

Actividad necrosante: en la evaluación de la actividad necrosante, medida por medio de la determinación de los niveles de la enzima CPK en suero de ratones tratados con 40 μg de veneno, se observó que los valores de actividad de dicha enzima comenzaron a incrementarse, con relación a los controles del experimento a las tres horas pos-tratamiento,

alcanzando su máxima expresión a las seis horas de exposición al veneno. A las siguientes quince horas, se observó una importante reducción de este marcador en el suero de los roedores tratados, la cual alcanzó niveles de actividad comparables a los obtenidos para los controles del experimento a las siguientes 24 horas post exposición, niveles que se observaron sin diferencia estadísticamente significativa hasta las ciento veinte horas de la aplicación del tratamiento. Finalmente a las ciento cuarenta y cuatro horas post-tratamiento, se observó un marcado incremento en los niveles de CPK seguida con una disminución importante a las siguientes ciento sesenta y ocho horas post-tratamiento, pero que no alcanzó a los niveles normales para CPK (controles sano/vehículo) obtenidos de acuerdo a las condiciones de este estudio. (Gráfica 3)

Gráfica 3



* Valores sin diferencia estadísticamente significativa de los controles (α : 0,05).
 CS: ratones sin tratamiento. CV: ratones tratados con 0,1 ml de solución NaCl 0,85 %

Actividad desfibrinante: la tabla 4 reúne los resultados obtenidos para dicha actividad, donde se evidencia una dosis desfibrinante mínima de **3,5 μ g** de veneno (n=3). Se observó

de manera general una relación dosis dependiente, con un incremento en el porcentaje de muestras de sangre incoagulables al aumentar la dosis de veneno evaluada. En el caso de los ratones tratados con la solución de NaCl al 0,85 % (vehículo), no se evidenció alteraciones en la coagulación de las muestras de sangre recolectadas, de acuerdo a las condiciones de este estudio.

Tabla 4

Determinación de la actividad desfibrinante del veneno total de *Bothrops colombiensis* de Paracotos (Edo. Miranda).

Dosis (µg/ratón)	Porcentaje de Efecto
1,0 – 2,0	0
2,5	25
3,0	50
3,5	100
4,0 – 5,5	100
Control (Solución NaCl 0,85 %)	0

Nota: en rojo DDM

Actividad Coagulante: el veneno evaluado mostró efecto pro-coagulante *in vitro*, de acuerdo a las condiciones de este estudio, con una relación dosis dependiente caracterizada por una reducción del tiempo necesario para la inducción de la coagulación del plasma al aumentar la dosis del veneno evaluado, como se evidencia en la tabla 5. Se obtuvo una **DCM** de **0,5 µg** de veneno (n=3).

Actividad tipo Fosfolipasa A₂:

El veneno total mostró actividad tipo fosfolipasa A₂ *in vitro*, al ser evaluado contra un sustrato a base de yema de huevo. Se obtuvo una actividad de **56,82 ± 2,65 U/mg** (n= 5).

Tabla 5

**Determinación de la actividad coagulante del veneno total de
Bothrops colombiensis de Paracotos (Edo. Miranda).**

Dosis (µg/0,1 ml)	Tiempo de coagulación (seg.)
0,125	119,85 ± 12,78
0,25	70,588 ± 9,97
0,5	30,32 ± 9,69
1	Coagulado sin calcio
Control (Solución NaCl 0,85 %)	369,35 ± 13,22

Nota: en rojo DCM

Caracterización Clínica

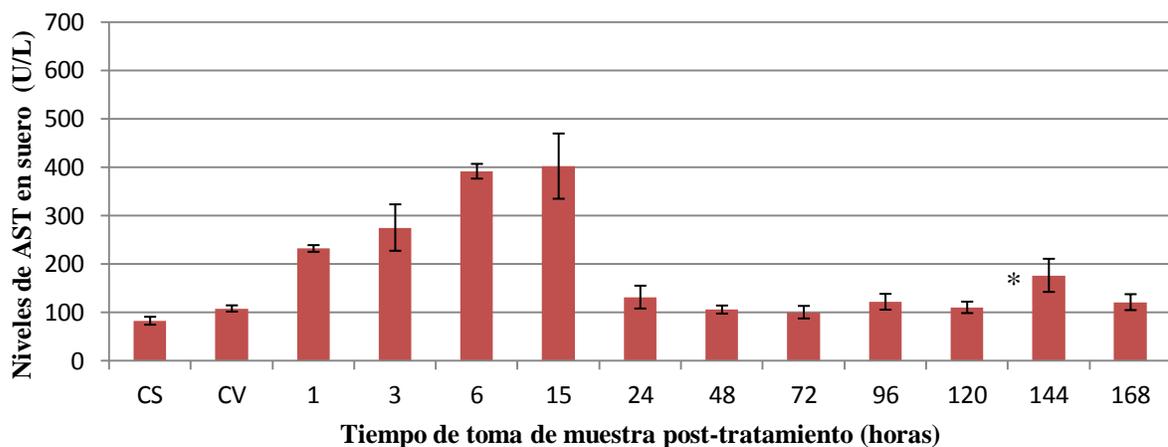
Determinación de la actividad de la enzima aspartato aminotransferasa (AST/SGOT):

en la evaluación de la actividad de esta enzima se observó un nivel de AST en suero para los grupos control sano y control salina de 82,8 ± 8,13 y 108,13 ± 6,46 U/L respectivamente, los cuales mostraron diferencias estadísticamente significativas entre sí (α : 0,05). Al comparar con este basal el resto de los tratamientos pautados, se observó que los niveles de AST en suero se incrementaron desde la primera hora post-tratamiento, alcanzando su máxima actividad a las seis horas (391,47 ± 15,21 U/L), con niveles que se mantuvieron sin diferencia estadísticamente significativa hasta las quince horas post-tratamiento. A las siguiente veinticuatro horas post exposición, se observó una importante reducción de los niveles de AST en suero, alcanzando incluso los niveles basales (131,58 ±

23,57 U/L), los cuales se mantuvieron sin diferencia estadísticamente significativa hasta las ciento veinte horas post exposición al veneno evaluado. A las ciento cuarenta y cuatro horas post-tratamiento, se observó un ligero incremento en los niveles de AST en suero a $176,47 \pm 34,16$ U/L (1,63 veces el control de vehículo), el cual se resolvió a las siguientes ciento sesenta y ocho horas donde se alcanzaron niveles de actividad de AST equivalentes a $121,45 \pm 16,47$ U/L, los cuales no presentaron diferencia estadísticamente significativa del control vehículo del experimento (Gráfica 4).

Gráfica 4

Determinación de la actividad de la enzima AST/SGOT en suero de ratones tratados con veneno total de *Bothrops colombiensis*



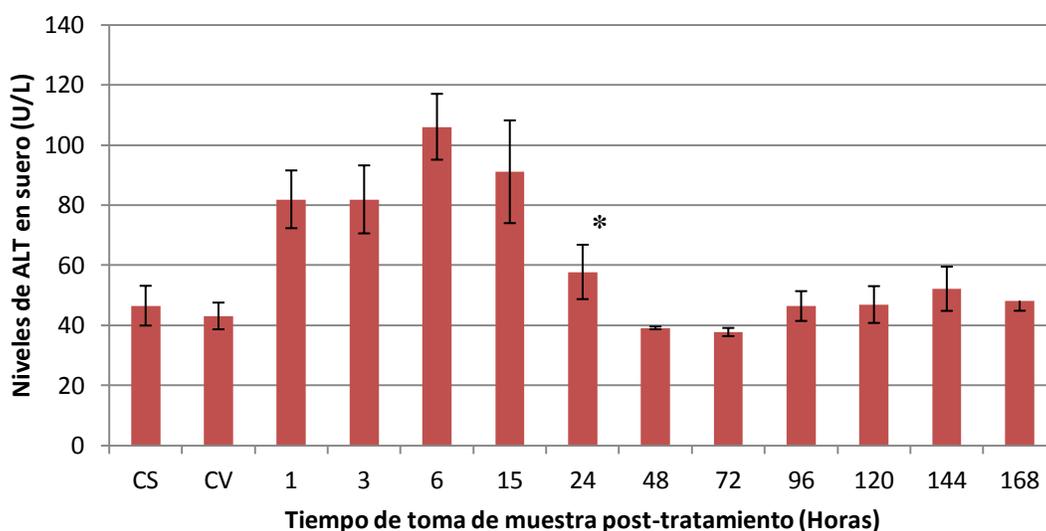
* Valores con diferencia estadísticamente significativa de los controles ($\alpha: 0,05$)
 CS: ratones sin tratamiento. CV: ratones tratados con 0,1 ml de solución NaCl 0,85 %

Determinación de la actividad de la enzima alanina aminotransferasa (ALT/SGPT): en la evaluación de la actividad de la enzima ALT en suero de ratones observamos un nivel de dicho marcador para el control sano y control salina de $46,505 \pm 6,97$ y $43,08 \pm 4,44$ U/L respectivamente, los cuales no presentaron diferencias estadísticamente significativas entre sí ($\alpha: 0,05$). Al utilizar este nivel basal como referencia para el resto de los grupos de

tratamiento, se observó que los niveles de la enzima en los animales tratados comenzaron a incrementar a la primera hora de aplicación del tratamiento (Gráfica 5), incremento que se mantuvo sin diferencia estadísticamente significativa hasta las siguientes tres horas post evaluación, alcanzando su máxima actividad a las seis horas post tratamiento ($106,05 \pm 10,96$) niveles que se mantuvieron sin diferencia estadísticamente significativa hasta las quince horas post exposición. A las siguientes veinticuatro horas, se observó un comienzo en la reducción de la actividad de la enzima, que alcanzó niveles basales a las cuarenta y ocho horas, concentración que se mantuvo constante sin diferencia estadísticamente significativa durante el resto de las evaluaciones pautadas de acuerdo al protocolo de este estudio (72-96-120-144 y 168 horas post tratamiento).

Gráfica 5

Determinación de la actividad de la enzima ALT/SGPT en suero de ratones tratados con veneno total de *Bothrops colombiensis*

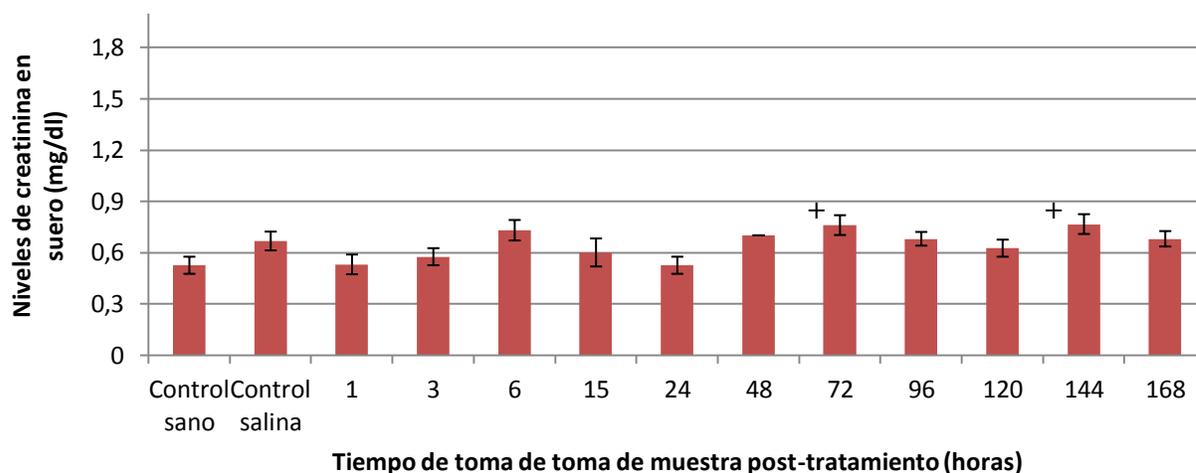


* Valores con diferencia estadísticamente significativa de los controles ($\alpha= 0.05$).
 CS: ratones sin tratamiento. CV: ratones tratados con 0,1 ml de solución NaCl 0,85 %

Determinación de creatinina: en la cuantificación de los niveles de creatinina en suero de ratones tratados con 40 µg de veneno total de *Bothrops colombiensis*, se observó que los niveles de dicho marcador para los grupos control sano y el control del vehículo de $0,525 \pm 0,05$ mg/dl y $0,667 \pm 0,055$ mg/dl respectivamente, los cuales presentaron diferencias estadísticamente significativas entre sí. Al comparar estos niveles basales con lo obtenido para los siguientes grupos del protocolo de trabajo, se observó que los niveles de creatinina sólo se incrementaron a las setenta y dos y ciento cuarenta y cuatro horas post tratamiento, alcanzando niveles de $0,76 \pm 0,058$ mg/dl y $0,766 \pm 0,058$ mg/dl respectivamente (Gráfica 6).

Gráfica 6

Determinación de creatinina en suero de ratones tratados con veneno total de *Bothrops colombiensis*



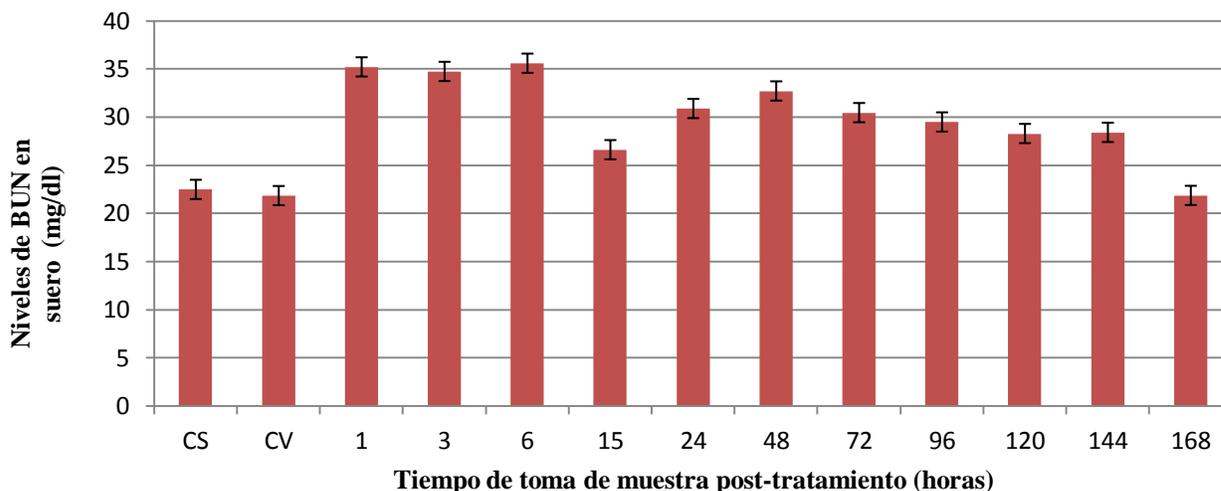
+ Valores con diferencia estadísticamente significativa de los controles ($\alpha= 0.05$).

Determinación de urea: en la determinación de los niveles de urea, se observó para los grupos control sano y control salina niveles de $22,48 \pm 0,318$ y $21,83 \pm 1,91$ mg/dl respectivamente, los cuales al ser evaluados no mostraron diferencias estadísticamente

significativas entre sí (α : 0,05). Al comparar este basal, con los niveles de urea detectados en los siguientes grupos tratados, se observó un incremento en suero de este marcador desde la primera hora post tratamiento de aproximadamente 1,6 veces los controles del experimento ($35,2 \pm 0,566$ mg/dl), nivel que se mantuvo sin diferencia estadísticamente significativa hasta las seis horas post evaluación. A las siguientes veinticuatro horas post tratamiento, se hizo evidente una discreta disminución de los niveles de urea en los roedores tratados ($30,88 \pm 2,895$ mg/dl), los cuales se mantienen sin diferencia estadísticamente significativa hasta las ciento cuarenta y cuatro horas post-tratamiento, para finalmente alcanzar su nivel basal, de acuerdo a las condiciones de este estudio, a las ciento sesenta y ocho horas siguientes (Gráfica 7).

Gráfica 7

Determinación de urea (BUN) en suero de ratones tratados con veneno total de *Bothrops colombiensis*



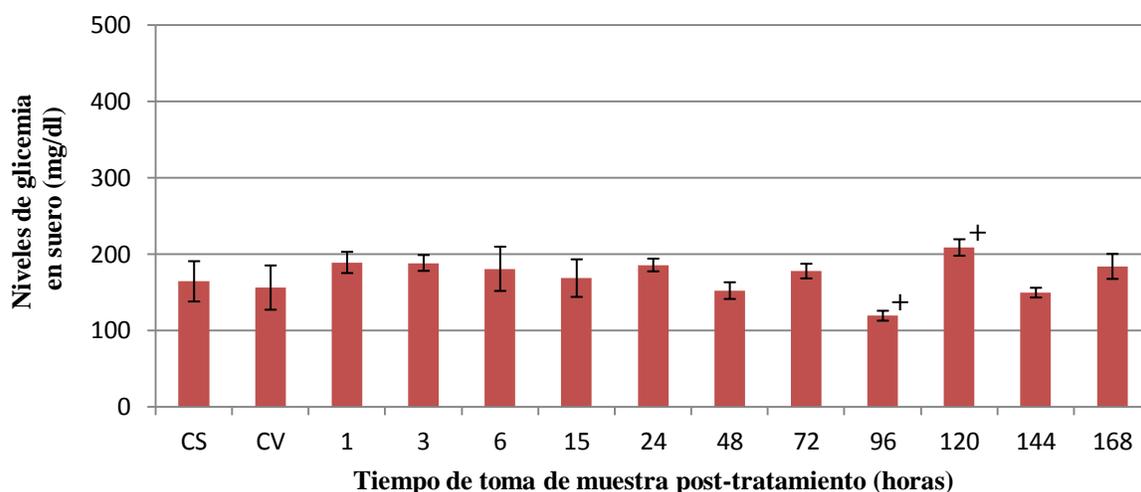
CS: ratones sin tratamiento. CV: ratones tratados con 0,1 ml de solución NaCl 0,85 %

Determinación de glicemia: en la determinación de los niveles de glicemia se observó en los grupos control sano y control salina niveles de $164,17 \pm 26,38$ y $156 \pm 28,95$ mg/dl

respectivamente, los cuales no muestran diferencias estadísticamente significativas entre sí (α : 0,05). Al comparar este nivel basal con los niveles de glicemia detectados en los siguientes grupos tratados, no se observaron diferencias estadísticamente significativas con la excepción del grupo correspondiente a las noventa y seis y ciento veinte horas, en los cuales se manifestó una reducción ($119,17 \pm 6,50$ mg/dl) y un discreto incremento en los niveles de glicemia ($208,48 \pm 10,76$ mg/dl), respectivamente (Gráfica 8).

Gráfica 8

Determinación de glicemia en suero de ratones tratados con veneno total de *Bothrops colombiensis*



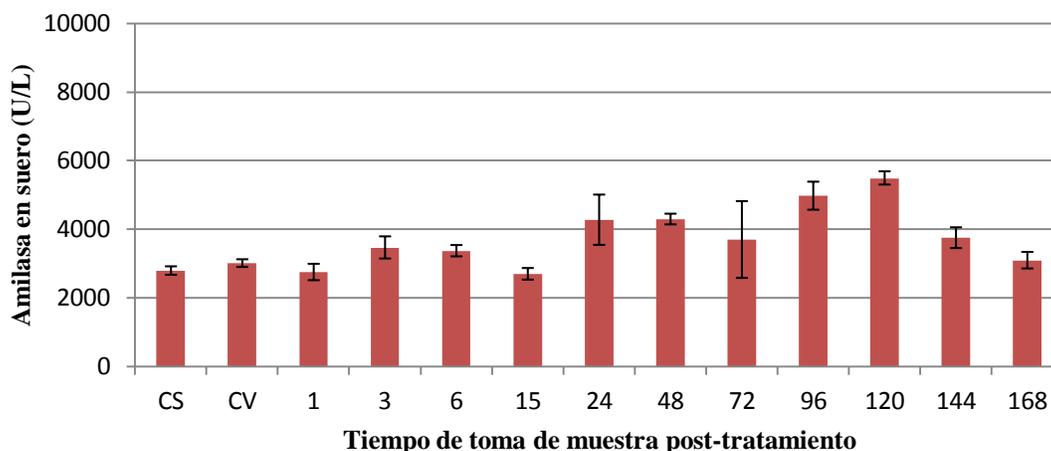
+ Valores con diferencia estadísticamente significativa de los controles ($\alpha=0,05$).
 CS: ratones sin tratamiento. CV: ratones tratados con 0,1 ml de solución NaCl 0,85 %

Determinación de amilasa: en la determinación de los niveles de amilasa se observó en los grupos control sano y control salina niveles de $2786,2 \pm 123,26$ y $3003,4 \pm 111,73$ U/L respectivamente, los cuales al ser evaluados no muestran diferencias estadísticamente significativas entre sí (α : 0,05). Al comparar este nivel basal con los niveles de amilasa detectados en los siguientes grupos tratados de acuerdo al protocolo empleado, se observó que los niveles de amilasa en suero permanecen constantes y sin diferencia significativa de

los controles desde la primera hora hasta las quince horas post-tratamiento (α : 0,05). A las veinticuatro horas post-tratamiento, se hizo evidente un incremento en los niveles de amilasa en suero ($4268 \pm 733,04$ U/L) el cual se observó constante hasta las setenta y dos horas, mientras que su máxima actividad se presentó en el grupo de ratones evaluados a las ciento veinte horas post-exposición ($5486,4 \pm 193,67$ U/L). Posteriormente a las ciento cuarenta y cuatro horas se observó el inicio del descenso de este marcador, alcanzando finalmente a las ciento sesenta y ocho horas post-tratamiento, niveles basales de actividad de acuerdo a las condiciones de este estudio (Gráfica 9).

Gráfica 9

Determinación de amilasa en suero de ratones tratados con veneno total de *Bothrops colombiensis*



CS: ratones sin tratamiento. CV: ratones tratados con 0,1 ml de solución NaCl 0,85 %

Fraccionamiento del veneno total de *Bothrops colombiensis* por cromatografía de exclusión molecular

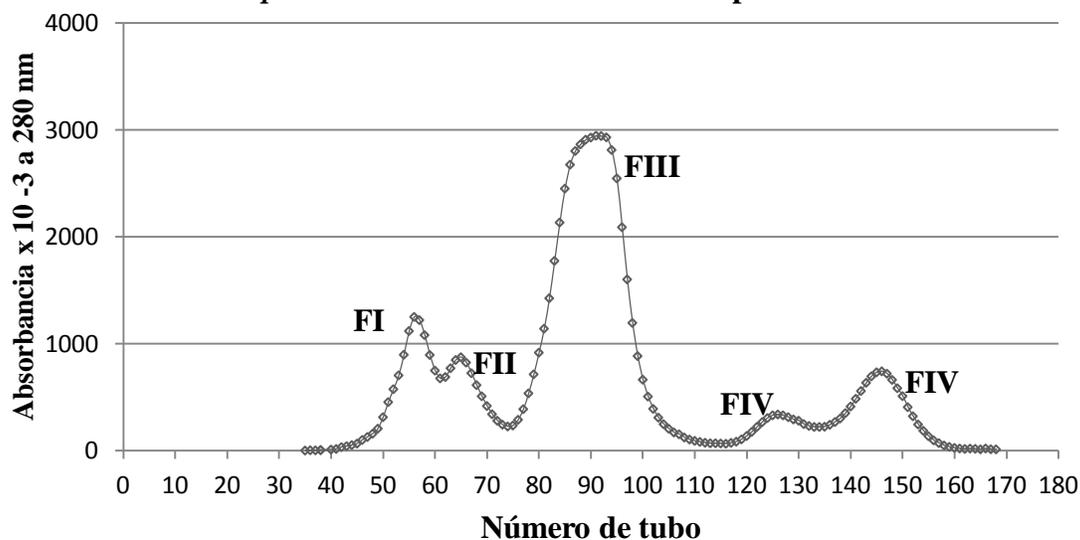
Perfil de fraccionamiento del veneno: el perfil de elusión obtenido al leer a λ de 280 nm, los eluatos obtenidos tras el desarrollo de un proceso cromatográfico por exclusión

molecular se presenta en la gráfica 10 (n= 6). En esta se observa un perfil caracterizado por 5 picos o fracciones (uno principal y 4 secundarios), los cuales fueron identificados con los números del I al V (Gráfica 10).

El pico I o Fracción I (FI) del veneno de *Bothrops colombiensis*, una vez liofilizada se caracterizó por ser un líofilo liviano, con aspecto de algodón y de color amarillo pálido. El pico II o Fracción II (FII), del veneno de *Bothrops colombiensis* tras su liofilización se obtuvo un sustrato liviano, con aspecto de algodón y de color blanco. El pico III o Fracción III (FIII), tras su liofilización se caracterizó por presentar una apariencia de cristales amorfos, muy seco, estables a temperatura y presión ambiental y de color marfil, además de ser la fracción que presentó la mayor concentración de proteínas, como se evidencia en la gráfica 10. Mientras que en el caso de los picos IV y V o fracciones IV y V (FIV y FV), una vez liofilizadas, obtuvo un líofilo que no presentó características físico-químicas adecuadas para el trabajo analítico, ya que la FIV se presentó como un residuo que al alcanzar la temperatura y la presión ambiental se hidrató impidiendo su manipulación y la FV se observó como un residuo oleoso, de color ámbar, impregnado en el fondo del vial de liofilización impidiendo también su manipulación para los diversos procedimientos planteados. Siendo en consecuencia solo viables, en base a sus características físico-químicas, para el desarrollo de las diferentes evaluaciones planteadas las Fracciones I, II y III.

Gráfica 10

Perfil de fraccionamiento del veneno total de *Bothrops colombiensis* de Paracotos en Sephadex G-100



FI: pico o Fracción I. **FII:** pico o Fracción II. **FIII:** pico o Fracción III.
FIV: Picos o fracción IV. **FV:** Pico o fracción V.

Electroforesis del veneno total de *Bothrops colombiensis* y sus fracciones

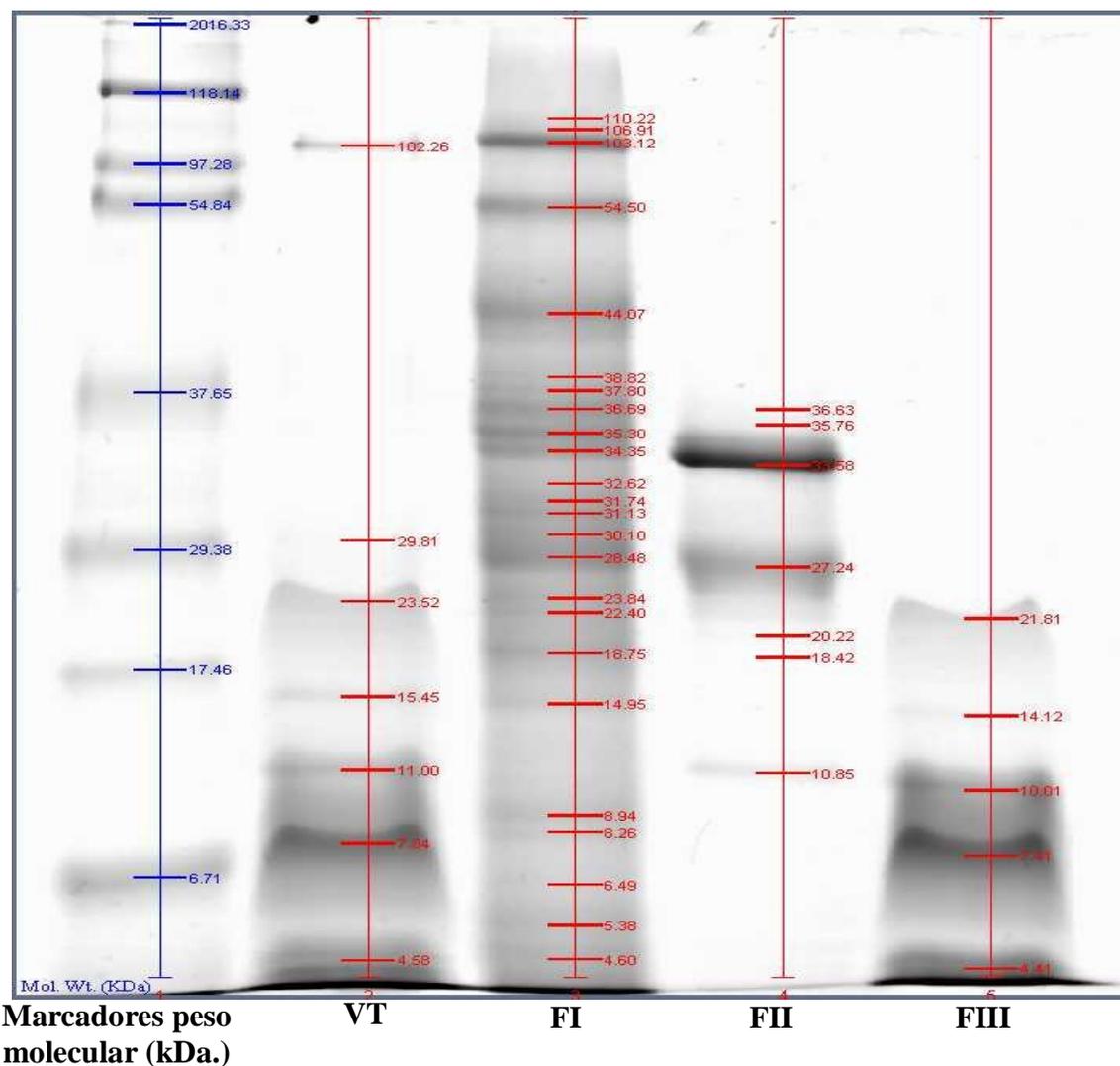
En la figura 7 se presenta el Perfil electroforético (SDS-PAGE) del veneno total y las fracciones I, II y III del veneno de la serpiente *Bothrops colombiensis* de la región de Paracotos (Edo. Miranda). El veneno total en estudio presentó siete bandas proteicas con pesos moleculares en el rango de 102,26 a 4,58 kDa, la gran mayoría de estas bandas, seis en total, se encuentran localizadas en el rango de pesos moleculares de 23,52 a 4,58 kDa, presentando mayor intensidad las localizadas al extremo inferior del rango anteriormente mencionados.

Para las fracciones, obtenidas por cromatografía de exclusión molecular, observamos en el caso de la fracción I, que ésta se resolvió en veinticuatro (24) bandas proteicas, distribuidas en un rango de pesos moleculares entre 110,22 a 4,60 kDa con una distribución que se podría señalar como no polarizada a lo largo de dicho rango. Para la fracción II se observó un total de siete fracciones proteicas, distribuidas dentro de un rango de 33,63 a 10,85 kDa. Finalmente en el caso de la fracción III tenemos un total de cinco bandas, ubicadas dentro de un rango de pesos moleculares de 21, 81 a 4,41 kDa.

Al comparar estas diferentes fracciones contra el veneno total, vemos que con la fracción I presenta tres bandas en común; localizadas en el rango de 103,12 a 14,95 kDa. Con la fracción II se evidenció dos bandas en común, con un peso molecular entre 34,58 a 27,24 kDa. Mientras que con la fracción tres observamos tres bandas en común, todas de bajo peso molecular y distribuidas en un rango entre 10,01 a 4,41 kDa.

Figura 7

Perfil electroforético (SDS-PAGE) del veneno total y fracciones de la serpiente *Bothrops colombiensis* de la región de Paracotos (Edo. Miranda)



Marcadores de peso molecular: Miosina (206,33 kDa). B-galactosidasa (118,115 kDa). Albumina de suero bovino (97,27 kDa). Ovalbumina (54,84 kDa). Anhidrasa carbónica (37,65 kDa). Inhibidor de tripsina (29,38 kDa). Lisosima (17,47 kDa). Aprotinina (6,72 kDa).

VT: veneno total. **FI:** Fracción I. **FII:** Fracción II y **FIII:** Fracción III.

Evaluación histopatológica del veneno total de *Bothrops colombiensis*

Los resultados obtenidos en el estudio histopatológico desarrollado por el Departamento de Patología del INH-RR se resumen en la tabla 6, en ésta se resumen las lesiones observadas en una serie de órganos extraídos a diferentes intervalos de tiempo, de acuerdo al protocolo de trabajo, de ratones blancos cepa INH inoculados con 40 µg de veneno total de *Bothrops colombiensis*. Se observó que para los diferentes grupos de tratamiento establecidos para este estudio, las lesiones están restringidas básicamente a **riñón, corazón y músculo esquelético**. En el caso de pulmón y páncreas los expertos reportaron que las lesiones observadas pudieran atribuirse a patología espontánea del ratón. Con relación al hígado tampoco hubo resultados concluyentes, ya que los expertos señalan existe escasa diferenciación entre la acción tóxica del tratamiento aplicado y la patología espontánea de la especie. Mientras que en el caso de los grupos control sano y control de vehículo, no hubo reporte de la observación de lesiones en los diferentes órganos evaluados.

Tabla 6

Lesiones inducidas por el veneno total de *Bothrops colombiensis* en ratón blanco cepa INH.

Tiempo de evaluación (horas)	Observación
1	Riñón: tumefacción turbia difusa (TTD) y necrosis cortical y yuxtamedular (YM) difusa. Corazón: necrosis multifocal de fibra cardiaca. Músculo: fragmentación de fibra muscular (FM) y degeneración de FM focal. Hígado: degeneración hidrópica moderada (DHM) y difusa (DHD).
3	Riñón: TTD. Corazón: fragmentación de fibras cardiacas. Músculo: fragmentación de FM. Hígado: DHD

Tabla 6 (continuación)

**Lesiones inducidas por el veneno total de
Bothrops colombiensis en ratón blanco cepa INH.**

Tiempo de evaluación (horas)	Observación
6	Riñón: TTD y necrosis cortical y YM difusa. Corazón: Sin lesión microscópica visible (SLMV). Músculo: fragmentación de FM. Hígado: DHD.
15	Riñón: TTD. Corazón: hipercontractibilidad de FM (HFM). Músculo: HFM. Hígado: DHD. Degeneracion microvacuolar difusa (DMD).
24	Riñón: TTD. Corazón: ruptura de fibra cardiaca (FC) multifocal. Músculo: HFM. Hígado: DMD.
48	Riñón: TTD. Corazón: hipercontractibilidad FC (n= 1). Músculo: HFM (n= 3). Hígado: degeneracion microvacuolar (DMV).
72	Riñón: TTD. Corazón: ruptura de FC (RFC). Músculo: HFM y FMF focal. Hígado: DMV.
96	Riñón: TTD. Corazón: RFC. Músculo: HFM y FMF focal. Hígado: DMV
120	Riñón: TTD. Corazón: SLMV. Músculo: SLMV. Hígado: DMVD y generalizada.
144	Riñón: TTD y TT generalizada. Corazón: hipercontractibilidad FMC. Músculo: Hipercontractibilidad FMF esquelética (FMFE) e hipercontractibilidad FME focal (HFMEF). Hígado: DMV.
168	Riñón: TTD. Corazón: HFMC, Degeneracion microvacuolar tóxica (DMVT). Músculo: HFME y SLMV. Hígado: DMV difusa y generalizada.
Control sano	SLMV
Control salino	SLMV(excepto casos expontaneos no atribuibles al veneno)

**Estudio toxinológico y clínico de las fracciones liofilizadas
del veneno total de *Bothrops colombiensis*.**

Caracterización Toxinológica

Los resultados obtenidos durante la caracterización toxinológica de las fracciones resultantes de la cromatografía de exclusión molecular, del veneno de *Bothrops colombiensis* de la región de Paracotos en el estado Miranda, se resumen en la tabla 7.

Fracción I

En la evaluación de la Fracción I (FI) se observó que esta indujo en roedores letalidad, actividad hemorrágica, edematizante y desfibrinante, así como actividad coagulante in vitro como se especifica en la tabla 7.

Tabla 7

Caracterización toxinológica de las Fracciones, obtenidas por cromatografía de exclusión molecular, del veneno de *Bothrops colombiensis* de Paracotos-Edo. Miranda

Actividad Evaluada	Dosis		
	Fracción I	Fracción II	Fracción III
DL_{50/IP} (mg/kg)	12,94 **	11,525 ± 1,41	7,67 ± 0,475
DHM (µg/ratón)	2,56 ± 0,072*	7,565 ± 1,096	102,54 ± 18,03
DEM (µg/ratón)	3,07 ± 0,72	14,69 ± 1,17	0,75 ± 0,029
DDM (µg/ratón)	9	0,5	NA
DCM (µg)	0,4	0,625	> 100
Actividad Fosfolipasa (U/mg)	NA	NA	79,47 ± 6,33

NA: no presentó actividad. * n= 2. ** n= 1

Actividad Letal: en la determinación de la letalidad en roedores inducida por la FI, se observó una relación dosis dependiente, con un incremento de la letalidad al aumentar la

dosis administrada. Se obtuvo una DL_{50} de **12,94 mg/kg** (n=1) bajo las condiciones de este estudio. Adicionalmente durante la evaluación de esta actividad se observó que con dosis de 400 mg/kg los roedores tratados desarrollaron caída del cuerpo y dificultad de desplazamiento.

Actividad Hemorrágica: en la evaluación de la actividad hemorrágica, se observó una relación lineal dosis dependiente (Grafica 11). Con el rango de dosis evaluado de 2-10 $\mu\text{g}/\text{ratón}$, las lesiones desarrolladas por dicho tratamiento presentaron un aspecto moteado, y no se observó el desarrollo de necrosis en la piel de los roedores. Mientras que en los animales tratados con solución de NaCl al 0,85 %, no se observó el desarrollo de lesión hemorrágica. (Figura 8). Se obtuvo una DHM de $2,56 \pm 0,072 \mu\text{g}/\text{ratón}$ (n= 2).

Gráfica 11

Determinación de la dosis hemorrágica mínima de la Fracción I del veneno de *Bothrops colombiensis* de Paracotos (Edo. Miranda).

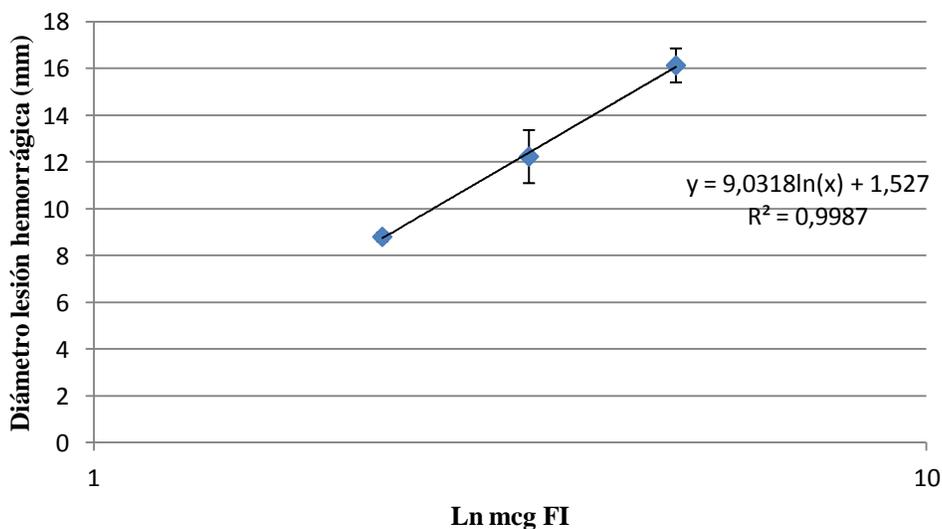
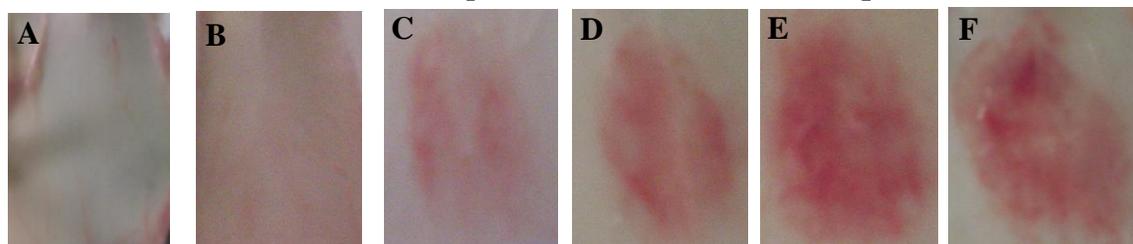


Figura 8

Aspecto de las lesiones hemorrágicas inducidas por la Fracción I del veneno de *Bothrops colombiensis* en ratones cepa INH



Piel de ratón tratado con **A:** Solución NaCl 0,85%. **B:** 1,48 µg FI. **C:** 2,22 µg FI. **D:** 3 µg FI, **E:** 6,75 µg FI y **F:** 10 µg FI.

Actividad desfibrinante: en la determinación de la actividad desfibrinante se observó, de manera general una relación dosis dependiente, con un incremento en el porcentaje de muestras de sangre incoagulables al aumentar la dosis de veneno evaluada (Tabla 8). Se obtuvo una dosis desfibrinante mínima de **9 µg** de veneno (n=3). En el caso de los ratones tratados con la solución de NaCl al 0,85 % (vehículo), no se evidenció alteraciones en la coagulación de las muestras de sangre recolectadas, de acuerdo a las condiciones de este estudio.

Tabla 8

Determinación de la actividad desfibrinante de la Fracción I del veneno de *Bothrops colombiensis* de Paracotos (Edo. Miranda).

Dosis FI (µg/ratón)	Porcentaje de efecto
Control (Sol. NaCl 0,85 %)	0
0,75-4	0
6	25
9	100
13,50	100

Nota: en rojo DDM

Por otra parte, no se puede dejar de mencionar que en dos de los cuatro individuos tratados con una dosis de 13,50 µg de la FI, se observó un cuadro clínico que implicó aumento de frecuencia cardiaca, incapacidad de desplazamiento, opistótono, convulsión tónico clónica persistente y giros sobre sí mismo. Dicho cuadro se inició en un lapso inferior a los 5 min. de la aplicación del tratamiento

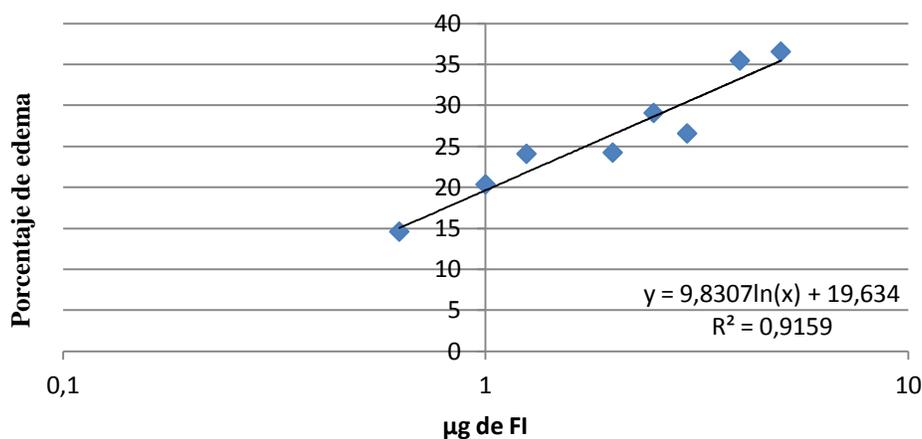
Actividad edematizante: La FI del veneno de *B. colombiensis* indujo actividad edematizante en ratones de acuerdo a las condiciones de este estudio. Durante la evaluación de esta actividad, se observó una relación dosis dependiente como se evidencia en la gráfica 12, la cual se caracterizó por un incremento del porcentaje de edema inducido al aumentar la dosis de fracción evaluada. Por otra parte, el edema observado en las extremidades de los roedores tratados con las dosis más altas empleadas, correspondientes a 2,5 y 4 µg FI se acompañó de una ligera lesión hemorrágica, restringida a la región plantar de dichas extremidades. Se obtuvo una DEM de $3,07 \pm 0,72$ µg FI/ratón (n=3).

Actividad necrosante: la FI del veneno de *B. colombiensis*, de acuerdo a las condiciones de este estudio, indujo el desarrollo de necrosis. Dicho efecto se evidenció por el incremento observado en los niveles de la enzima CPK, en el suero de algunos de los grupos tratados con 100 µg de FI, al compararlos con los controles del experimento, control sano y control de vehículo en los cuales se detectaron niveles de CPK de $933,3 \pm 87,25$ U/L y $1074,9 \pm 38,33$ U/L respectivamente, como se evidencia en la gráfica 13. En dicha gráfica tenemos que para los controles del experimento control sano y control del vehículo, al evaluados estadísticamente se observó diferencia significativa entre ambos. Al emplear estos niveles

como referencia basal, observamos un incremento de este marcador de lesión celular a las veinticuatro horas post-tratamiento alcanzando niveles $1559,7 \pm 133,669$ U/L, los cuales se mantuvieron estables hasta las cuarenta y ocho horas post-evaluación ($1560,2 \pm 166,02$ U/L), la máxima actividad de esta enzima se alcanzó a las setenta y dos horas de exposición con niveles de $1560,2 \pm 166,02$ U/L, lo cual fue seguido de una marcada reducción de estos niveles a las noventa y seis horas post aplicación del tratamiento, alcanzando niveles sin diferencia estadísticamente significativa de los controles del experimento (sano y vehículo).

Gráfica 12

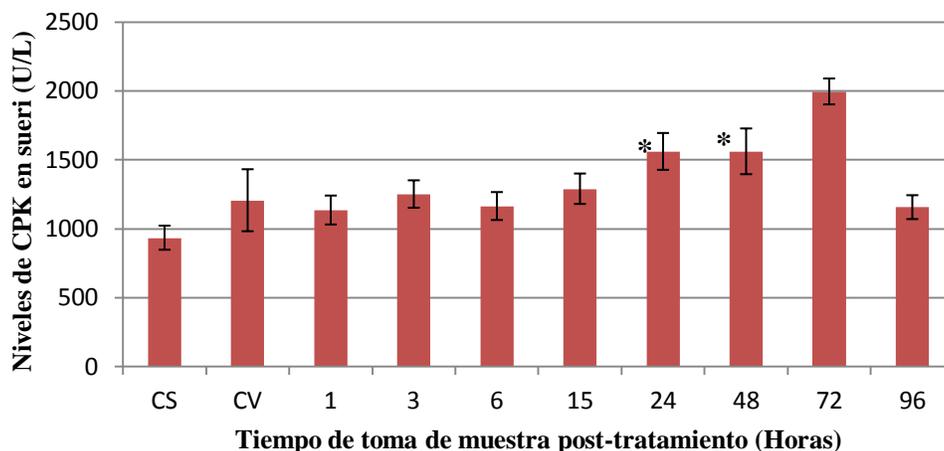
Determinación de la actividad edematizante de la Fracción I del veneno de *Bothrops colombiensis* de Paracotos (Edo. Miranda).



Así mismo, es importante mencionar que los animales tratados con 100 µg de la FI por la vía IM, presentaron lesiones con aspecto hemorrágico en la extremidad tratada, para los grupos de experimentación correspondientes a las 1, 3, 6, 15, 24 y 48 horas, a diferencia de los individuos que formaron los grupos control sano y principalmente control del vehículo. (Figura 9).

Gráfica 13

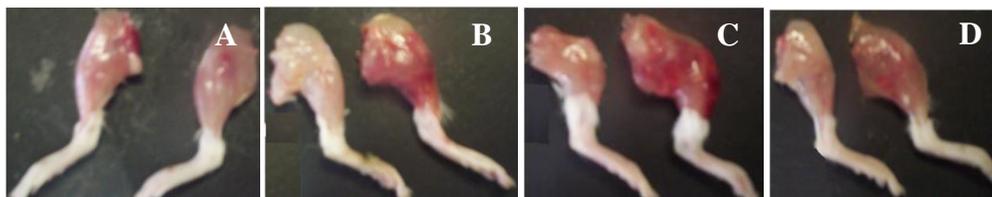
Determinación de la actividad necrosante de la Fracción I del veneno de *Bothrops colombiensis* de Paracotos (Edo. Miranda).



* Valores con diferencia estadísticamente significativa de los controles ($\alpha= 0.05$).
CS: ratones sin tratamiento. CV: ratones tratados con 0,1 ml de solución NaCl 0,85 %

Figura 9

Lesiones desarrolladas por la inyección IM de 100 μ g de la Fracción I a ratones



A: Extremidades de individuo Control de vehículo (Izq. Extremidad no tratada. Der. Extremidad tratada con Sol. NaCl 0,85 %). **B:** extremidades de individuo expuesto durante 15 horas **C:** extremidades de individuo expuesto durante 48 horas **D:** extremidades de individuo expuesto durante 72 horas. (Izq. Extremidad no tratada. Der. Extremidad inyectada con FI).

Actividad Coagulante: la FI del veneno de *B. colombiensis*, presentó actividad coagulante *in vitro* sobre plasma humano. Los resultados obtenidos se presentan en la **Tabla 9**, en la cual se evidencia una relación lineal dosis dependiente, caracterizada por la disminución del tiempo de coagulación al incrementar la concentración de la fracción del veneno evaluada. Se obtuvo una dosis coagulante mínima de **0,4 μ g** de la FI.

Tabla 9

Determinación de la actividad coagulante de la Fracción I del veneno de *Bothrops colombiensis* de Paracotos (Edo. Miranda).

Dosis Evaluada ($\mu\text{g}/0,1 \text{ ml}$)	Tiempo de coagulación Media $\pm \sigma$ (seg)
0,8	Coagulado sin calcio
0,4	8,74 \pm 2,17
0,2	30,78 \pm 1,33
0,1	81,16 \pm 1,63
Control (Sol. NaCl 0,85 %)	463,45 \pm 8,93

Nota: en rojo DCM

Actividad tipo Fosfolipasa A₂:

La FI del veneno de *B. colombiensis* no presentó actividad fosfolipasa A₂, lo cual se evidenció por qué no hubo consumo de la solución de hidróxido de sodio al 0,01 N al incorporar una dosis de hasta 200 $\mu\text{g}/10 \mu\text{l}$ de la FI al sustrato de yema de huevo empleado para su valoración, de acuerdo a las condiciones de este estudio.

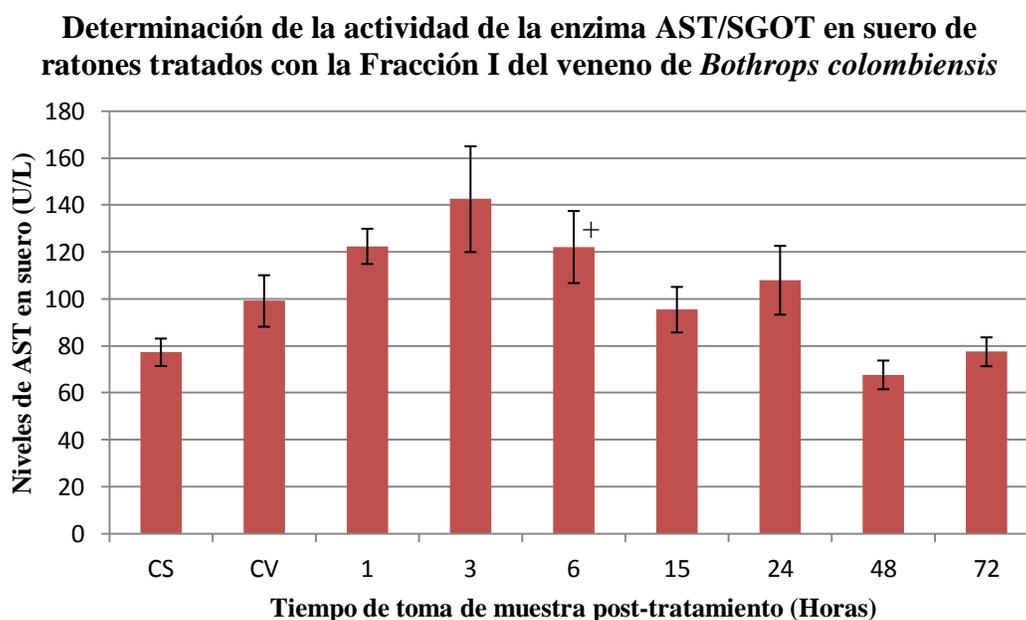
Caracterización Clínica de la Fracción I del veneno total de *Bothrops colombiensis*

Determinación de la actividad de la enzima aspartato aminotransferasa (AST/SGOT):

La fracción I del veneno de *B. colombiensis* indujo incremento de los niveles del marcador AST en suero de ratones como se presenta en la gráfica 14. En ésta se observa para los grupos control sano y control de vehículo niveles de 77,3 \pm 5,846 y 99,175 \pm 10,97 U/L respectivamente, los cuales muestran diferencias estadísticamente significativas entre sí (α : 0,05). Al comparar estos niveles basales, con los niveles de AST detectados en los diferentes grupos, tratados con 100 μg de fracción I de acuerdo al protocolo empleado, observamos que la actividad de la enzima AST en suero se incrementó desde la primera hora post tratamiento alcanzando valores 122,45 \pm 7,488 U/L y alcanzó su máxima

actividad a las tres horas de exposición con niveles de $142,53 \pm 22,54$ U/L, equivalentes a 1,44 veces el control de vehículo, niveles que se observaron sin diferencia estadísticamente significativa hasta las 6 horas post exposición. A las quince horas siguientes los niveles de AST en los grupos correspondientes se observaron sin diferencia estadísticamente significativa del control de vehículo del experimento, niveles que se mantuvieron estables hasta las 24 horas, para finalmente a las 48 y 72 horas siguientes alcanzar niveles equivalentes al del grupo control sano.

Gráfica 14

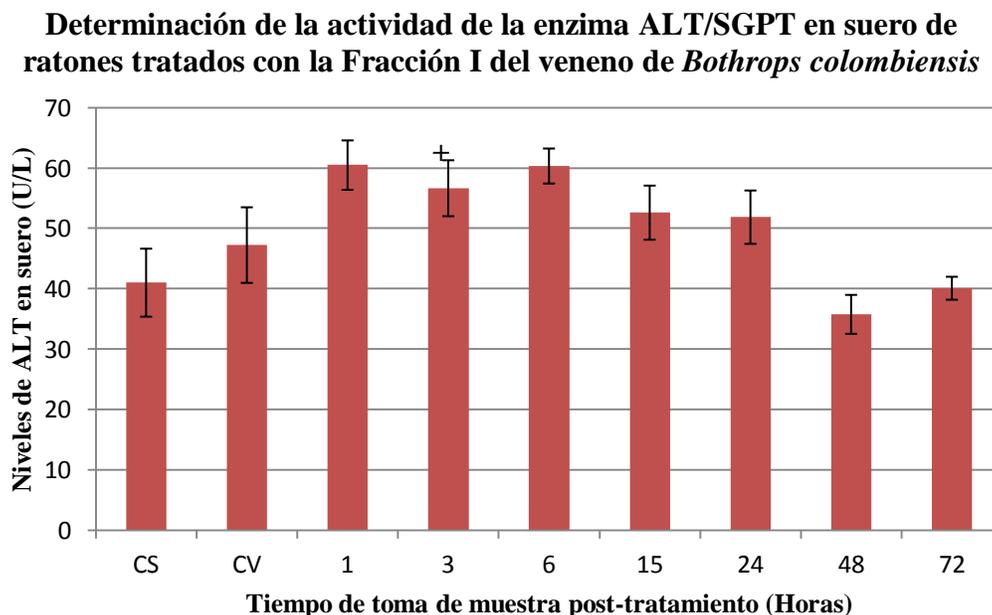


+ Valores con diferencia estadísticamente significativa de los controles ($\alpha= 0.05$).
 CS: ratones sin tratamiento. CV: ratones tratados con 0,1 ml de solución NaCl 0,85 %

Determinación de la actividad de la enzima alanina aminotransferasa (ALT/SGPT): en la evaluación de la actividad de la enzima ALT, en suero de ratones tratados con 100 μ g de FI, se observó un nivel de actividad de dicho marcador para el control sano y control de

vehículo de $41,025 \pm 5,631$ y $47,25 \pm 6,264$ U/L respectivamente, los cuales no presentan diferencias estadísticamente significativas entre sí ($\alpha: 0,05$). Al utilizar este nivel basal como referencia para el resto de los grupos de ratones tratados, con la fracción I de acuerdo al protocolo empleado, observamos que los niveles de actividad de esta enzima en suero se incrementó ligeramente desde la primera hora post-tratamiento, alcanzando niveles equivalentes a 1,28 veces el control de vehículo, los cuales se mantuvieron significativamente estables durante las siguientes tres y seis horas de evaluación post tratamiento. Para finalmente alcanzar niveles de actividad enzimática, sin diferencia estadísticamente significativa del control de vehículo y del control sano del experimento a las quince y cuarenta y ocho horas respectivamente. (Gráfica 15)

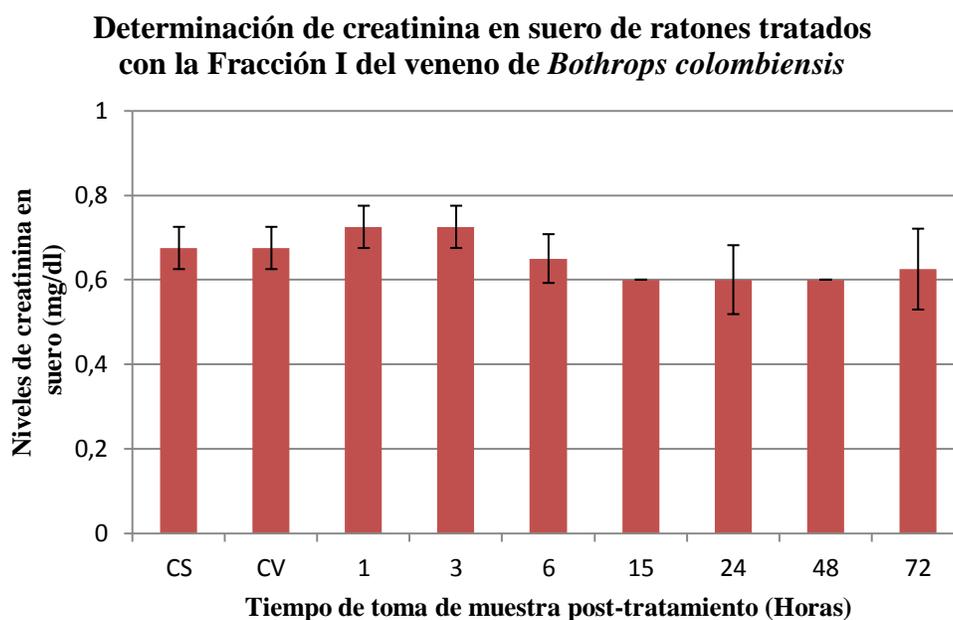
Gráfica 15



+ Valores con diferencia estadísticamente significativa de los controles ($\alpha= 0.05$).
 CS: ratones sin tratamiento. CV: ratones tratados con 0,1 ml de solución NaCl 0,85 %

Determinación de creatinina: en la cuantificación de los niveles de creatinina en suero de ratones tratados con 100 µg de fracción I del veneno de *Bothrops colombiensis*, se observó que los grupos de control sano ($0,675 \pm 0,05$ mg/dl) y control del vehículo ($0,675 \pm 0,05$ mg/dl) no presentan diferencias estadísticamente significativas entre sí. Al comparar estos niveles basales con los siguientes grupos del protocolo del trabajo, se observó que no existe diferencia estadísticamente significativa con los niveles de creatinina en suero detectados para los diferentes grupos evaluados ($\alpha: 0,05$). (Grafica 16)

Gráfica 16



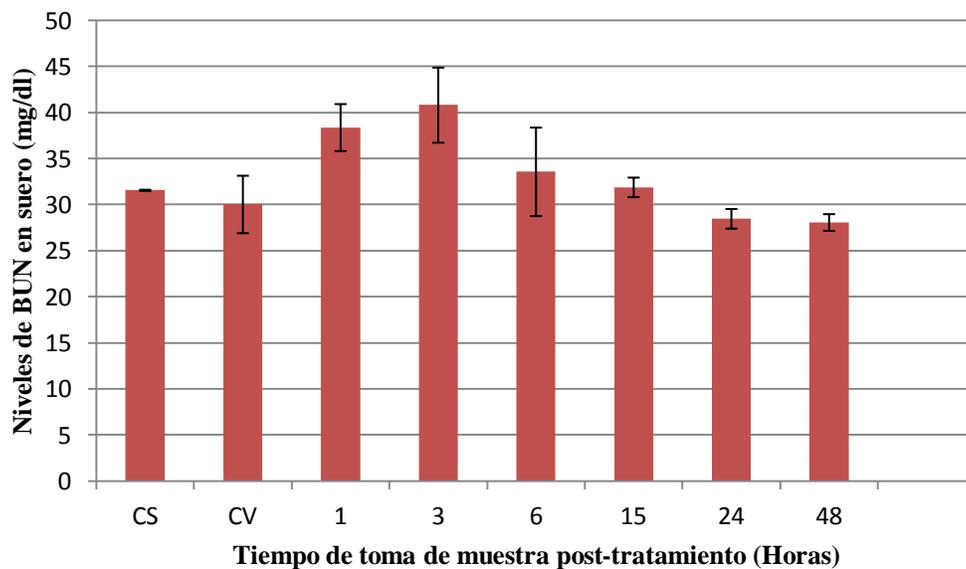
CS: ratones sin tratamiento. CV: ratones tratados con 0,1 ml de solución NaCl 0,85 %

Determinación de urea: en la determinación de los niveles de urea en suero de ratones tratados con 100 µg de fracción I del veneno de *Bothrops colombiensis*, se observó para los grupos control sano y control de vehículo niveles de $31,55 \pm 0,071$ y $30,025 \pm 3,12$ mg/dl respectivamente, los cuales no mostraron diferencias estadísticamente significativas entre sí. Al comparar este nivel basal con los niveles de urea detectados en los siguientes grupos

del protocolo del trabajo, se observó un ligero incremento a la primera hora post exposición a la fracción en estudio a $38,367 \pm 2,55$ mg/dl, nivel que se mantuvo relativamente estable ($40,80 \pm 4,073$ mg/dl) y sin diferencia estadísticamente significativa hasta las 3 horas post-exposición. A partir de las 6 horas de aplicación del tratamiento se alcanzaron valores sin diferencia estadísticamente significativa de los controles (sano y vehículo) del experimento, los cuales se mantuvieron estables en los siguientes grupos experimentales evaluados, los cuales son correspondientes a las 15, 24 y 48 horas post-exposición al tratamiento aplicado (Gráfica 17).

Gráfica 17

Determinación de urea (BUN) en suero de ratones tratados con la Fracción I del veneno de de *Bothrops colombiensis*

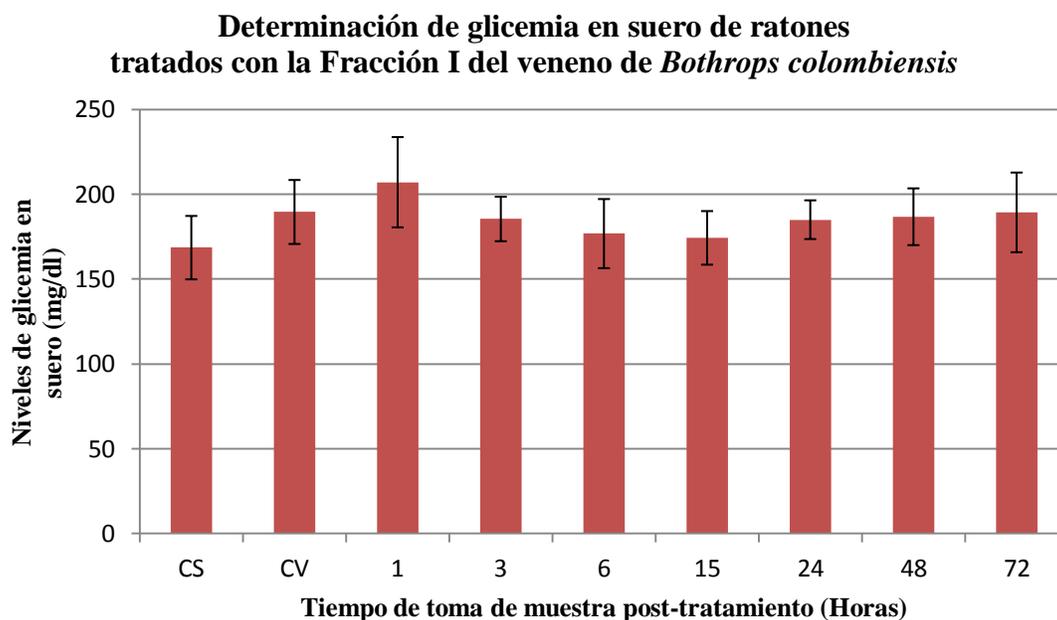


CS: ratones sin tratamiento. CV: ratones tratados con 0,1 ml de solución NaCl 0,85 %

Determinación de glicemia: en la determinación de los niveles de glicemia en suero de ratones tratados con 100 µg de fracción I del veneno de *Bothrops colombiensis*, se obtuvo para los grupos control sano y control de vehículo niveles de $168,53 \pm 18,68$ y $189,55 \pm$

18,85 mg/dl respectivamente, los cuales no muestran diferencias estadísticamente significativas entre sí. Al comparar estos niveles basales con los siguientes grupos del protocolo del trabajo, se observó que no existe diferencia estadísticamente significativa con los niveles de glicemia en suero detectados para los diferentes grupos evaluados (α : 0,05), como se evidencia en la gráfica 18.

Gráfica 18

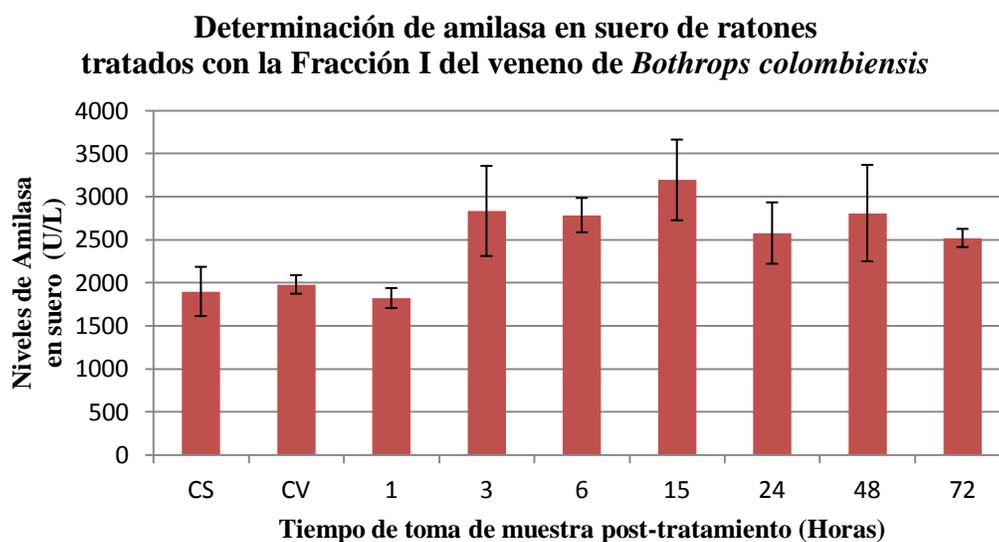


CS: ratones sin tratamiento. CV: ratones tratados con 0,1 ml de solución NaCl 0,85 %

Determinación de amilasa: en la determinación de los niveles de amilasa en suero de ratones tratados con 100 μ g de fracción I del veneno de *Bothrops colombiensis*, se obtuvo para los grupos control sano y control de vehículo niveles de $1898,7 \pm 286,07$ y $1979,93 \pm 107,43$ U/L respectivamente, los cuales no muestran diferencias estadísticamente significativas entre sí (α : 0,05). Al comparar este nivel basal con los niveles de amilasa detectados en los siguientes grupos tratados de acuerdo al protocolo empleado, se observó

que los niveles de amilasa en suero comienzan a incrementarse a las tres horas de exposición al tratamiento evaluado, alcanzando niveles de aproximadamente 1,5 veces el control sano y 1,43 veces el control de vehículo. Dicho niveles se mantuvieron relativamente estables y sin diferencia estadísticamente significativa entre sí (α : 0,05), hasta las 72 horas post tratamiento, último grupo de ratones evaluado para el tratamiento aplicado (Gráfica 19).

Gráfica 19



CS: ratones sin tratamiento. CV: ratones tratados con 0,1 ml de solución NaCl 0,85 %

Evaluación histopatológica de los efectos inducidos por la Fracción I del veneno de *Bothrops colombiensis* en ratones blancos cepa INH.

Los resultados obtenidos en el estudio histopatológico se resumen en la tabla 10. En ésta se presentan las lesiones presentadas en ratones blancos cepa INH tratados con 100 µg de la Fracción I del veneno total de *Bothrops colombiensis*, observamos que para los diferentes grupos de tratamiento establecidos para este estudio, las lesiones están restringidas

básicamente a **páncreas, corazón y músculo esquelético**. En el caso de pulmón las lesiones reportadas se consideró pudieran ser atribuidas a patología espontanea de los roedores, mientras que en los casos de el hígado y el riñón (específicamente con la glomerulonefritis) los expertos reportaron que para las lesiones observadas, en dichos órganos, existe escasa diferenciación entre la acción tóxica del tratamiento aplicado y la patología espontanea de la especie.

Tabla 10

**Lesiones inducidas por la Fracción I del veneno de
Bothrops colombiensis en ratón blanco cepa INH.**

Tiempo de evaluación (horas)	Observación
1	Páncreas: sin lesión microscópicamente visible (SLMV) Corazón: hipercontractibilidad focal fibras cardiacas. (HFFC) Músculo: SLMV. Hígado: degeneración hidrópica difusa (DHD). Degeneración macrovascular focal, degeneración multifocal de hepatocitos, infiltrado inflamatorio focal.
3	Páncreas: degeneración multifocal leve de acinos. Corazón: congestión de vasos sanguíneos (CVS), HFC. Músculo: hipercontractibilidad multifocal de fibras musculares esqueléticas (HCMFM). Hígado: Degeneración difusa de hepatocitos (DDH), degeneración microvacuolar.
6	Páncreas: degeneración multifocal leve de acinos, infiltrado inflamatorio perivascular focal y degeneración leve de células de Islotes de Langerhans. Corazón: CVS, HFC, Fragmentación fibras cardiacas. Músculo: degeneración leve de fibras musculares esqueléticas. Hígado: CVS, degeneración leve de hepatocitos, degeneración microvacuolar.
15	Páncreas: degeneración multifocal de acinos. Corazón: hemorragia, CVS e HCFC. Músculo: degeneración focal de fibras musculares esqueléticas, hipercontractibilidad multifocal. Hígado: DHD, degeneración multifocal de hepatocitos y degeneración microvascular difusa.

Tabla 10 (Continuación)

**Lesiones inducidas por la Fracción I del veneno de
Bothrops colombiensis en ratón blanco cepa INH.**

Tiempo de evaluación (horas)	Observación
24	Páncreas: degeneración multifocal leve de acinos, congestión de capilares y leve infiltrado inflamatorio alrededor de conductos excretores. Corazón: HFC. Músculo: degeneración focal y multifocal de fibras musculares esqueléticas. HCMFM. Hígado: DHD, edema sinusoidal periférico, degeneración hidrópica diseminada.
48	Páncreas: degeneración leve de acinos pancreático y CVS. Corazón: Hipercontractibilidad focal de fibras cardíacas. Músculo: hipercontractibilidad focal y multifocal de fibras musculares esqueléticas, degeneración focal de fibras musculares esqueléticas. Hígado: degeneración microvacular diseminada, degeneración difusa de los hepatocitos, DHD y CVS
72	Páncreas: degeneración leve de acinos. Corazón: HCFC focal y difusa. Músculo: miositis leve, degeneración difusa y focal de fibras musculares esqueléticas, hipercontractibilidad diseminada. Hígado: degeneración microvacular multifocal, degeneración focal y multifocal de los hepatocitos, CVS, DHD y degeneración microvascular difusa con núcleos activos y cromatina dispersa.
Control Sano	Solo lesiones atribuidas a patología espontanea de la especie.
Control Vehículo	Solo lesiones atribuidas a patología espontanea de la especie.

Fracción II

La FII del veneno de *Bothrops colombiensis* evaluada de acuerdo a las condiciones de este estudio exhibió letalidad, actividad desfibrinante, hemorrágica y necrosante en roedores, así como actividad coagulante in vitro sobre plasma humano, como se especifica en la tabla 7.

Actividad Letal: en la determinación de la letalidad en roedores inducida por la FII, se observó una relación dosis dependiente, con un incremento de la letalidad al aumentar la

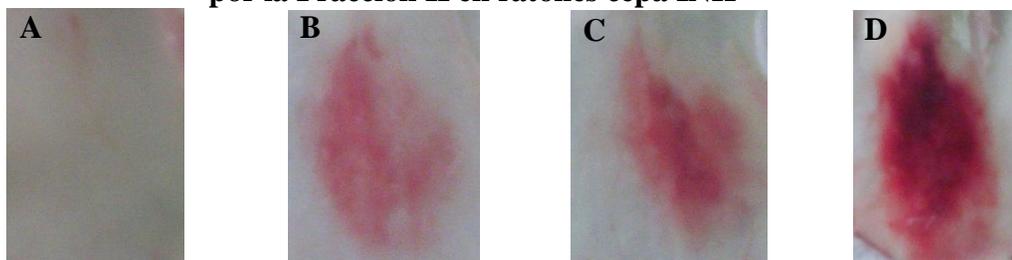
dosis administrada. Se obtuvo una $DL_{50/IP}$ de **11,52 ± 1,41** mg/kg (n= 2) bajo las condiciones de este estudio.

Durante la evaluación de esta actividad se empleó un rango de dosis de 1,32 a 21,05 mg/kg, con éstas diferentes dosis evaluadas se observó una sintomatología que incluyó, para dosis de FII de 1,32 a 5,26 mg/kg pilo-erección y contractura diafragmática en los ratones tratados, con dosis de 10,53 mg/kg los ratones tratados presentaron pilo-erección, contractura diafragmática y parálisis flácida de tren posterior, mientras que con dosis tan altas como 21,05 mg/kg se observó en el grupo de individuos tratados aumento de la frecuencia cardiaca, parálisis flácida de trenes anterior y posterior, incapacidad de desplazamiento y convulsión tónico clónica con giro sobre su eje.

Actividad Hemorrágica: la FII del veneno de *Bothrops colombiensis* indujo actividad hemorrágica en piel de roedores, de acuerdo a las condiciones de este estudio, se obtuvo una DHM de **7,565 ± 1,096** µg/ratón de acuerdo a los datos de la gráfica 12. Sin embargo no se observó una relación lineal, dosis dependiente, entre las concentraciones de FII empleadas y el diámetro de la lesión hemorrágica desarrollada en la piel de roedores, a diferencia de la intensidad de la lesión, aspecto que si se incrementó de forma directamente proporcional al aumento de la concentración de fracción evaluada. (Figura, 10).

Figura 10

Aspecto de las lesiones hemorrágicas inducidas por la Fracción II en ratones cepa INH



A: ratón tratado con solución de NaCl 0,85 %. **(Control negativo)**
Ratones tratados con FII: B: 12 µg/ratón. **C:** 24 µg/ratón y **D:** 48 µg/ratón.

Actividad desfibrinante: la FII del veneno de *Bothrops colombiensis* presentó actividad desfibrinante en roedores, como se evidencia en la Tabla 11. En el caso de los ratones tratados con la solución de NaCl al 0,85 % (vehículo), no se evidenció alteraciones en la coagulación de las muestras de sangre recolectadas, de acuerdo a las condiciones de este estudio y tampoco se observó una relación lineal entre la dosis de veneno empleado y el efecto evaluado. Se obtuvo una DDM de **0,5 µg** de FII (Tabla 11).

Tabla 11

Determinación de la actividad desfibrinante de la Fracción II del veneno de *Bothrops colombiensis* de Paracotos (Edo. Miranda).

Dosis FII (µg/ratón)	Porcentaje de efecto
Control (Solución NaCl 0,85 %)	0
0,25	0
0,5	100
1	100

Nota: en rojo DDM

Actividad edematizante: La FII del veneno de *Bothrops colombiensis* indujo actividad edematizante en ratones de acuerdo a las condiciones de este estudio. Durante la evaluación de dicha actividad se observó una relación dosis dependiente, como se evidencia en la gráfica 20, la cual se caracterizó por un incremento del porcentaje de edema inducido al aumentar la dosis de fracción evaluada. Se obtuvo una **DEM de 14,69 ± 1,17 µg FII/ratón** (n=3). Adicionalmente el edema desarrollado en roedores por esta fracción, del veneno de *B. colombiensis*, se acompañó por una importante lesión hemorrágica en la zona de aplicación del tratamiento, lesión que se incrementó en intensidad al aumentar la concentración de la fracción evaluada. (Figura 11).

Gráfica 20

Determinación de la actividad edematizante de la Fracción II del veneno de *Bothrops colombiensis* de Paracotos (Edo. Miranda).

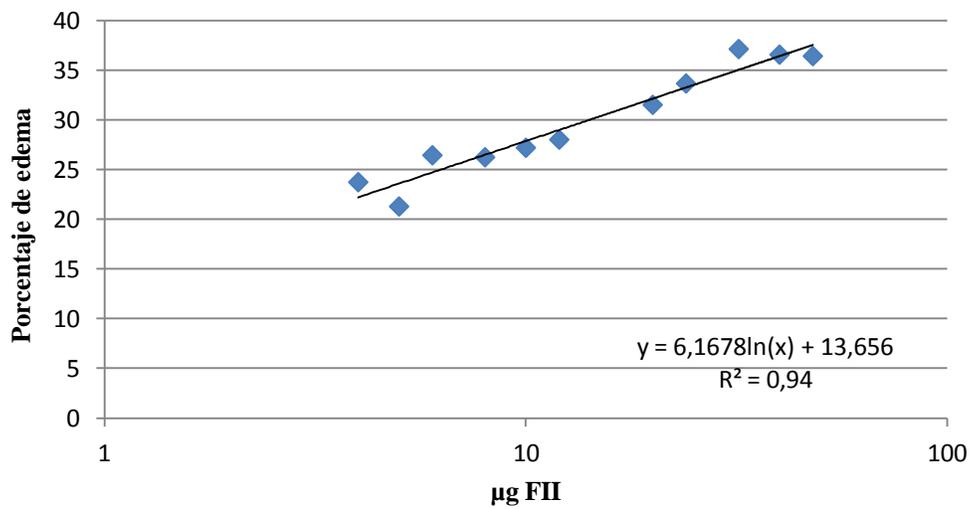
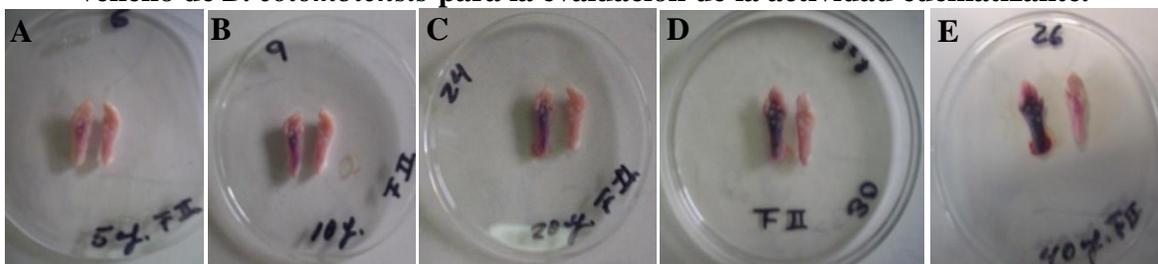


Figura 11

Aspecto de la región plantar de ratones INH tratados con la Fracción II del veneno de *B. colombiensis* para la evaluación de la actividad edematizante.



Extremidades de ratones tratados con (A) 5, (B) 10, (C) 20, (D) 30 y (E) 40 µg de FII del veneno de *B. colombiensis*. (Izq. Extremidad tratada con FII. Der. Extremidad tratada con Solución NaCl 0,85%)

Por otra parte, no se puede dejar de mencionar que con dosis de 20, 32, 40 y 48 µg FII en algunos de los individuos tratados por la vía intraplantar se observó una sintomatología caracterizada por rotación intermitente de los ratones sobre su propio eje, parálisis flácida de extremidades y aumento de la frecuencia respiratoria, lo cual se observó aproximadamente a los 5 min. de la aplicación del tratamiento. Estos individuos en su gran mayoría sobrevivieron al tiempo pautado por la metodología para la evaluación de la actividad edematizante y para dicho momento, ya no mostraron signos de neurotoxicidad. Solo un ratón tratado con una dosis de 32 µg/50 µl de FII murió aproximadamente a los 30 min. después de la aplicación del tratamiento.

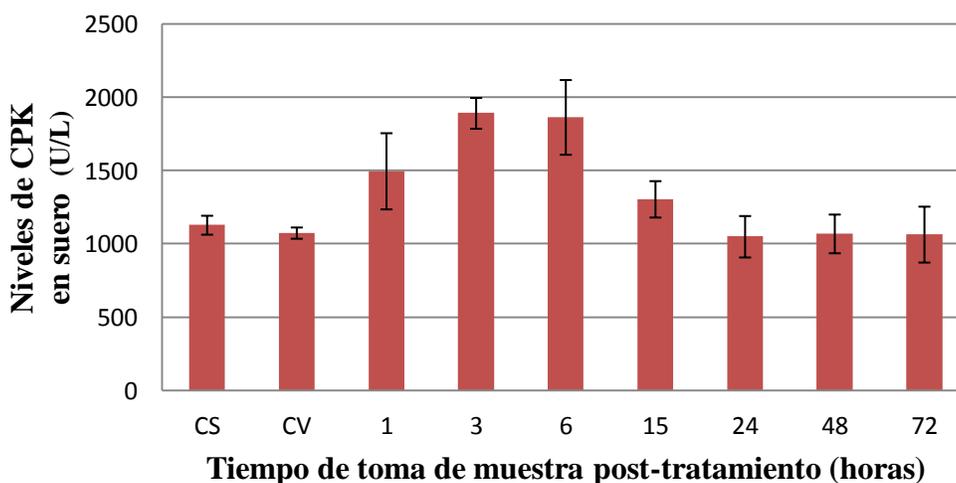
Actividad necrosante:

La FII del veneno de *Bothrops colombiensis* obtenida de acuerdo a las condiciones de este estudio indujo actividad necrosante en roedores, aspecto que fue evidenciado por el incremento en los niveles de actividad de la enzima CPK en suero en algunos de los grupos de animales tratados con 50 µg de la FII, al compararlos con los controles del experimento,

como se evidencia en la gráfica 21. En dicha gráfica observamos para los controles sano y de vehículo niveles de actividad de $1128,75 \pm 64,52$ U/L y $1074,9 \pm 38,33$ U/L respectivamente, los cuales no mostraron diferencia estadísticamente significativa entre sí ($\alpha: 0,05$). Al emplear estos niveles como referencia basal contra los siguientes grupos evaluados, de acuerdo al protocolo de trabajo, observamos un incremento de los niveles de CPK en suero desde la primera hora de aplicación del tratamiento, que alcanzó su máxima expresión a las tres horas post exposición, con niveles equivalentes aproximadamente a 1,76 veces el control de vehículo, los cuales permacionaron sin diferencia estadísticamente significativa hasta las 6 horas. A las 15 horas se comenzó a evidenciar la reducción de la actividad de este marcador, alcanzando incluso los niveles basales de este experimento, niveles que se mantuvieron estables y sin diferencia estadísticamente significativa hasta las setenta y dos horas de evaluación post tratamiento.

Gráfica 21

Determinación de la actividad necrosante de la Fracción II del veneno de *Bothrops colombiensis* de Paracotos (Edo. Miranda).

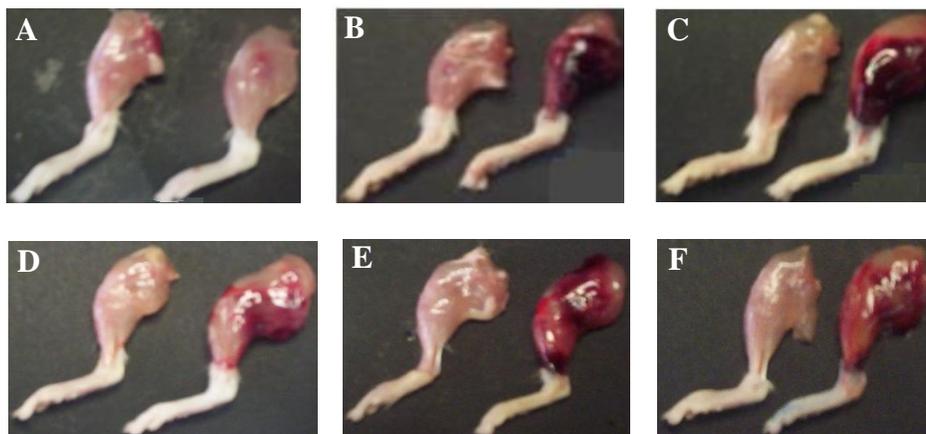


CS: ratones sin tratamiento. CV: ratones tratados con 0,1 ml de solución NaCl 0,85 %

Así mismo, es importante mencionar que los animales tratados con 50 μg de la FI por la vía IM, presentaron lesiones con aspecto hemorrágico en la extremidad tratada, en todos los grupos de experimentación planteados de acuerdo a las condiciones de este estudio (1, 3, 6, 15, 24, 48 y 72 horas), a diferencia de los individuos que formaron los grupos control sano y principalmente control del vehículo. Lesión hemorrágica que se evidenció muy marcada en las primeras horas post exposición (1 y 3 horas) y que disminuyó en intensidad más no en extensión de la misma al prolongar el tiempo post-exposición al tratamiento, como se evidencia en la figura 12.

Figura 12

Lesiones desarrolladas por la inyección IM de 50 μg de la Fracción II a ratones



A: Extremidades de individuo Control de vehículo (Izq: Extremidad no tratada. Der: Extremidad tratada con NaCl 0,85 %). **B:** extremidades de individuo expuesto durante 1 hora al tratamiento **C:** extremidades de individuo expuesto durante 3 horas al tratamiento. **D:** extremidades de individuo expuesto durante 6 horas al tratamiento. **E:** extremidades de individuo expuesto durante 48 horas al tratamiento. **F:** extremidades de individuo expuesto durante 72 horas. (Izq. Extremidad no tratada. Der. Extremidad inyectada con la FII).

Actividad Coagulante: la FII del veneno de *Bothrops colombiensis*, presentó actividad coagulante *in vitro* sobre plasma humano, como se evidencia en los resultados obtenidos los

cuales se resumen en la Tabla 12. En esta se evidencia una relación relación lineal dosis dependiente, caracterizada por la disminución del tiempo de coagulación del plasma al incrementar la concentración de la fracción de veneno evaluada. Se obtuvo una dosis coagulante mínima de **0,625 µg** de FII.

Actividad tipo Fosfolipasa A₂: la Fracción II del veneno de *Bothrops colombiensis* no mostró actividad tipo fosfolipasa A₂ *in vitro*, lo cual se evidenció por que no hubo consumo de la solución de NaOH al 0,01 N al evaluar dosis de hasta 200 µl/10 µl de la FII, al sustrato de yema de huevo empleado para su valoración, de acuerdo a las condiciones de este estudio.

Tabla 12

Determinación de la actividad coagulante de la Fracción II del veneno de *Bothrops colombiensis* de Paracotos (Edo. Miranda).

Dosis evaluada (µg/0,1 ml)	Tiempo de coagulación (Media ±σ) seg.
2,5	Coagula sin calcio
2	Coagula sin calcio
0,625	9,75 ± 1,43
0,5	34,14 ± 2,23
0,31	53,07 ± 3,31
0,25	69,33 ± 6,46
0,156	102,606 ± 3,66
0,125	106,01 ± 2,58
Control (Sol. NaCl 085 %)	314,71 ± 26,77

Nota: en rojo DCM. n: 2 experimentos individuales

Caracterización clínica de la Fracción II del veneno de *Bothrops colombiensis*

Determinación de la actividad de la enzima aspartato aminotransferasa (AST/SGPT): La fracción II del veneno de *Bothrops colombiensis*, indujo incremento de los niveles del

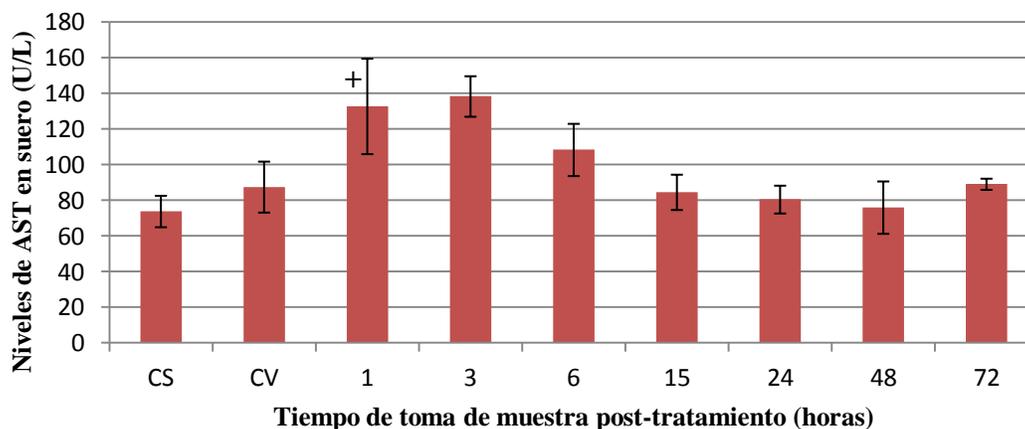
marcador AST en suero de ratones tratados con 50 µg de la FII como se presenta en la gráfica 22. En ésta se observa para los grupos control sano y control salina niveles de $73,72 \pm 8,82$ y $87,4 \pm 14,29$ U/L respectivamente, los cuales no muestran diferencias estadísticamente significativas entre sí ($\alpha: 0,05$). Al comparar este nivel basal con los niveles de AST detectados en los grupos tratados con la fracción II, de acuerdo al protocolo empleado, se observó que los niveles de actividad de la enzima AST en suero se incrementaron ligeramente a partir de la primera hora de exposición al tratamiento evaluado, alcanzando valores de aproximadamente 1,52 veces el control de vehículo, dicho incremento se mantuvo estable y sin diferencia estadísticamente significativa hasta las siguientes tres horas evaluadas. A las seis horas post aplicación del tratamiento, se observó una disminución de los niveles de AST en el suero del grupo de animales correspondientes, alcanzando incluso niveles de actividad enzimática sin diferencia estadísticamente significativa del control del vehículo ($\alpha: 0,05$). A partir de las quince hasta las setenta y dos horas post-tratamiento, los niveles de AST en los diferentes grupos evaluados presentaron valores de AST en suero similares a los detectados para el grupo control sano. (Gráfica 22).

Determinación de la actividad de la enzima alanina aminotransferasa (ALT/SGPT): en la evaluación de la actividad de la enzima ALT, en el suero de ratones tratados con 50 µg de la FII, se observó un nivel de actividad de dicho marcador para los control sano y de vehículo de $32,525 \pm 2,15$ y $46,9 \pm 1,95$ U/L respectivamente, los cuales presentaron diferencias estadísticamente significativas entre sí ($\alpha: 0,05$). Al utilizar estos niveles basales como referencia para el resto de los grupos de ratones tratados con fracción II de acuerdo al protocolo empleado, se observó que los niveles de actividad de esta enzima en suero se

incrementó ligeramente a la primera hora de exposición al tratamiento evaluado. Los niveles de máxima actividad enzimática se correspondieron con el grupo estudiado a las tres horas post-exposición, alcanzándose valores de actividad de $65,67 \pm 4,00$ U/L, aproximadamente 1,4 veces los niveles detectados en el grupo control de vehículo del experimento. A las siguientes seis horas de exposición, se observó una reducción de los niveles de ALT en suero para el grupo correspondiente, alcanzando un nivel de $50,60 \pm 4,78$ U/L de actividad enzimática, el cual no presentó diferencia estadísticamente significativa del control de vehículo. En los grupos evaluados correspondientes a las quince, veinticuatro y cuarenta horas se observó una reducción continua de los niveles de actividad del marcador en cuestión en suero, hasta que se alcanzaron niveles sin diferencia estadísticamente significativa del control sano del experimento. (Gráfica 23).

Gráfica 22

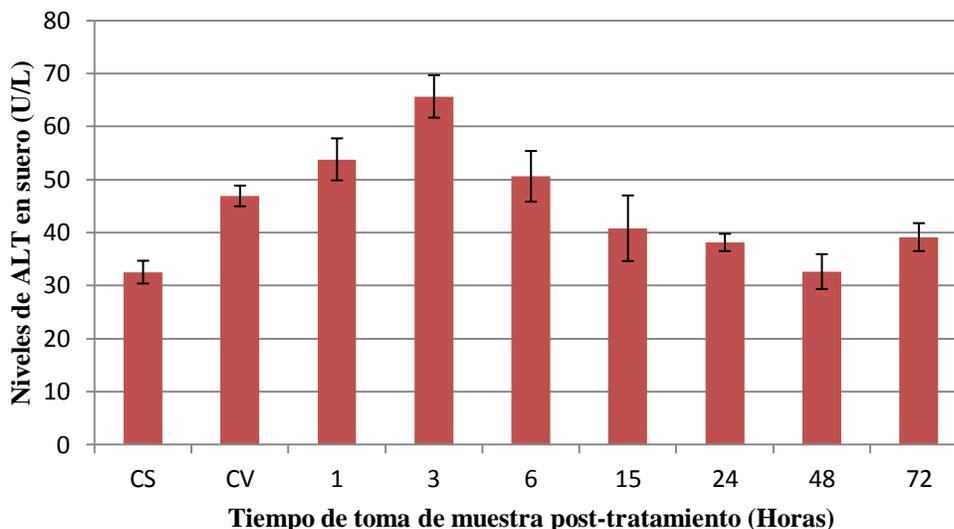
Determinación de la actividad de la enzima AST/SGOT en suero de ratones tratados con la Fracción II del veneno de *Bothrops colombiensis*



+ Valores con diferencia estadísticamente significativa de los controles ($\alpha: 0,05$)
 CS: ratones sin tratamiento. CV: ratones tratados con 0,1 ml de solución NaCl 0,85 %

Gráfica 23

Determinación de la actividad de la enzima ALT/SGPT en suero de ratones tratados con la Fracción II del veneno de *Bothrops colombiensis*

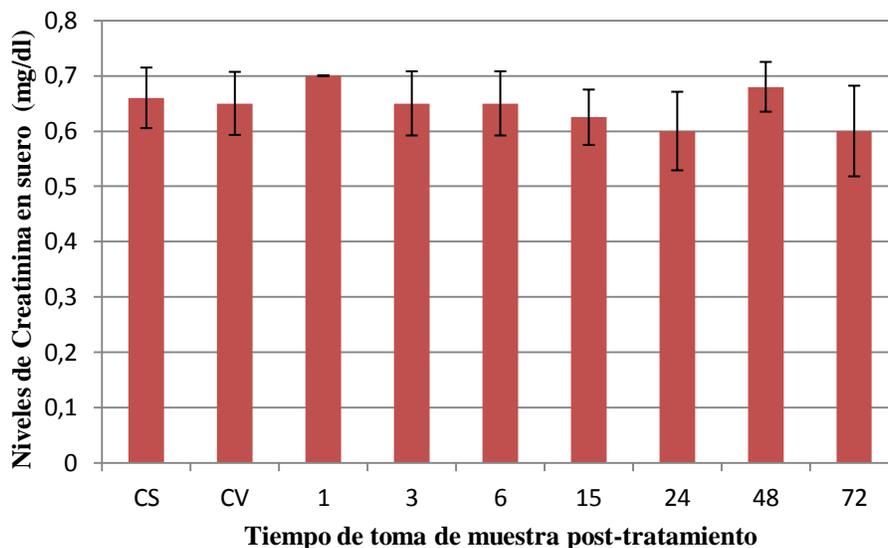


CS: ratones sin tratamiento. CV: ratones tratados con 0,1 ml de solución NaCl 0,85 %

Determinación de creatinina: en la cuantificación de los niveles de creatinina en suero de ratones tratados con 50 μ g de fracción II del veneno de *Bothrops colombiensis*, se determinaron para los grupos control sano y control del vehículo niveles de $0,66 \pm 0,055$ mg/dl y $0,65 \pm 0,057$ mg/dl respectivamente, los cuales no presentaron diferencias estadísticamente significativas entre sí (α : 0,05). Al comparar estos niveles basales con los siguientes grupos del protocolo del trabajo, se observó que no existe diferencia estadísticamente significativa con los niveles de creatinina en suero detectados para los diferentes grupos evaluados (α : 0,05), como se evidencia en la Gráfica 24.

Gráfica 24

Determinación de creatinina en suero de ratones tratados con la Fracción II del veneno de *Bothrops colombiensis*

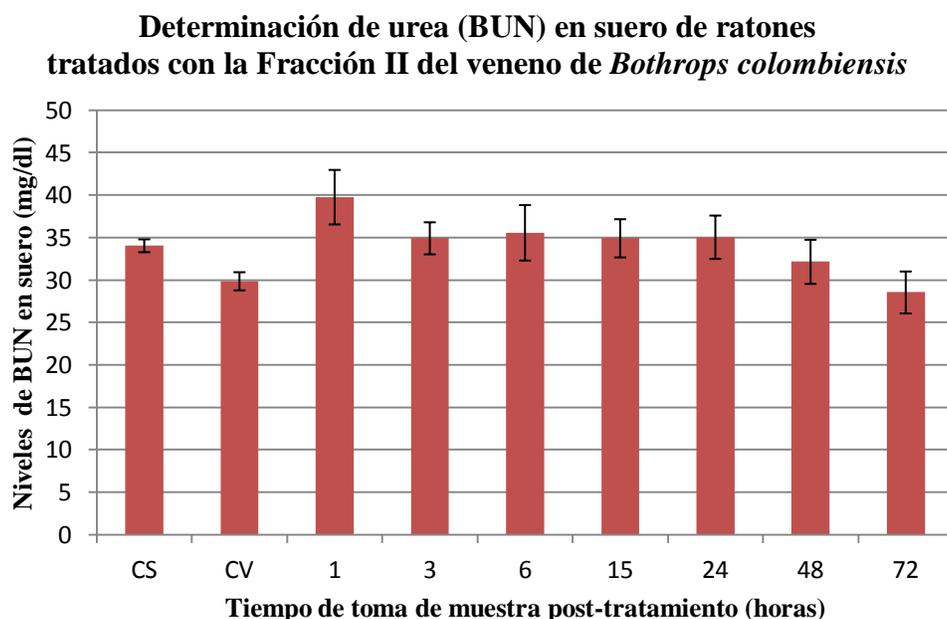


CS: ratones sin tratamiento. CV: ratones tratados con 0,1 ml de solución NaCl 0,85 %

Determinación de urea: en la determinación de los niveles de urea en suero de ratones tratados con 50 µg de fracción II del veneno de *Bothrops colombiensis* se observó para los grupos control sano y de vehículo niveles de $34,05 \pm 0,759$ mg/dl y $29,867 \pm 1,07$ mg/dl respectivamente, los cuales muestran diferencias estadísticamente significativas entre sí (α : 0,05). Al comparar estos niveles basales con los niveles de urea detectados en los siguientes grupos del protocolo del trabajo, se observó a la primera hora post exposición a la fracción en estudio un ligero incremento ($39,78 \pm 3,21$ mg/dl), correspondiente a 1,33 veces los niveles detectados en el grupo control del vehículo, representando adicionalmente el nivel de mayor actividad detectado para este experimento. A las tres horas post exposición al tratamiento se evidenció una reducción en dichos niveles los cuales se mantuvieron

relativamente estables y sin diferencia estadísticamente significativa entre sí y con el grupo control sano hasta las 48 horas post exposición a la fracción evaluada. (Gráfica 25).

Gráfica 25

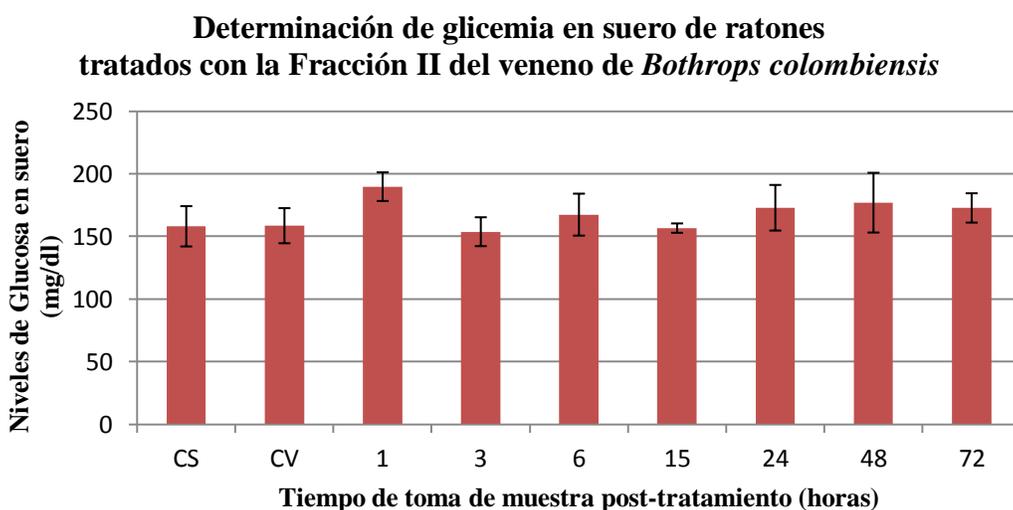


CS: ratones sin tratamiento. CV: ratones tratados con 0,1 ml de solución NaCl 0,85 %

Determinación de glicemia: en la determinación de los niveles de glicemia en suero de ratones tratados con 50 μ g de fracción II del veneno de *Bothrops colombiensis*, se observó para los grupos control sano y control de vehículo niveles de $158,075 \pm 16,10$ mg/dl y $158,57 \pm 14,03$ mg/dl respectivamente, los cuales no muestran diferencias estadísticamente significativas entre sí ($\alpha: 0,05$). Al comparar estos niveles basales con los siguientes grupos del protocolo del trabajo, se observó un ligero incremento para este marcador, en el grupo de animales evaluados la primera hora post-exposición ($189,75 \pm 11,44$), dicho incremento equivale aproximadamente a 1,2 veces los niveles detectados en las muestras recolectadas a los individuos de los grupos control (sano y vehículo). Con relación a los otros grupos

experimentales evaluados, correspondientes a los lapsos post-exposición entre tres y setenta y dos horas, no se observó para estos diferencia estadísticamente significativa con los niveles de glicemia en suero detectados para los grupos control sano y de vehículo (α : 0,05), como se evidencia en la gráfica 26.

Gráfica 26

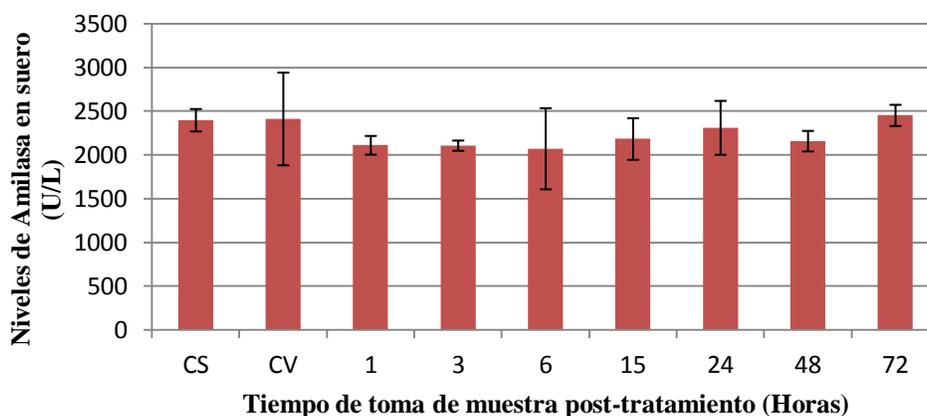


CS: ratones sin tratamiento. CV: ratones tratados con 0,1 ml de solución NaCl 0,85 %

Determinación de amilasa: en la determinación de los niveles de amilasa, observamos en los grupos control sano y control salina niveles de $2398,4 \pm 128$ y $2413,05 \pm 529,72$ U/L respectivamente, los cuales no muestran diferencias estadísticamente significativas entre sí. Al comparar este nivel basal con los siguientes grupos del protocolo del trabajo, se observó que no existe diferencia estadísticamente significativa con los niveles de amilasa en suero, detectados para los diferentes grupos evaluados. (Gráfica 27).

Gráfica 27

Determinación de amilasa en suero de ratones tratados con la Fracción II del veneno de *Bothrops colombiensis*



CS: ratones sin tratamiento. CV: ratones tratados con 0,1 ml de solución NaCl 0,85 %

Evaluación histopatológica de los efectos inducidos por la Fracción II del veneno de *Bothrops colombiensis* en ratones blancos cepa INH.

Los resultados obtenidos en el estudio histopatológico se presentan en la tabla 13, en ésta se resumen las lesiones observadas en ratones blancos, cepa INH tratados con 50 μ g de la Fracción II del veneno total de *Bothrops colombiensis*.

Los expertos reportaron que para los diferentes grupos de tratamiento establecidos para este estudio, las lesiones están restringidas básicamente a **páncreas, corazón y músculo esquelético**. En el caso de pulmón las lesiones reportadas se consideró pudieran ser atribuidas a patología espontánea de los roedores, mientras que en los casos de el hígado y el riñón los expertos reportaron que para las lesiones observadas, en dichos órganos, existe escasa diferenciación entre la acción tóxica del tratamiento aplicado y la patología espontánea de la especie.

Tabla 13

**Lesiones inducidas por la Fracción II del veneno de
Bothrops colombiensis en ratón blanco cepa INH.**

Tiempo de evaluación (horas)	Observaciones
1	<p>Corazón: Congestión de capilares sanguíneos. Hipercontractibilidad multifocal leve de fibras musculares cardíacas. Hemorragia focal entre fibras cardíacas.</p> <p>Páncreas: Degeneración de Islotes de Langerhans. Signos de pancreatitis.</p> <p>Músculo: Degeneración difusa y multifocal leve de fibras musculares esqueléticas. Miositis multifocal leve. Hipercontractibilidad de fibras musculares esqueléticas.</p> <p>Hígado: Degeneración macrovacuolar multifocal. Degeneración hidrópica difusa (DHD). Degeneración microvacuolar multifocal.</p>
3	<p>Corazón: hipercontractibilidad focal y multifocal leve de fibras musculares cardíacas. Congestión de capilares sanguíneos.</p> <p>Páncreas: infiltrado inflamatorio entre lobulillos pancreático y perivascular.</p> <p>Músculo: Degeneración multifocal de fibras musculares esqueléticas.</p> <p>Hígado: Degeneración microvacuolar y macrovacuolar multifocal. Degeneración hidrópica multifocal.</p>
6	<p>Corazón: hipercontractibilidad focal y multifocal de fibras musculares cardíacas.</p> <p>Páncreas: SLMV</p> <p>Músculo: Degeneración difusa de fibras musculares esqueléticas. Degeneración leve de fibras musculares esqueléticas.</p> <p>Hígado: Degeneración microvacuolar de los hepatocitos. DHD.</p>
15	<p>Corazón: hipercontractibilidad focal de fibras musculares cardíacas. Congestión de vasos sanguíneos.</p> <p>Páncreas: infiltrado inflamatorio perivascular leve y multifocal.</p> <p>Músculo: degeneración leve de fibras musculares esqueléticas.</p> <p>Hígado: degeneración microvacuolar multifocal. DHD.</p>
24	<p>Corazón: hipercontractibilidad focal leve de fibras musculares cardíacas.</p> <p>Páncreas: infiltrado inflamatorio perivascular.</p> <p>Músculo: Degeneración difusa y multifocal de fibras musculares hipercontractibilidad focal de fibras esquelética, hipercontractibilidad difusa de fibras musculares esqueléticas.</p> <p>Hígado: DHD, degeneración microvacuolar multifocal.</p>
48	<p>Corazón: Hipercontractibilidad multifocal de fibras musculares cardíacas.</p> <p>Páncreas: degeneración leve de Islotes de Langerhans. Infiltrado inflamatorio leve perivascular.</p> <p>Músculo: hipercontractibilidad multifocal de fibras musculares esqueléticas.</p> <p>Hígado: degeneración macrovacuolar multifocal, DHD.</p>

Tabla 13 (continuación)

**Lesiones inducidas por la Fracción II del veneno de
Bothrops colombiensis en ratón blanco cepa INH.**

Tiempo de evaluación (horas)	Observaciones
72	Corazón: Infiltrado inflamatorio focal perivascular. Congestión de capilares. Páncreas: degeneración leve de Islotes de Langerhans, infiltrado inflamatorio perivascular focal y multifocal. Músculo: miositis leve multifocal. Hígado: degeneración microvacuolar y macrovacuolar difusa.
Control sano	Solo lesiones atribuidas a patología espontanea de la especie.
Control Vehículo	Solo lesiones atribuidas a patología espontanea de la especie.

Fracción III

Durante la evaluación de la FIII del veneno de *Bothrops colombiensis*, se observó que ésta indujo actividad letal, hemorrágica y edematizante en roedores, mientras que *in vitro* presentó actividad tipo fosfolipasa A₂, desarrollo una muy ligera actividad coagulante sobre plasma humano, pero no mostró ninguna actividad desfibrinante, aún en la evaluación con dosis equivalentes a 8 veces la DDM obtenida para el veneno total, de acuerdo a las condiciones de este estudio como se resume en la tabla 7.

Actividad letal: en la evaluación de la actividad letal inducida por la administración intraperitoneal de la FIII del veneno de *Bothrops colombiensis*, se observó una relación lineal dosis dependiente, caracterizada por un incremento de la letalidad en el grupo de individuos tratados al aumentar la dosis de FIII administrada. Se obtuvo una DL₅₀ de **7,67 ± 0,475** mg/kg (n=3) bajo las condiciones de este estudio.

En la estimación de esta actividad se evaluaron dosis del veneno entre los 1,32-26,32 mg/Kg y se observó que con dosis iguales o inferiores a los 7,89 mg/Kg no se evidenciaron signos clínicos de toxicidad en los animales tratados, mientras que con dosis equivalentes a los 11,84 mg/Kg se observó en el grupo de animales correspondientes: pilo-erección, incapacidad de desplazamiento y aumento de frecuencia cardiaca, mientras que a dosis tan altas como 26,32 mg/Kg los animales tratados presentaron exoftalmo, convulsión tónico-clónica, incapacidad de desplazamiento, parálisis flácida de trenes anterior y posterior y apnea.

Actividad hemorrágica: en la evaluación de la actividad hemorrágica se evaluaron dosis de la FIII del veneno de *Bothrops colombiensis* entre los 3- 236 µg/ratón. Con la administración a los ratones de dosis < 12,5 µg/ratón no se observó el desarrollo de lesión hemorrágica, en los animales tratados. Dichas lesiones comenzaron a evidenciarse con dosis de 24 µg/ratón tratándose en este caso de lesiones no muy bien definidas, las cuales presentaron un aspecto similar a petequias (aspecto moteado). Con dosis entre 24-70 µg/ratón, se observó que las lesiones no incrementaron su intensidad de forma dosis dependiente, a diferencia del diámetro de las mismas el cual si incrementó de manera directamente proporcional a las dosis de veneno evaluadas (Gráfica 28). Mientras que con dosis superiores a 105 µg, los animales tratados desarrollaron lesiones hemorrágicas que incrementaron en diámetro, intensidad y estaban usualmente acompañadas de necrosis en la zona evaluada, aspectos que presentaron una relación directamente proporcional a las dosis de veneno evaluadas. Se obtuvo una DHM de **102,54 ± 18, 03 µg/ratón** (n=3). Mientras que en los animales tratados con solución de NaCl al 0,85 %, no se observó el desarrollo de lesión hemorrágica. (Figura 13).

Gráfica 28

Determinación de la dosis hemorrágica mínima de la Fracción III del veneno de *Bothrops colombiensis* de Paracotos (Edo. Miranda).

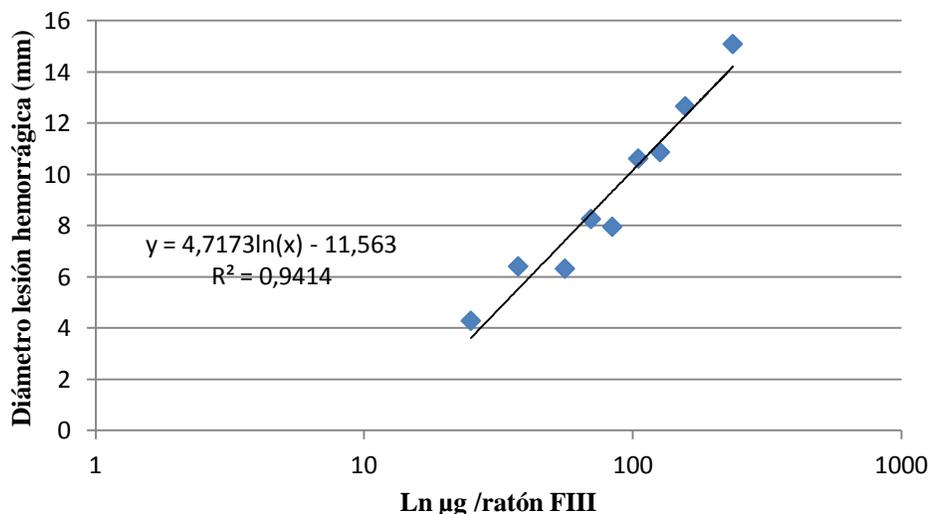
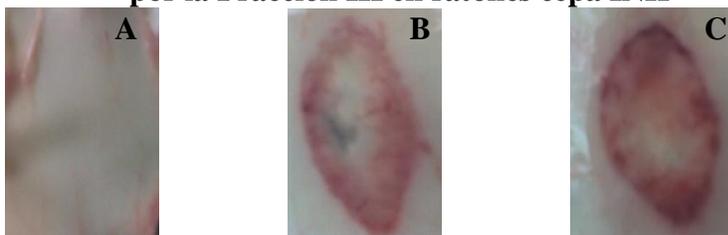


Figura 13

Aspecto de las lesiones hemorrágicas inducidas por la Fracción III en ratones cepa INH



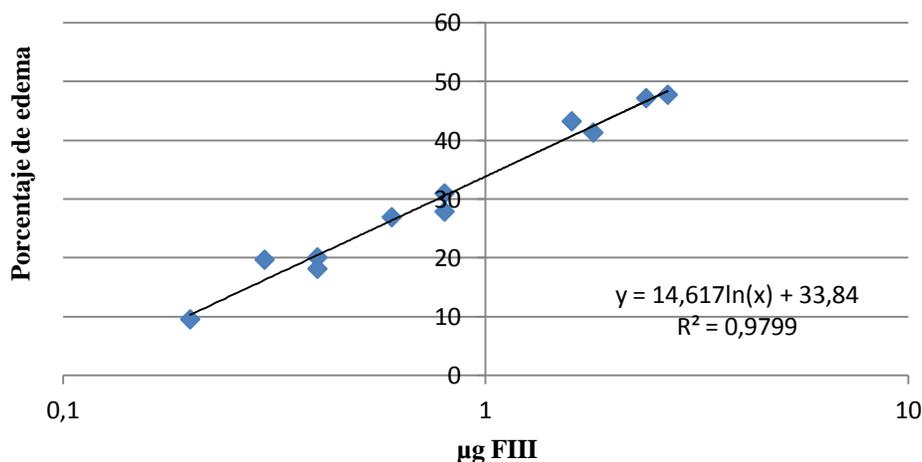
A: Control de vehículo. **B:** Lesión hemorrágica en ratón tratado con 236 µg de FIII
C: Lesión hemorrágica en piel de ratón tratado con 236 µg de FIII.

Actividad edematizante: la FIII del veneno de *B. colombiensis* de acuerdo a las condiciones de este estudio, indujo en los ratones tratados el desarrollo de edema plantar. Se empleó un rango de dosis comprendido entre los 0,2-2,4 µg FIII/0,05 ml, lo cual nos permitió evidenciar una relación lineal dosis dependiente, caracterizada por un incremento en el porcentaje de edema en las extremidades de los individuos tratados al aumentar la dosis de

FIII evaluada, como se puede evidenciar en la gráfica 29. Se obtuvo una DEM de $0,75 \pm 0,029$ $\mu\text{g}/0,05$ ml (n= 3).

Gráfica 29

Determinación de la dosis edematizante mínima de la Fracción III del veneno de *Bothrops colombiensis* de Paracotos (Edo. Miranda).



Así mismo, es importante destacar que en los ratones tratados con dosis iguales o mayores a los 0,8 μg de FIII, se evidenció que el edema se extendió más allá de la almohadilla plantar comprometiendo toda la extremidad implicada, aspecto que se observó en todos los individuos de los grupos correspondientes. Por otra parte, a diferencia de las fracciones I y II, la lesión edematizante observada no se acompañó del desarrollo de hemorragia en la zona de aplicación del tratamiento.

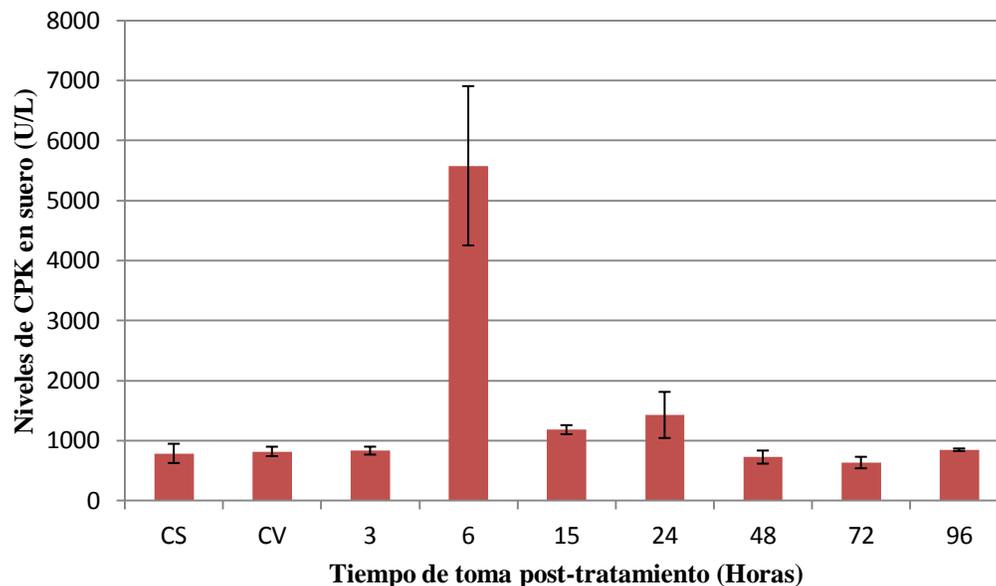
Actividad necrosante: los resultados obtenidos para la determinación de los niveles de CPK en plasma de ratones tratados con 80 μg de FIII se presentan en la gráfica 30. En dicha gráfica se observa para los controles sano y de vehículo niveles de CPK en suero de $786,68 \pm 160,10$ U/L y $819,43 \pm 78,88$ U/L respectivamente, los cuales no muestran

diferencia estadísticamente significativa entre sí (α : 0,05). Al comparar este nivel basal con los niveles de CPK detectado en el suero de los siguientes grupos del protocolo de trabajo se observó que la FIII del veneno de *Bothrops colombiensis* indujo el desarrollo un dramático efecto necrosante, el cual se inició y alcanzó su máxima actividad a las 6 horas de exposición al tratamiento evaluado, con niveles equivalentes a ocho veces el nivel promedio detectado en los ratones sin tratamiento previo (control sano) y aproximadamente seis veces al comparar con los niveles de actividad de la enzima en los individuos tratados con solución de NaCl 0,85 % (control de vehículo). A las 15 y 24 horas, se apreció una marcada disminución de los niveles de CPK en el suero de los animales tratados, pero manteniendo aun diferencia estadísticamente significativa de los controles del experimento. Los niveles basales se alcanzaron sobre las 48 horas post-tratamiento y se mantuvieron sin diferencia estadísticamente significativa durante las siguientes 72 y 96 horas post exposición a la fracción evaluada.

Actividad Coagulante: en la determinación de la actividad coagulante sobre plasma humano, se observó que la FIII del veneno de *Bothrops colombiensis* desarrollo efecto procoagulante a altas dosis, el cual exhibió una relación lineal dosis dependiente que se caracterizó por una reducción del tiempo necesario para la inducción de la coagulación del plasma al aumentar la dosis del veneno evaluado, como se evidencia en la tabla 14. Se observó que la DCM con la FIII es $> 100 \mu\text{g}$ ($n= 2$).

Gráfica 30

Evaluación de la actividad necrosante de la Fracción III del veneno de *Bothrops colombiensis* de Paracotos (Edo. Miranda)



CS: ratones sin tratamiento. CV: ratones tratados con 0,1 ml de solución NaCl 0,85 %

Tabla 14

Determinación de la actividad coagulante de la Fracción III del veneno de *Bothrops colombiensis* de Paracotos (Edo. Miranda).

Dosis Evaluada FIII ($\mu\text{g}/0,1\text{ml}$)	Tiempo de coagulación (seg.)
100	$20,03 \pm 2,34$
50	$43,96 \pm 3,97$
25	$82,69 \pm 2,12$
12,5	$148,14 \pm 4,40$
Control (Sol. NaCl 0,85 %)	$307,05 \pm 4,16$

n: 2 ensayos

Actividad tipo Fosfolipasa A₂: la fracción III del veneno de *Bothrops colombiensis* mostró actividad tipo fosfolipasa A₂ *in vitro*, al ser evaluada contra un sustrato con base en yema de

huevo de acuerdo a las condiciones de este estudio. Se obtuvo un nivel de actividad para este tipo de enzimas de $79,47 \pm 6,33$ U/mg (n= 4).

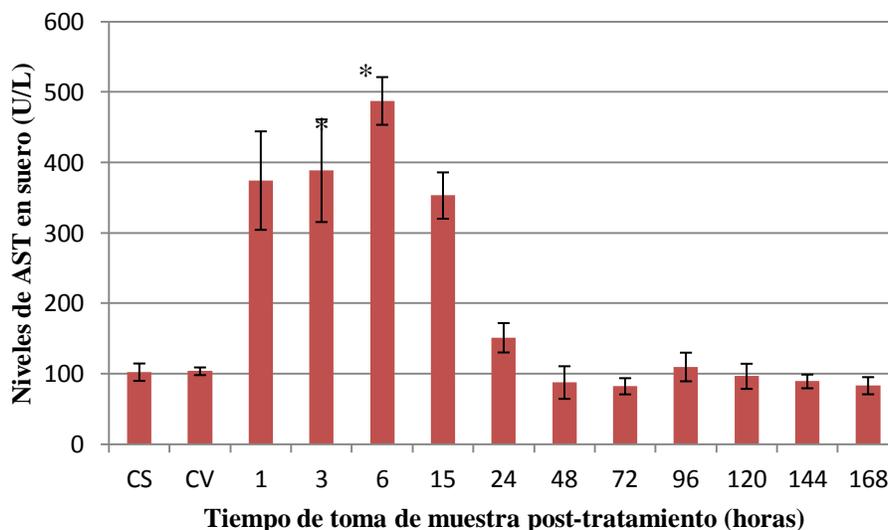
Caracterización clínica de la Fracción III del veneno de *Bothrops colombiensis*.

Determinación de la actividad de la enzima aspartato aminotransferasa (AST/SGOT):

los resultados obtenidos para las variaciones en el tiempo de los niveles de AST en suero de ratones tratados con 80 µg de la FIII se muestran en la gráfica 31. En esta se observa para los controles sano y de vehículo niveles de AST en suero de $102,47 \pm 12,33$ U/L y $103,78 \pm 5,45$ U/L respectivamente, los cuales no presentaron diferencia estadísticamente significativa entre sí. Al comparar este nivel basal con los siguientes grupos del protocolo del trabajo, se observó que los niveles de AST en suero se incrementó drásticamente desde la primera hora post-tratamiento, alcanzando cifras de $374,55 \pm 69,93$ U/L aproximadamente 3,6 veces los valores detectados en los controles del experimento. Dichos niveles se mantuvieron relativamente estables hasta las siguientes 3 horas post-exposición, a partir de la cual se incrementaron nuevamente los niveles de AST en suero alcanzando su máxima actividad a las 6 horas ($487,65 \pm 33,86$ U/L). A las 15 horas post-exposición se observó el inicio de la reducción de los niveles de actividad de la enzima AST en el grupo correspondiente, alcanzando niveles sin diferencia estadísticamente significativa de los controles a las 48 horas posteriores a la aplicación del tratamiento, niveles que se mantuvieron relativamente constantes durante el siguiente lapso post exposición correspondiente al rango de 72 a las 168 horas de acuerdo al protocolo del experimento (Gráfica 31).

Gráfica 31

Determinación de la actividad de la enzima AST/SGOT en suero de ratones tratados con la Fracción III del veneno de *Bothrops colombiensis*



*valores con diferencia estadísticamente significativa ($\alpha: 0,05$)

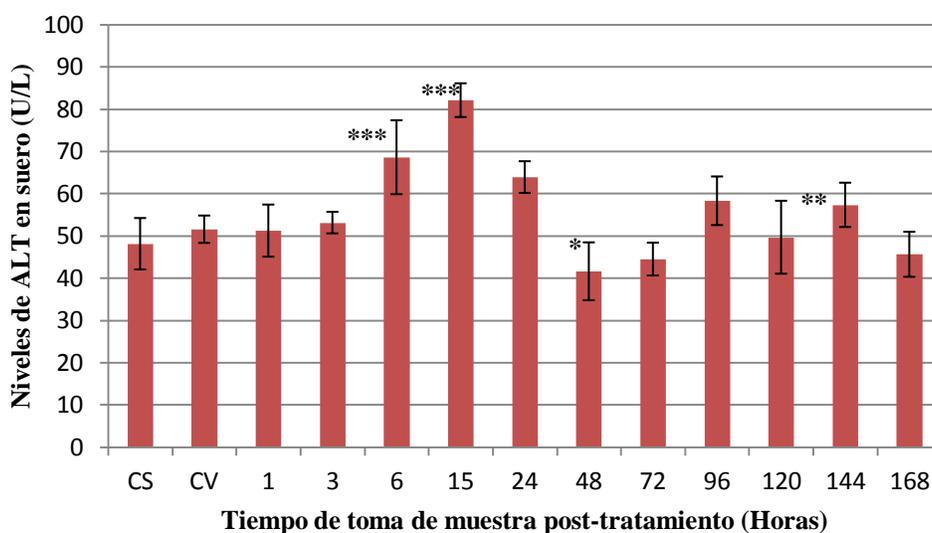
CS: ratones sin tratamiento. CV: ratones tratados con 0,1 ml de solución NaCl 0,85 %

Determinación de la actividad de la enzima alanina aminotransferasa (ALT/SGPT): los resultados obtenidos para las variaciones en el tiempo de los niveles de AST en suero de ratones tratados con 80 μ g de la FIII se muestran en la gráfica 32. En esta se observa para los controles sano y de vehículo niveles de $48,10 \pm 6,08$ U/L y $51,53 \pm 3,23$ U/L respectivamente, los cuales no presentaron diferencia estadísticamente significativa entre sí ($\alpha: 0,05$). Al comparar este nivel basal con los siguientes grupos del protocolo del trabajo, se observó que los niveles de ALT en suero comenzaron a incrementarse al cabo de las 6 horas post-tratamiento, alcanzando niveles de $68,575 \pm 8,75$ U/L, correspondiente aproximadamente a 1,43 y 1,33 veces los valores detectados para los controles sano y vehículo respectivamente. A las 15 horas post-exposición a la FIII se observó el máximo nivel de este marcador en suero con niveles de $82,08 \pm 4,00$ U/L, representando aproximadamente 1,53 veces el control de vehículo. A partir de las 48 horas post-

exposición se comenzaron a detectar niveles de actividad enzimática sin diferencia estadísticamente significativa de los grupos control sano y salina del experimento, característica mantenida hasta las 168 horas post-exposición al tratamiento evaluado. (Gráfica 32).

Gráfica 32

Determinación de la actividad de la enzima ALT/SGPT en suero de ratones tratados con la Fracción III del veneno de *Bothrops colombiensis*



* Valores sin diferencia estadísticamente significativa del control sano ($\alpha: 0,05$)

** Valores sin diferencia estadísticamente significativa del control de vehículo ($\alpha: 0,05$)

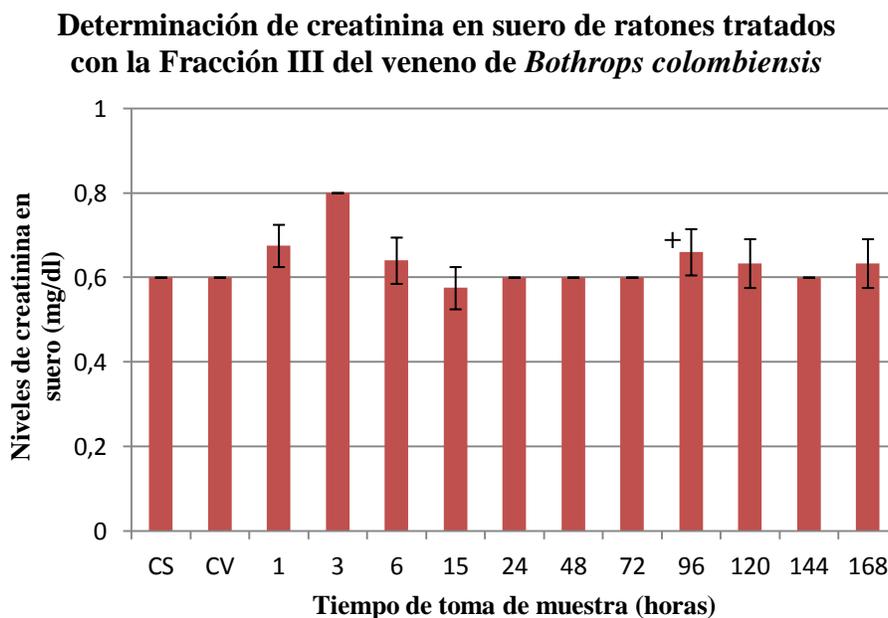
*** Valores con diferencia estadísticamente significativa ($\alpha: 0,05$)

CS: ratones sin tratamiento. CV: ratones tratados con 0,1 ml de solución NaCl 0,85 %

Determinación de creatinina: en la cuantificación de los niveles de creatinina en suero de ratones tratados con 80 μ g de la fracción III del veneno de *Bothrops colombiensis*, de acuerdo a las condiciones de este estudio, se observó que los grupos control sano ($0,60 \pm 0,0$ mg/dl) y control del vehículo ($0,60 \pm 0,0$ mg/dl) no presentaron diferencias estadísticamente significativas entre sí ($\alpha: 0,05$), como se evidencia en gráfica 32. Al comparar este nivel basal con los siguientes grupos del protocolo del trabajo, se observó un

ligero incremento en los niveles de creatinina en suero en el grupo evaluado tras 1 hora de exposición al tratamiento evaluado ($0,675 \pm 0,05$ mg/dl), alcanzando posteriormente su máxima expresión a las 3 horas post-exposición con niveles de $0,775 \pm 0,05$ mg/dl, correspondiente aproximadamente a 1,29 veces lo detectado en los grupos control sano y control de vehículo. A las 6 horas se observó una reducción de los niveles de creatinina en suero, alcanzando cifras sin diferencia estadísticamente significativa de los controles ($\alpha: 0,05$), lo cual se mantuvo sin cambio durante los restantes grupos evaluados, correspondientes específicamente a individuos con lapsos de toma de muestra post-exposición de 15 a 168 horas. Con la excepción del grupo expuesto por 96 horas, donde la evaluación estadística refleja que existe diferencia estadísticamente significativa de los controles (Gráfica 33).

Gráfica 33



+ Valores con diferencia estadísticamente significativa de los controles ($\alpha: 0,05$).
 CS: ratones sin tratamiento. CV: ratones tratados con 0,1 ml de solución NaCl 0,85 %

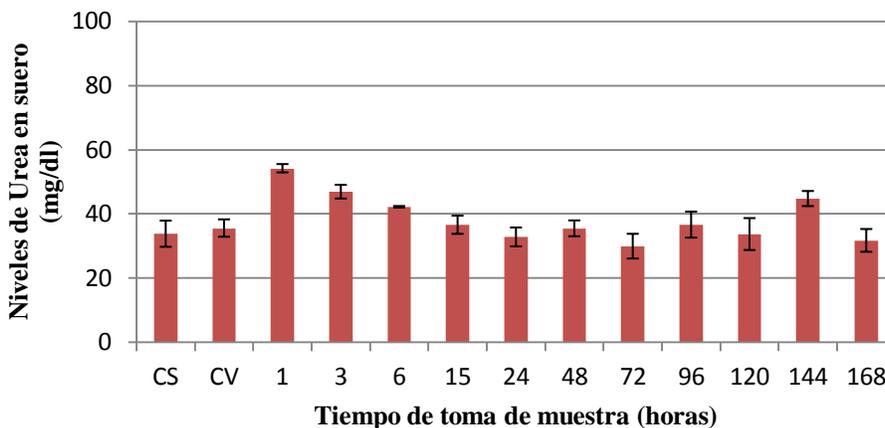
Determinación de urea: en la cuantificación de los niveles de urea en suero de ratones tratados con 80 µg de la fracción III del veneno de *Bothrops colombiensis*, de acuerdo a las condiciones de este estudio, se observó para los grupos de control sano y control del vehículo niveles de $33,78 \pm 4,07$ mg/dl y $35,54 \pm 2,70$ mg/dl respectivamente, los cuales no presentan diferencias estadísticamente significativas entre sí. Al comparar este nivel basal con los siguientes grupos del protocolo del trabajo, se observó el incremento en los niveles de urea en suero desde la primera hora post exposición al tratamiento evaluado, alcanzando niveles de $54,17 \pm 1,31$ mg/dl, correspondientes aproximadamente con 1,60 y 1,52 veces lo detectado en los grupos control sano y control de vehículo respectivamente, representando adicionalmente el pico de actividad de este marcador. A las 3 horas post-exposición, se observó la disminución de los niveles de urea en suero, lo cual se desarrollo paulatinamente hasta las 15 horas post-exposición, momento en el cual ya no se observó diferencias estadísticamente significativas con los controles del experimento (α : 0,05), aspecto que se mantuvo hasta las 168 horas post-exposición. Con la excepción de las 144 horas post exposición, momento de evaluación en el cual se observó un ligero incremento en los niveles de urea en suero ($44,73 \pm 2,35$ mg/dl) equivalente a 1,26 veces el control del vehículo. (Gráfica 34).

Determinación de glicemia: en la determinación de los niveles de glicemia se observó para los grupos control sano y control salina niveles de $160,86 \pm 14,98$ y $163,17 \pm 14,42$ mg/dl respectivamente, los cuales no muestran diferencias estadísticamente significativas entre sí (α : 0,05). Al comparar este nivel basal con los siguientes grupos del protocolo del trabajo, de acuerdo a las condiciones de este estudio, se observó que no existe diferencia

estadísticamente significativa con los niveles de glicemia en suero, detectados para los diferentes grupos evaluados (α : 0,05), como se presenta en la gráfica 35.

Gráfica 34

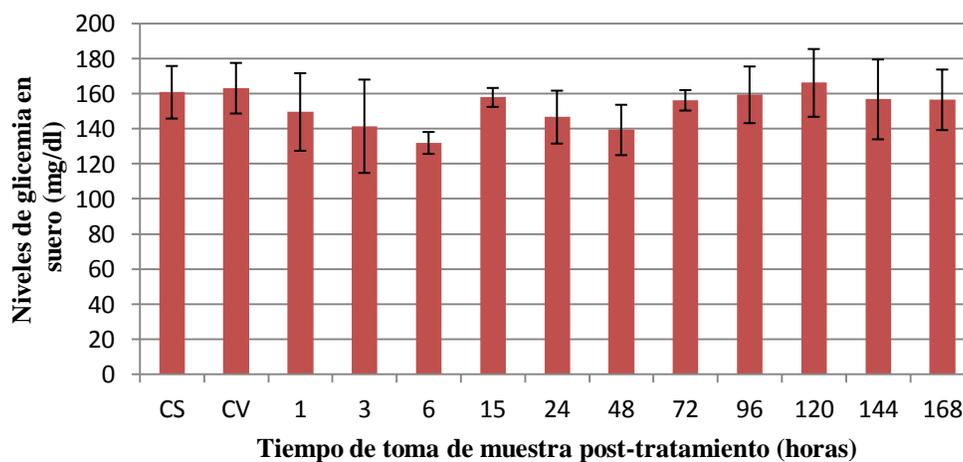
Determinación de urea (BUN) en suero de ratones tratados con la Fracción III del veneno de *Bothrops colombiensis*



CS: ratones sin tratamiento. CV: ratones tratados con 0,1 ml de solución NaCl 0,85 %

Gráfica 35

Determinación de glicemia en suero de ratones tratados con la Fracción III del veneno de *Bothrops colombiensis*

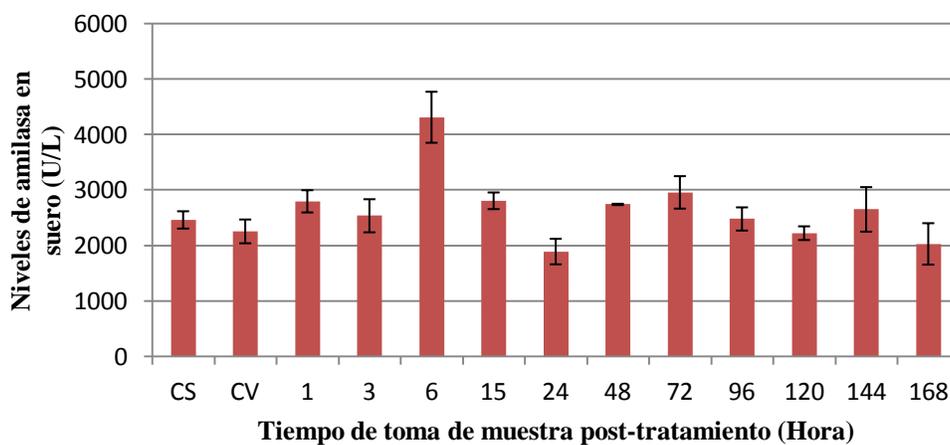


CS: ratones sin tratamiento. CV: ratones tratados con 0,1 ml de solución NaCl 0,85 %

Determinación de amilasa: en la determinación de los niveles de amilasa, se observó para los grupos control sano y control de vehículo niveles de $2462 \pm 155,86$ U/L y $2255,3 \pm 214,24$ U/L respectivamente, los cuales no mostraron diferencias estadísticamente significativas entre sí ($\alpha: 0,05$). Al comparar este nivel basal con los siguientes grupos del protocolo del trabajo, se observó un incremento de la actividad de la amilasa en suero a las 6 horas post exposición al tratamiento aplicado, alcanzando niveles de $4311,5 \pm 459,50$ U/L los cuales corresponden aproximadamente a 1,75 y 1,91 veces los niveles detectados en los grupos control sano y de vehículo respectivamente. A las 15 horas post exposición se observó una reducción de los niveles de amilasa en suero los cuales alcanzaron incluso los niveles basales del experimento. Dichos niveles se mantuvieron sin diferencia estadísticamente significativa de los controles hasta las 168 post exposición al tratamiento evaluado, con la notable excepción del grupo evaluado tras 72 horas post exposición a la FIII para el cual se evidenció un incremento a $2957,9 \pm 292,47$ U/L el que corresponde aproximadamente a 1,31 veces el control del vehículo. (Gráfica 36)

Gráfica 36

Determinación de amilasa en suero de ratones tratados con la Fracción III del veneno de *Bothrops colombiensis*



CS: ratones sin tratamiento. CV: ratones tratados con 0,1 ml de solución NaCl 0,85 %

Evaluación histopatológica de los efectos inducidos por la Fracción III del veneno de *Bothrops colombiensis* en ratones blancos INH.

Los resultados obtenidos en el estudio histopatológico se resumen en la tabla 15, en ésta se presentan las lesiones presentadas en ratones blancos cepa INH tratados con 80 µg de la Fracción III del veneno de *Bothrops colombiensis*, los expertos refieren que dichas lesiones estuvieron restringidas básicamente a **páncreas y corazón**. En el caso de pulmón las lesiones reportadas se consideró pudieran ser atribuidas a patología espontánea de los roedores, en los casos de hígado y riñón los expertos reportaron que para las lesiones observadas, existe escasa diferenciación entre la acción tóxica del tratamiento aplicado y la patología espontánea de la especie, mientras que el caso del tejido muscular y para todos los grupos evaluados los expertos reportan la ausencia de lesiones microscópicas visibles.

Tabla 15

Lesiones inducidas por la Fracción III del veneno de *Bothrops colombiensis* en ratón blanco cepa INH.

Tiempo de evaluación (horas)	Observación
1	Corazón: Endocarditis multifocal leve. Páncreas: Leve infiltrado inflamatorio perivascular multifocal. Hígado: Degeneración microvacuolar leve. Leve infiltrado inflamatorio multifocal.
3	Corazón: Hipercontractibilidad focal y multifocal de fibras musculares cardíacas. Páncreas: sin lesión microscópicamente visible (SLMV). Hígado: Degeneración microvacuolar difusa.
6	Corazón: hemorragia entre fibras cardíacas. Páncreas: SLMV Hígado: Degeneración microvacuolar difusa. Congestión de las venas centrolobulillares.
15	Corazón: Hipercontractibilidad de fibras cardíacas. Páncreas: Degeneración de Islotes de Langerhans. Focos de pancreatitis. Hígado: degeneración hidrópica diseminada.

Tabla 15 (Continuación)

**Lesiones inducidas por la Fracción III del veneno de
Bothrops colombiensis en ratón blanco cepa INH.**

Tiempo de evaluación (horas)	Observación
24	Corazón: SLMV. Páncreas: Degeneración de Islotes de Langerhans, focos de pancreatitis. Hígado: DHD. Degeneración hidrópica centrolobulillar
48	Corazón: Hemorragia entre fibras cardíacas. Páncreas: degeneración leve de Islotes de Langerhans. Hígado: degeneración hidrópica centrolobulillar, DHD.
72	Corazón: SLMV. Páncreas: degeneración leve de Islotes de Langerhans, pancreatitis multifocal leve. Hígado: Degeneración microvacuolar difusa. Degeneración hidrópica centrolobulillar. DHD
144	Corazón: Hipercontractibilidad focal leve de fibras musculares cardíacas. Páncreas: degeneración de Islotes de Langerhans. Pancreatitis multifocal leve. Hígado: degeneración hidrópica difusa. Degeneración microvascular difusa.
168	Corazón: Hipercontractibilidad focal de fibras musculares cardíacas. Páncreas: Pancreatitis multifocal leve. Hígado: Degeneración microvacuolar difusa. DHD.
Control sano	Solo lesiones atribuidas a patología espontanea de la especie.
Control Vehículo	Solo lesiones atribuidas a patología espontanea de la especie.

CAPITULO IV

DISCUSIÓN

Caracterización Toxinológica y Clínica del Veneno Total de *Bothrops colombiensis* (Paracotos-Edo. Miranda)

De acuerdo a las condiciones de este estudio el veneno total de *Bothrops colombiensis* de Paracotos-Edo. Miranda fue capaz de inducir actividad letal, hemorrágica, desfibrinante, edematizante, necrosante, actividad pro-coagulante *in vitro* sobre plasma humano y además exhibió actividad tipo fosfolipasa A₂, aspectos que están en concordancia con lo establecido para la gran mayoría de las serpientes de este género (Gutiérrez y Bolaños, 1980; Badillo y col., 1989; Rodríguez-Acosta y col., 1995; Vargas y col., 1996; Rodríguez-Acosta y col., 2000; Rengifo, 2002; Camey y col., 2002; López y col, 2004). Aunque con obvias variaciones cuantitativas al comparar los resultados de este estudio con lo reportado en evaluaciones previas para serpientes de este género, como se evidencia en la tabla 16, la cual resume el perfil toxinológico reportado en estudios previos con serpientes botrópicas de diferentes regiones de América.

Al comparar los resultados obtenidos para la DL₅₀ del veneno total de *Bothrops colombiensis* (Paracotos-Edo. Miranda) con la reportada para venenos homólogos procedentes del Guapo y Cauagua (Girón y col., 2008. Tabla 16), también en el estado Miranda (Figura 5), observamos que el veneno objeto de este estudio presenta un mayor índice de letalidad. Pero si lo comparamos con resultados recientes para un pool general de veneno de *Bothrops colombiensis* de la región de Barlovento- Edo. Miranda con una DL₅₀ de $3,35 \pm 0,33$ mg/kg (n=3) (Comunicación personal. Laboratorio de Investigaciones- Facultad de Farmacia-UCV), este último se perfila con una letalidad superior a la del lote

de veneno empleado en este estudio. Aspectos que pudieran ser una consecuencia de la variabilidad intra-especie entre venenos de serpientes con procedencia de diferentes regiones geográficas, ya que ha sido ampliamente soportado que poblaciones de la misma especie las cuales están ecológicamente aisladas o viven en diferentes hábitat geográficos tienen un elevado potencial para variaciones genéticas en la composición de los venenos, aunque las diferencias entre especies similares localizadas en zonas geográficas estrechas no han sido bien documentadas (Girón y col., 2008).

Por otra parte, si comparamos nuestros resultados con reportes previos para venenos botrópicos heterólogos de importancia médica como *B. asper* (Guatemala, Costa Rica o Colombia) (Saravia y col., 2001; Saldarriaga y col., 2003), *B. jararacá*, *B. jararucusso* (Bogarín col., 2000; Munis y col., 2000), *B. neuwidii* (Argentina o Bolivia) (Segura y col., 2010) o *B. atrox* (Pto. Ayacucho. Edo. Amazonas) (Duque y Scannone, 2006) observamos que estos presentan un mayor índice de letalidad que el veneno de *B. colombiensis* de Paracotos. A diferencia de *B. nummifer* (Honduras) (Rojas y col., 1987), *B. schlegelii* (Magdalena-Colombia) (Otero y col., 1992), *B. Isabelae* (Edo. Trujillo, Venezuela) o *B. atrox* (Edo. Amazonas, Venezuela) (Rodríguez-Acosta y col., 2010) los cuales presentan un menor índice de letalidad que el veneno objeto de este estudio. (Tabla 16).

Mientras que si comparamos con los reportes de Otero y col., 1992 para *B. nasutus* (Colombia), Segura y col., 2010 para *B. atrox* (Perú y Colombia) o de Rojas y col., 2005 para *B. brazili* (Perú) observamos que estos exhiben una letalidad similar a la detectada por nosotros para el veneno evaluado. (Tabla 16) y probablemente refleje un efecto sinérgico similar entre los constituyentes más tóxicos de estos venenos y responsables de esta

actividad en roedores como los factores hemorrágicos y edematizantes los cuales han sido significativamente relacionados a la letalidad mediada por diferentes venenos botrópicos (Ferreira y col., 1992a).

Tabla 16

Comparación de las actividades biológicas del veneno de *B. colombiensis* (Paracotos) con reportes previos para serpientes botrópicas.

Especie	DL ₅₀ (mg/kg)	DHM (µg/ratón)	DEM (µg/ratón)	DDM (µg/ratón)	DCM (µg)	Fuente
<i>B. atrox</i> Pto. Ayacucho	3,07 ± 0,52	5,28 ± 0,37	0,84 ± 0,16	5	OM	Duque y Scannone 2006
<i>B. colombiensis</i> El Guapo	11,6	5,3	NE	NE	NE	Girón y col., 2008
<i>B. colombiensis</i> Caucagua	5,8	11,6	NE	NE	NE	
<i>B. colombiensis</i> Barlovento	5,30 ± 0,1	5,61 ± 0,8	3,49 ± 0,44	4	OM	Laboratorio* Investigaciones
<i>B. venezuelensis</i> (Pool general)	4,58 ± 0,13	6,12 ± 1,16	1,37 ± 0,19	NE	OM	
<i>B. Isabelae</i> Trujillo	5,9	11,5 ± 1,2	NE	NE	OM	Rodriguez-Acosta y col., 2010
<i>B. atrox</i> Bolivar-Venezuela	4,0	2,7 ± 0,4	NE	NE	OM	
<i>B. atrox</i> Amazonas	8,3	4,2 ± 0,5	NE	NE	OM	
<i>B. asper</i> Colombia	3,53 (3,16-3,90)	1,5 ± 0,1	NE	NE	NE	Saldarriaga y col., 2003
<i>B. nasutus</i> Colombia	4,32 (3,58-5,21)	3,4 ± 0,8	NE	4,7 ± 0,4	NE	Otero y col., 1992
<i>B. schlegelii</i> Colombia	10,84 (8,32-14,11)	20,4 ± 0,5	NE	7,5 ± 0,2	NE	
<i>B. brazili</i> Perú	5,51 (4,76-6,37)	3,71 ± 0,41	1,18	NE	NE	Rojas y col., 2005
<i>B. jararaca</i> Argentina	NE	4,4	0,85	NE	NE	Acosta y col., 1998
<i>B. jararacusso</i> Argentina	NE	2,4	1,5	NE	NE	
<i>B. colombiensis</i> Paracotos	4,92 ± 0,16	34,62 ± 6,25	0,62 ± 0,04	3,5	0,5	Este Estudio

OM: otra metodología. NE: no evaluado.* Comunicación personal. Facultad de Farmacia-UCV.

Tabla 16 (Continuación)

Comparación de las actividades biológicas del veneno de *B. colombiensis* (Paracotos) con reportes previos para serpientes botrópicas.

Especie	DL ₅₀ (mg/kg)	DHM (µg/ratón)	DEM (µg/ratón)	DDM (µg/ratón)	DCM (µg)	Fuente
<i>B. jararacusso</i> Brasil	3,10	1,50	NE	NE	NE	Bogarín y col., 2000
<i>B. atrox</i> Perú	4,35	1,4 ± 0,07	NE	1,7 ± 0,4	OM	Segura y col., 2010
<i>B. atrox</i> Colombia	4,47	1,4 ± 0,42	NE	2,2 ± 0,01	OM	
<i>B. neuwiddii</i> Argentina	3,29	0,56 ± 0,04	NE	2,6 ± 0,6	OM	
<i>B. neuwiddii</i> Bolivia	1,23	7,0 ± 1,9	NE	2,0 ± 0,4	OM	
<i>B. jararaca</i>	2,28	0,43	NE	NE	NE	Munis y col., 2000
<i>B. neuwiddii</i> Argentina	NE	1,5	2,05	NE	NE	Acosta y col., 1998
<i>B. alternatus</i> Argentina	NE	3,6	4	NE	NE	
<i>B. asper</i> Guatemala	3,34 (2,62-4,25)	11 ± 3	1 ± 0,1	2,5	NE	Saravia y col., 2001
<i>B. asper</i> Costa Rica	3,79 (3,35-4,23)	0,8 ± 0,1	1,7 ± 0,1	5	NE	Bogarín y col., 1999
<i>B. nummifer</i> Honduras	7,53	18	NE	NE	NE	Rojas y col., 1987
<i>B. colombiensis</i> Paracotos	4,92 ± 0,16	34,62 ± 6,25	0,62 ± 0,04	3,5	0,5	Este Estudio

OM: otra metodología. NE: no evaluado.

En la evaluación de la actividad hemorrágica, uno de los efectos más característicos de los venenos botrópicos (Gutiérrez y Bolaños, 1980; Rodríguez-Acosta y col., 1995; Rengifo, 2002, Isla y col., 2003), observamos que el veneno de *B. colombiensis* de Paracotos exhibe una DHM particularmente elevada al comparar con los reportes previos para serpientes de este género (Tabla 16), sugiriendo una muy escasa actividad hemorrágica en comparación

con otros venenos botrópicos, así como una baja concentración de enzimas tipo metaloproteinasas en el grupo de proteínas con actividad biológica presentes en el veneno evaluado.

Varios autores han propuesto que los principales componentes del veneno responsables por el desarrollo de la actividad hemorrágica, son las metaloproteinasas una gran variedad de enzimas dependientes de zinc, con una masa molecular entre los 15 y 100 kDa., las cuales presentan un alto grado de similitud a las metaloproteinasas de matriz y cuyo mecanismo básico de acción es la disrupción enzimática y posiblemente selectiva de constituyentes de la membrana basal y de la matriz extracelular que rodea las células endoteliales de los capilares y de los pequeños vasos (Baramova y col., 1989; Kamiguti y col., 1996; Gutiérrez and Rucavado, 2000; Rodrigues y col., 2001; Anai y col., 2002; Isla y col., 2003; Rodrigues y col., 2004; Moura y col., 2008; Patiño y col., 2010; Tanjoni y col., 2010).

Adicional al daño local a los tejidos derivado del mecanismo mencionado anteriormente, se ha demostrado que estas toxinas provocan la rápida extensión de los componentes del veneno del área de la inyección a la circulación sistémica, aspecto que puede jugar un rol clave en la patogénesis de las complicaciones locales y sistémicas resultantes de estos envenenamientos (Anai y col., 2002). Lo que podría implicar una correlación entre actividad hemorrágica y letalidad de acuerdo a las condiciones experimentales planteadas, condición que ha sido soportada por algunas evaluaciones experimentales (Ferreira y col., 1992a) y que puede verse reflejada en los resultados previos presentados en la Tabla 16, donde observamos por ejemplo, que los venenos de *B. atrox*, *B. asper* (Colombia/Costa Rica), *B. jararacá* o *B. jararacussu* exhiben una alta actividad hemorrágica y elevada

letalidad o en el caso de los venenos de *B. nummifer* (Honduras) y *B. schlegelii* (Colombia) los cuales exhiben una atípica actividad hemorrágica, para un veneno botrópico, acompañada de una menor letalidad. Sin embargo en el caso de nuestros resultados para el veneno de *B. colombiensis* de Paracotos, esta correlación no se hace evidente ya que observamos una DHM muy elevada acompañada por una DL_{50} que podría considerarse se ciñe a lo esperado para un veneno botrópico, lo que sugiere que para este veneno la letalidad podría estar relacionada a el efecto sinérgico de otras toxinas presentes en el veneno evaluado, sin embargo se requieren evaluaciones al respecto.

Por otra parte también se puede resaltar que la DHM obtenida para el veneno objeto de este estudio es similar a la reportada en estudios previos para algunos venenos del género *Crotalus* (Sur Americano) como *C. d. terrificus* (Colombia) con una DHM de $31,9 \pm 6,1 \mu\text{g}$ (Otero y col., 1992), venenos reconocidos por su menor actividad hemorrágica en comparación con los venenos botrópicos (Gutiérrez y Chaves, 1980; Otero y col., 1992).

En el caso de la evaluación de la actividad edematizante, si comparamos los resultados de nuestro estudio con los publicados en trabajos previos y que se resumen en la tabla 16, observamos que el veneno de *B. colombiensis* de Paracotos presenta la menor DEM, sugiriendo una elevada capacidad de desarrollo de edema en roedores, superando incluso a los venenos de *B. jararaca* ($0,85 \mu\text{g}$) y *B. jararacusso* ($1,5 \mu\text{g}$) los cuales fueron señalados por Acosta y col., (1998), como venenos muy edematizantes.

La actividad edematizante es otro efecto característico de los venenos botrópicos, el cual incluso ha sido reconocido en diversos estudios epidemiológicos como presente hasta en el

100 % de las víctimas (Haad, 1980/1981; Badillo y col., 1989; Otero y col., 1996; Bucarechi y col., 2001). Numerosas evaluaciones experimentales han permitido sugerir que en el caso de los venenos botrópicos el edema es probablemente debido a la acción de una variedad de sustancias como (a) las proteasas las cuales actúan sobre kininógenos del plasma liberando kininas (bradiquinina), (b) enzimas tipo fosfolipasas A₂ que actúan liberando ácido araquidónico de los fosfolípidos de membranas celulares, iniciando la vía de las prostaglandinas o por medio de la liberación de histamina y serotonina de mastocitos, (c) toxinas que actúan directamente sobre las células endoteliales de capilares y vénulas incrementando su permeabilidad y (d) las toxinas hemorrágicas las cuales lesionan la microvasculatura induciendo extravasación. (Gutiérrez and Lomonte, 1989; Chaves y col., 1995; Acosta y col., 1998; Chaves y col., 1998; Landucci y col., 1998; Petretski y col., 2000a y b; Rodrigues y col., 2001; Kanashiro y col., 2002; Barbosa y col., 2003; Moura y col., 2008), aspectos que pudieran estar implicados en el desarrollo de la importante actividad edematizante mediada por el veneno evaluado.

Por otra parte, durante la evaluación de la actividad edematizante observamos para los diferentes ensayos realizados, que no se evidenció la presencia de hemorragia plantar en el rango de dosis evaluadas. Este efecto, a diferencia de nuestro estudio, es usualmente reportado en la evaluación del edema desarrollado por venenos botrópicos como en el caso de *B. insularis* (> 0,25 µg), *B. lanceolatus* (≥ 0,5 µg), *B. asper* (> 5 µg), *B. jararacá*, *B. jararacusso*, *B. neuwiedii*, *B. dipurus*, *B. alternatus* (5 µ), y *B. atrox* (Pto. Ayacucho) (> 0,5 µg) (Chaves y col., 1995; Acosta y col., 1998; Lobo y col., 2000; Boechat y col., 2001; Barbosa y col., 2003, Duque y Scannone, 2006), venenos con importantes DHM, a diferencia de la obtenida por nosotros para *B. colombiensis* (Paracotos), además de que en

algunos de ellos como *B atrox* (Brasil) (Petretski y Cols, 2000b) hay evidencias directa de la participación de algunas de sus metaloproteinasas en el edema desarrollado por dicha especie. Lo que nos permite referir que en el caso del veneno evaluado, el efecto hemorrágico no es un elemento esencialmente involucrado en el desarrollo de la actividad edematizante y dado que aún no hay estudios que permitan señalar el mecanismo fisiopatológico implicado y que este señalamiento se hace con base en una sencilla evaluación macroscópica, obviamente se hacen necesarios el desarrollo de estudios al respecto de manera de especificar los mecanismos implicados en la fisiopatología de este efecto.

Con relación a la actividad desfibrinante al comparar nuestros resultados con los presentados en la tabla 16 para estudios previos, observamos que el veneno de *B. colombiensis* de Paracotos exhibe una DDM que sugiere una mayor capacidad desfibrinante en dicho veneno en relación con las reportadas para *B atrox* (Pto Ayacucho), *B. asper* (Costa Rica), así como *B. nasutus* y *B. schlegelii* (Colombia). Mientras que si comparamos nuestro resultado contra los reportes de Segura y col. (2010) para venenos de *B. atrox* (Perú y Colombia) y *B. neuwidii* (Bolivia y Argentina) o los de Saravia y col. (2001), para el veneno de *B. asper* (Guatemala) observamos que estos presentan una menor DDM, sugiriendo una menor actividad desfibrinante en el veneno objeto de este estudio.

Los venenos que inducen desfibrinación *in vivo* obviamente también pueden promover la coagulación *in vitro*, con respecto a la actividad coagulante encontramos que los estudios presentados en la tabla 16 en algunos casos no se evaluó esta actividad mientras que en otros se empleó una metodología diferente a la establecida en nuestro protocolo de trabajo,

aspecto que limita la comparación de nuestros resultados, con este grupo de importantes venenos botrópicos. Sin embargo estudios previos del Laboratorio de Investigaciones (Facultad de Farmacia-UCV) con venenos de *Crotalus durissus cumanensis* refieren para especímenes de Margarita, Barquisimeto y Clarines una DCM de 2,5 µg, 5µg y 20 µg respectivamente, así como para especímenes de *Crotalus pifanorum* con DCM de 2,5 µg, lo que nos permite referir para el veneno objeto de este estudio una muy efectiva DCM, sugiriendo un veneno potencialmente rico en enzimas procoagulantes.

Estas dos últimas actividades son responsables de las coagulopatias observadas en víctimas humanas, las cuales representan una de las manifestaciones clínicas más frecuentes en los accidentes botrópicos (Haad, 1980/81; Rodríguez-Acosta y col., 2000; Anai y col., 2002; Smalligan y col., 2004). Estas alteraciones en los sistemas de coagulación, son la consecuencia del efecto conjunto (aditivo y/o sinergista) de una variedad de enzimas presentes en los venenos botrópicos, como enzimas tipo trombina, activadores de protrombina o del factor X entre otros, las cuales aceleran el sistema de la cascada de coagulación por lo que inducen a la disminución de la concentración del fibrinógeno y otros factores (Giron y col., 2008). En el caso del veneno de *B. colombiensis*, evaluaciones previas han reportado la presencia de constituyentes con actividad tipo trombina, tipo factor Xa y fibrinolítica, demostrando así la versatilidad de estos constituyentes en este veneno venezolano (Gabrijelcic y col., 1982 y Giron y col., 2008).

En el caso de la actividad tipo PLA₂ evaluada por la titulación de los ácidos grasos liberados a partir de los fosfolípidos presentes en la yema de huevo, lo que implica la evaluación de la actividad de las enzimas pertenecientes al subgrupo Asp 49, de acuerdo a

lo mencionado anteriormente. Se puede referir que nuestros resultados son similares a los obtenidos por venenos de especímenes como *B. atrox* de las localidades de Pto. Ayacucho o el Paují los cuales presentan niveles de actividad de 57 y 55 U, respectivamente (Vargas y col., 1996) y *B. venezuelensis* con 54,840 U (Grillo y col., 1994a), datos que sugieren igual proporción de enzimas tipo PLA₂ con actividad catalítica en estos venenos. Mientras que si comparamos con su homólogo *B. colombiensis* de la región de Barlovento (Edo. Miranda) con una actividad PLA₂ de 110,20 U (Grillo y col., 1994c), esto sugiere que el veneno objeto de este estudio presenta una menor proporción de enzimas PLA₂ del subgrupo Asp 49.

Estas enzimas tipo PLA₂ son hidrolasas esterolíticas, que catalizan la hidrólisis de 3 fosfogliceridos en la posición 2. Se ha reportado que los venenos de serpientes son ricos en dichas enzimas y muchos de ellos contienen un gran número de isoenzimas como *Naja naja* o *Bothrops asper* el cual contiene más de 10 isoenzimas PLA₂. Varios cientos de PLA₂ de venenos de serpientes han sido aisladas, purificadas y caracterizadas y se ha reportado que presentan actividad catalítica similar y propiedades de hidrolizar fosfolípidos, además de inducir un amplio espectro de efectos farmacológicos, entre los cuales destacan neurotoxicidad, cardiotoxicidad, miotoxicidad, hemólisis, bloqueo neuromuscular, edema, efecto anticoagulante, hipotensor e inhibidor de la agregación plaquetaria, entre otros (Manjunatha and Evans, 1989; Chaves y col., 1998; Toyama y col., 2001; Kini, 2003; Manjunatha, 2005; Angulo and Lomonte, 2009; Leite y col., 2011).

Adicionalmente el veneno de *B. colombiensis* (Paracotos) indujo actividad necrosante, éste es otro de los efectos locales que caracteriza los accidentes ocasionados por las serpientes

de este género. (Gutierrez y Chaves, 1980; Calil y col., 2002; Huatuco y col., 2004; Gutiérrez, 2011). Dicho efecto fue evidenciado por la cuantificación de la actividad de la enzima CPK, marcador que se encuentra en altas concentraciones en el citoplasma de las células musculares (cardiacas y esqueléticas), así como en cerebro constituyendo diferentes isoenzimas, las cuales son liberadas al fluido intersticial y a la sangre luego del desarrollo de una lesión celular (Gutierrez and Lomonte, 1995; Huatuco y col., 2004).

A pesar de la existencia de esas diferentes isoenzimas, su utilidad como marcador de miotoxicidad se fundamenta en diferentes estudios efectuados con venenos, los cuales han permitido establecer que más del 95 % de la elevación de la CPK en plasma tras la inyección de veneno por la vía IM, corresponde a la isoenzima de músculo esquelético. (Manual de Procedimientos. Instituto Clodomiro Picado, 1998).

Al comparar nuestros resultados con estudios previos para venenos botropicos y sus miotoxinas aisladas y purificadas se observó que dichas evaluaciones refieren que para la mayoría de estos venenos el pico en los niveles de CPK está entre las 1 y 3 horas post-exposición (Gutiérrez and Lomonte, 1995; Vargas y col., 1996; Kanashiro y col., 2002; Huatuco y col., 2004; Maruñak y col., 2005; Garcia y col., 2006; Queiroz, 2011) a diferencia de nuestras observaciones, en las cuales se obtuvo el pico de actividad de CPK a las 6 horas post-inyección, sugiriendo la posible participación de mecanismos fisiopatológicos alternativos.

Por otra parte pudimos verificar que nuestros resultados son similares a los obtenidos en diferentes estudios realizados con metaloproteasas hemorrágicas, como el reseñado por Gay

y col. (2005) quienes en el estudio del veneno de *Bothrops alternatus* aislaron una enzima con una DHM de 1,9 µg la cual induce una mionecrosis con niveles máximos de CPK a las 6 horas, los cuales ya no son diferenciados de sus controles a las siguientes 24 horas. Así como en evaluaciones con otras especies de serpientes, como *Crotalus durissus cumanensis* (Pool del serpentario de la UCLA) (Noriega y col., 2009) o en el caso de su homólogo de Margarita Edo. Nva. Esparta (Meza y Vargas, 2008), aspectos que nos podrían sugerir una relevante participación de la porción hemorrágica del veneno de *Bothrops colombiensis* en la actividad necrosante mediada por este veneno, una menor afinidad de las enzimas tipo PLA₂ a las estructuras musculares, una menor biodisponibilidad de las mismas o quizás diferencias en la potencia y cinética de acción de las miotoxinas presentes en los venenos de serpientes como refieren Cintra y col. (2010).

Sin embargo en el estudio histológico desde la primera hora post-inyección se observaron lesiones tipo degeneración focal de fibras musculares y en algunos individuos fragmentación. Mientras que al incrementar el tiempo post-exposición a las 6 horas, momento en el que se alcanzó el pico en la actividad de la enzima CPK, se evidenció un incremento en el número de individuos evaluados con fragmentación de fibras musculares, seguido de hipercontractilidad a partir de las 15 horas post-inyección. Sin reportes del desarrollo de lesión hemorrágica en algún grupo experimental, lo que nos permite excluir su participación en el desarrollo de ese máximo de CPK tardío observado en nuestras evaluaciones con el veneno de *Bothrops colombiensis*. Por otra parte, se observó que dichas observaciones histológicas coinciden, con las alteraciones morfológicas reportadas en estudios previos con venenos botrópico, miotoxinas e incluso metaloproteasas no hemorrágicas (Clase PI), aisladas y purificadas de estos venenos, en fibras musculares

(Gutiérrez and Lomonte, 1995; Calil y col., 2002; Kanashiro y col., 2002; Souza y col., 2002; Garcia y col., 2006; Baldo y col., 2010). Entre estos, Gutiérrez y col. (1995) refieren que las lesiones inducidas por miotoxinas en las fibras musculares son focales, periféricas y con forma de cuña, las cuales son observadas 15 min. después la inyección y son idénticas a las lesiones delta originalmente descritas en la distrofia muscular de Duchenne, así como en la mionecrosis inducida por detergentes, las cuales son áreas focales de degeneración localizadas en la porción inferior de la célula donde la membrana plasmática es discontinuada o perdida, después de esta alteración inicial hay hipercontracción de miofibrillas con apiñamiento de miofilamentos, lesiones también observadas por otros agentes miotóxicos de venenos de serpientes tales como cardiotoxinas y PLA₂ elapídicas. Más recientemente, Baldo y col. (2010) tras la evaluación una metaloproteasa no hemorrágica (Clase PI) aislada del veneno de *Bothrops neuwiedi* sobre el músculo esquelético de ratón (50 µg IM), reportaron tras la primera hora post exposición interrupción en la continuidad de la membrana plasmática, a las 3 horas desorganización de miofibrillas y a las 6 horas hipercontracción de miofilamentos y mitocondrias edematizadas, todo esto sin la detección de eritrocitos en el espacio intersticial confirmando la ausencia de hemorragia en el músculo esquelético tratado. Adicionalmente en este mismo estudio, tras descartar la contaminación de la enzima con miotoxinas PLA₂, los autores evaluaron su efecto sobre las proteínas citoplasmáticas de las células musculares reportando, con base en técnicas electroforéticas, la hidrólisis minoritaria de actina y drástica o más selectiva por la miosina. Evidencias experimentales que sugieren que los componentes de venenos estructuralmente diferentes pueden inducir un modelo similar de cambios patológicos. Aspectos que nos indican que los resultados observados en nuestro estudio para el parámetro clínico CPK, discutido previamente podrían estar relacionados

básicamente con las lesiones tardías mediadas por enzimas tipo PLA₂ o incluso metaloproteasas presentes en el veneno.

Por otra parte en nuestra evaluación llama la atención un segundo máximo de actividad de CPK el cual se observó a las 144 horas (6to día) post-exposición y que no alcanzó a las siguientes 168 horas (7mo día) niveles comparables a los controles del experimento, lo que podría sugerir una escasa recuperación de los miocitos afectados por la acción de los diferentes constituyentes del veneno. Estos resultados son similares a los obtenidos en evaluaciones con veneno de especímenes de *Crotalus durissus cumanensis* (Clarines-Edo. Anzoategui), donde se observó exactamente a las 144 horas post-inyección un segundo pico de actividad para CPK con niveles de aproximadamente 11,5 veces el control del experimento (Comunicación Personal, Laboratorio de Investigaciones-Facultad de Farmacia-UCV).

Estas alteraciones bioquímicas y estructurales han sido principalmente relacionadas con la acción local de enzimas tipo PLA₂ presentes en los venenos, por ejemplo en estudios de neutralización selectiva con veneno de *B. asper* se ha demostrado que la neutralización de las PLA₂ I y II (en el veneno crudo) con anticuerpos específicos antimiotoxinas derroga respectivamente el 79 y el 75 % del daño muscular inducido en ratones. Mientras que en el caso de *B. jararacussu*, el antisuero de ratón contra miotoxinas del veneno, neutralizó virtualmente todo el efecto miotóxico del veneno crudo, en ensayos con preincubación, evaluaciones que sugieren que estas toxinas son las principales responsables por la mionecrosis en el envenenamiento por estas especie botrópica (Gutierrez and Lomonte, 1995; Angulo and Lomonte, 2009).

Estas miotoxinas botropicas con base en su caracterización bioquímica y secuenciación de aminoácidos se han clasificado dentro del grupo II A, junto con todas las enzimas de los venenos crotalidos/viperidos y las PLA₂ no pancreáticas secretadas por mamíferos (Gutiérrez and Lomonte, 1995; Kanashiro y col., 2002). Adicionalmente estas miotoxinas son divididas en dos subgrupos llamados el Asp 49 que incluye isoformas que son activas catalíticamente y el grupo homólogo de PLA₂ Lys 49 con poca o ninguna actividad enzimática, pero con una importante actividad miotóxica (Núñez y col., 2004; Angulo and Lomonte, 2009; Leite y col., 2011). La secuencia de eventos a nivel molecular y celular por el que estas enzimas inducen lesión muscular es completamente desconocido, sin embargo se ha establecido que las PLA₂ Asp 49 utilizan su actividad catalítica, dependiente de calcio, sobre los fosfolípidos de membrana como parte del mecanismo del daño celular, mientras que en evaluaciones con PLA₂ tipo Lys 49, como la miotoxina II aislada del veneno de *B. asper* se ha sugerido la interacción de la región catiónica C-terminal de la enzima, con motivos aniónicos sobre la membrana blanco con una subsecuente pérdida del control de su permeabilidad, lo que conduce en ambos casos a una gran entrada de calcio en las células musculares lo cual conlleva a una cascada de eventos tales como la pérdida de la función mitocondrial, proteólisis general, hipercontracción miofibrilar y adicionalmente eventos degenerativos que aún esperan una detallada descripción (Gutiérrez and Lomonte, 1995; Angulo and Lomonte, 2009; Kini, 2003; Cintra, 2010).

Caracterización Clínica del Veneno Total de *Bothrops colombiensis*

En lo concerniente a la caracterización clínica del veneno total, observamos que en los ratones tratados con el veneno de *Bothrops colombiensis* (Paracotos) hubo alteraciones en marcadores como AST, ALT, urea, amilasa y en menor proporción creatinina y glicemia.

La ALT y la AST son enzimas miembros de la familia de las transaminasas y son algunas veces llamadas glutamato piruvato transaminasa (GPT) y glutamato oxalacetato transaminasa (GOT), respectivamente. La ALT es hallada en grandes cantidades dentro del citoplasma hepático y en menor proporción en músculo esquelético, riñón, corazón, páncreas, pulmones, bazo y eritocitos, siendo considerada más específica para el hígado. Mientras que la AST se encuentra predominantemente en citoplasma hepático, en el músculo del miocardio, esquelético y en el riñón, mientras que la forma mitocondrial de esta enzima se encuentra en el hígado principalmente, siendo menos sensible y específica para el hígado (Gráfica, 37). Sin embargo los incrementos séricos de ambas enzimas se considera reflejan daño hepático activo que puede ser agudo o crónico, convirtiéndose en marcadores de enfermedad hepatocelular y hay que considerar que no necesariamente la muerte celular es el gatillo para la liberación de estas enzimas a la circulación, su liberación también se ha asociado a un incremento en la permeabilidad celular (Ward y Cockayne, 1993; Limdi and Hyde 2003; Quiroz y Bouda, 2007). Con esto en consideración podemos referir que nuestros resultados sugieren que el veneno de *B. colombiensis* podría inducir lesiones principalmente en tejido hepático. Observaciones similares en roedores, han sido reportadas con diferentes venenos botropicos como *B. asper* (100 µg) (Chaves y col., 1989), *B. jararacussu* (25 y 50 µg) (Zeni y col., 2007), *B. jararaca* (ratas, 110 µg)

(Goncalves y col., 2008) y *B. alternatus* (ratas, 800 µg) (Teibler y col., 1999). Así como con venenos de otros géneros como *Crotalus durissus cumanensis* para venenos de serpientes juveniles (Noriega y col., 2010) y adultas (Meza y Vargas, 2008; Noriega y col., 2009).

Por otra parte, si comparamos entre si los perfiles obtenidos en este estudio para la ALT y la AST en ambos casos observamos un comportamiento similar con relación al momento de inicio, su progreso y el tiempo en el que se alcanzó el máximo nivel de actividad para ambas enzimas, lo que podría sugerir que estos marcadores en suero podrían tener una procedencia tisular en común. Mientras que si comparamos los incrementos detectados para los niveles de AST y ALT obviamente con relación a sus respectivos controles, observamos que el incremento en los niveles de AST fueron mayores a los de ALT (AST>ALT), lo que podría sugerir no sólo destrucción celular, sino también lesiones a nivel de las mitocondrias y en consecuencia liberación de AST mitocondrial. (Ward and Cockayne, 1993). Resultados similares fueron reportados por Zeny y col. (2007) en la evaluación del veneno de *B. jararacussu* en ratones, refiriendo los autores posible daño hepático o incluso lesión en músculo esquelético, así como por Meza y Vargas (2008) en la evaluación del veneno de *Crotalus durissus cumanensis* (Isla de Margarita-Edo. Nueva Esparta).

Adicionalmente considerando que los niveles de AST pueden también incrementarse considerablemente en respuesta a un daño muscular severo (Ward and Cockayne, 1993; Quiroz y Bouda, 2007) y considerando los picos de actividad para la CPK, para los mismos grupos de animales evaluados, a las 3 (inicio), 6 (máximo), 15 (caída) y principalmente 144 horas (2do máximo de actividad), pudiéramos referir que este incremento en actividad para

la AST podría estar también relacionado a las lesiones en musculo esquelético y/o cardíacas desarrolladas por el veneno de *B. colombiensis*, lo cual coincide con reportes previos para diversos venenos botropicos como *B. jararacá*, *B. alternatus*, *B. neuwiedii* y *B. asper*. (Chaves y col., 1989; Teibler y col., 1999; Koscinczuc y col., 2007; Goncalves y col., 2008), así como con nuestros venenos crotálicos, específicamente *Crotalus durissus cumanensis* (Noriega y col., 2009; Noriega y col., 2010).

Gráfica 37

Representación esquemática de la distribución de AST y ALT en tejidos.

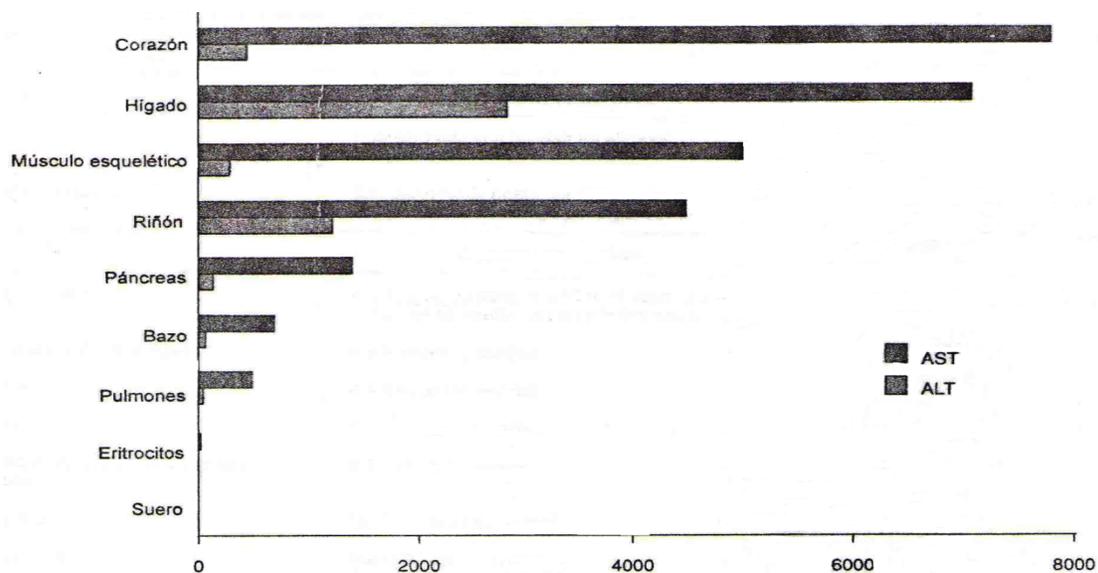


Fig. 14-8. Tejidos que producen AST y ALT.

Tomado de Ward K and Cockayne S. (1993)

Con relación a las evaluaciones histopatológicas, en tejido hepático no hubo resultados concluyentes con relación a las lesiones reportadas, las cuales correspondieron específicamente a degeneración hidrópica difusa (1 a 15 horas) y degeneración microvacuolar difusa (15 a 168 horas), las cuales constituyen lesiones celulares reversibles y se considera que no significan un riesgo vital para la célula (Teibler y col., 1999;

Maruñak y col., 2011). La degeneración hidrópica es una forma intensa de edema celular, en la cual se observan vacuolas citoplasmáticas, mientras que la degeneración microvacuolar implica daños más graves en las células, que comprenden la acumulación de agua en las mitocondrias, lo cual produce la ruptura de las crestas mitocondriales, con aumento del tamaño mitocondrial de hasta cinco veces el tamaño normal. Efectos que son la consecuencia de alteraciones en los procesos de regulación del volumen celular, es decir del mecanismo que controla la concentración de iones en el citoplasma, particularmente del sodio y que actúa en tres niveles: (1) la membrana citoplasmática, (2) la bomba de sodio de la membrana citoplasmática y (3) el aporte de adenosin trifosfato (ATP) (Guyton y Hall, 2006).

Resultados similares fueron reportados por Teibler y col. (1999) y Maruñak y col. (2011) con veneno de *B. alternatus* en roedores tratados con 800 µg (ratas) y 20 µg (ratones) respectivamente, resultados que fueron adicionalmente considerados irrelevantes por los autores o las observaciones de Acosta y col. (1996) en ratones tratados con 50 µg de veneno de *B. alternatus*. Adicionalmente el estudio histopatológico a 2 víctimas fatales de envenenamiento por *Crotalus durissus terrificus* (São Paulo, Brasil), mostró degeneración hidrópica y daño mitocondrial en el hígado lesiones que fueron atribuidas a dos mecanismos el efecto del veneno sobre las mitocondrias hepáticas y/o a los efectos de citoquinas sobre los hepatocitos (Barraviera, 1995). Estudios previos, que aunados a nuestros resultados podrían sugerir un leve efecto hepatotóxico del veneno de *B. colombiensis* (Paracotos) en roedores.

Por otra parte diferentes reportes de evaluaciones previas con otros venenos botrópicos han señalado lesiones más severas como por ejemplo Chaves y col. (1989) reportaron el desarrollo de necrosis en tejido hepático de ratones tratadas con veneno (100 µg) de *B. asper*. Mientras que Noriega y col. (2010) en la evaluación del veneno de la serpiente *Crotalus durissus cumanensis* (0,75 mg proteína/Kg peso corporal) reportaron que éste indujo en hígado de ratones además de tumefacción celular severa, necrosis coagulative focal. Sin embargo considerando que nuestro protocolo de trabajo contempló el tratamiento de los animales con 40 µg de veneno (2,10 mg/Kg) podríamos referir al comparar con el veneno de *B. asper* (Chaves y col., 1989) que la severidad de las lesiones observadas pudieran ser consecuencias de un efecto dosis dependientes, pero con relación al veneno de *Crotalus durissus cumanensis* (Noriega y col., 2010) se podría sugerir que el veneno objeto de este estudio presenta una hepatotoxicidad relativamente escasa.

Por otra parte, en nuestros resultados llama la atención que a las 168 horas (7 días) posteriores a la aplicación del tratamiento, los estudios histopatológicos refieren la persistencia de estas lesiones, lo que podría sugerir la permanencia de los agentes hepatotóxicos del veneno impidiendo la regeneración celular propia de dicho proceso patológico, esto con base en observaciones como las de Reyes y col. (2009) quienes en la evaluación del veneno de *Bothrops asper* (2,1 µg/g peso) en ratas, reportaron la presencia de concentraciones séricas circulantes en sangre entre 7 y 10 días post exposición al veneno.

En los resultados histopatológicos a nivel de músculo cardíaco los expertos reportaron necrosis multifocal de fibras cardíacas (1 hora), fragmentación de fibras cardíacas (3 horas),

hipercontractibilidad de fibras musculares (3, 15, 48, 144, 168 horas) y ruptura multifocal de fibras cardiacas (24, 72, 96 horas) reflejando posiblemente la acción de los constituyentes tóxicos del veneno de *Bothrops colombiensis* sobre la estructura cardiaca y sugiere la necesidad de estudios al respecto que permitan especificar la fisiopatología y el alcance de este veneno bótropico sobre este importante órgano blanco.

Son escasas las evaluaciones relacionadas a la cardiotoxicidad de los venenos botrópicos, sin embargo podemos citar que Chaves y col. (1989) en la evaluación del veneno de *B. asper* en roedores refiere el desarrollo de pocos focos de necrosis a las 3 horas de exposición al veneno en músculo cardiaco, lesiones que se evidenciaron progresivas en su extensión a las siguientes 24 horas post evaluación. Mientras que Báez y col. (2005) refieren el desarrollo de necrosis coagulativas de fibras musculares aisladas en el miocardio de un canino de 6 meses a las 18 horas de un accidente con una serpiente del género *Bothrops* (*yarará*), lesiones que son consideradas podrían ser consecuencia de la acción sistémica de las enzimas tipo metaloproteasas y las fosfolipasas A₂ presentes en estos venenos. Mientras que con modelos experimentales que emplean órgano aislado se ha reportado por ejemplo que el veneno de *B. jararacussu* (2,5-10 µg/mL) indujo un aumento de los niveles de CPK en la solución de perfusión (Sifuentes y col, 2008), mientras que *B. marajoensis* (30 µg/ml) bloqueó la conducción eléctrica del corazón y simultáneamente indujo hipotensión y bradicardia, así como con las PLA₂ aisladas del mismo veneno (Liberato y col, 2010). Álvarez y col. (2010) en la evaluación de la cardiotoxicidad del veneno de *B. colombiensis* (Edo. Aragua) en un modelo de embrión de pollo *in vivo* e *in vitro* refieren, para la primera hora post exposición al veneno, cambios en el nivel de oxidoreducción, disminución de la frecuencia cardiaca y alteraciones en la morfología

mitocondrial sugiriendo los autores que probablemente el veneno de *B.colombiensis* pudiera estar promoviendo la activación de factores mitocondriales y otras vías constitutivas de muerte celular

Por otra parte en estudios epidemiológicos no se le da relevancia a los posibles efectos sistémicos de los constituyentes de los venenos botrópicos sobre el músculo cardiaco, sino que son usualmente orientados a la evaluación de los importantes efectos hemostáticos ocasionados por estos venenos (Maruyama y col., 1990; Kamiguti y col., 1991; Santoro y col., 2008) los cuales pueden conllevar a los fenómenos de sangrado y exudación a nivel local y sistémico que podrían originar un cuadro de hipovolemia que puede evolucionar hasta un shock cardiogénico, complicacion a veces desarrolladas en el accidente botrópico. Sin embargo nuestras observaciones y las evidencias reportadas en estudios previos sugieren que existe actividad del veneno sobre las estructuras cardiacas y evidencia la necesidad de estudios al respecto, así como considerar en pacientes mordidos por especímenes de *Bothrops colombiensis*, el descartar procesos que afecten gravemente al corazón, tomando todas las medidas que detecten precozmente, alteraciones del ritmo y de la función cardiaca.

A nivel renal la histopatología mostró tumefacción turbia difusa (1 a las 168 horas) y necrosis cortical y yuxtamedular difusa (1 y 6 horas, sólo 2 individuos), evidenciando el efecto de los constituyentes del veneno sobre este importante blanco celular. Siendo las lesiones predominantes la tumefacción turbia, este tipo de alteración celular ha sido reportada en estudios previos con venenos de *Bothrops asper* de Colombia (500 µg) en ratas, sin embargo las lesiones estuvieron limitadas exclusivamente a la primera hora post

exposición al veneno, observándose en los siguientes lapsos postratamiento (48, 96, 144 y 288 horas) el desarrollo de patologías renales progresivas con el paso del tiempo (Reyes y col, 2009). Mientras que Maruñak y col. (2011) en la evaluación del veneno de *Bothrops alternatus* recién nacidas (20 µg), en ratones también reportan este tipo de lesión celular pero en este caso en riñón de individuos expuestos durante 3 y 6 horas al veneno evaluado, lesiones que desaparecían con un mayor tiempo de exposición al veneno y que fueron adicionalmente consideradas como irrelevantes por sus autores.

Estos resultados aunados a nuestras observaciones, derivadas como se mencionó anteriormente del tratamiento de ratones con 40 µg de veneno de *Bothrops colombiensis*, nos permiten sugerir que estas diferencias entre dichas evaluaciones podrían ser la consecuencia de una relación dosis dependiente e incluso de posible diferencias entre los diferentes modelos experimentales evaluados, ya que la especificidad de las toxinas dependerá de la distribución anatómica de sus posibles receptores y sus efectos farmacológicos serán proporcionales a la cantidad de toxina introducida y a la cantidad de receptores disponibles (Koscinczuck y col., 2011).

Se ha señalado que los venenos de serpientes son excretados principalmente a nivel renal, siendo lo riñones considerados órganos especialmente vulnerable a sus lesiones tóxicas puesto que reciben casi una cuarta parte del volumen minuto cardiaco y transportan y concentran en su parénquima no sólo estas toxinas presentes en los venenos, naturalmente destinadas a la digestión *in vivo* de las presas, sino también otros productos de desecho orgánico como la hemoglobina o la mioglobina, pudiendo alcanzar en consecuencia niveles de 10 y hasta 20 veces la concentración sanguínea (Koscinczuck y col., 2003; Koscinczuck y

col., 2007; Reyes y col., 2009; Mello y col., 2010), esto podría llevar en consecuencia al desarrollo de patologías renales que se acentúan con el tiempo de exposición al veneno e incluso de acuerdo a los expertos tras la inoculación de dosis bajas de veneno, que podrían no producir lesiones aparentemente visibles e inmediatas (Reyes y col., 2009). Por ejemplo Reyes y col. (2009) en la evaluación de 500 µg de veneno de *B. asper* (Colombia) en ratas, refiere que estudios histopatológicos evidenciaron para la primera hora glomérulos congestionados con tumefacción, después de 48 horas una glomerulonefritis, seguida de un colapso glomerular a las 96 horas y a las 144 horas glomerulonefritis membranosa y proliferativa, culminando con la desaparición de la cápsula de Bowman y la estructura total del glomérulo a las 288 horas post exposición.

En la etiología de estas lesiones han sido señaladas las enzimas proteolíticas y sustancias vasoactivas que actuarían sobre las células epiteliales tubulares, enzimas procoagulantes responsables de coagulación intravascular diseminada, efectos de agentes nefrotóxicos directos, algunas miotoxinas, así como lesiones por depósito de algunos pigmentos, efectos isquémicos por hipotensión sistémica, mecanismos que se ha reportado varían entre las diferentes especies de *Bothrops* (Boer y col., 1999; Havt y col., 2001; Barbosa y col., 2002; Koscinczuk y col., 2003; Barbosa y col., 2006; Goncalves y col., 2008; Reyes y col., 2009; Maruñak y col., 2011). Sin embargo dada la ligera toxicidad renal evidenciada por el veneno objeto de este estudio, se podría referir que muchos de estos factores etiológicos posiblemente no estén presentes en el veneno de *Bothrops colombiensis* evaluado o se encuentren en muy bajas concentraciones en el mismo.

Con relación a los individuos que presentaron necrosis cortical (1 ratón) y yuxtamedular difusa (1 ratón), considerando que todos los individuos fueron tratados de forma consecutiva con alícuotas procedentes de una misma solución del veneno y las lesiones fueron evidenciadas en sólo un individuo, éstas podrían ser consecuencia de alguna susceptibilidad en particular de estos dos individuos aunado a la presencia del veneno. Además que en las determinaciones de creatinina realizadas para el momento de dichas observaciones (1 y 6 horas) no se detectaron incrementos estadísticamente significativos de los niveles de este parámetro en el suero evaluado.

Por otra parte, al observar los parámetros bioquímicos para todos los grupos evaluados de acuerdo al protocolo de trabajo, encontramos que no hubo alteración estadísticamente significativa en los niveles séricos de creatinina, pero si se detectó incremento en los niveles de BUN desde la primera hora post exposición hasta las siguientes 144 horas, lo cual podría ser una consecuencia de una reducción en el índice de filtración glomerular, derivado de un flujo sanguíneo renal inadecuado, sugiriendo una insuficiencia renal de causas pre-renales (Aronson and Thier, 1988), reportes similares de uremia pre-renal fueron hechas en evaluaciones previas con otros venenos botrópicos como *B. jararaca* (Oliveira y col., 2007).

La uremia pre-renal se considera una consecuencia de hipovolemia, hipotensión, anomalía cardíaca, lesiones estructurales de las arterias renales o cualquier causa que produzca hipoperfusión renal (Oliveira y col., 2007). En el caso del veneno objeto de este estudio,

observamos que tiene una muy escasa actividad hemorrágica y no hay reportes histopatológicos de lesiones arteriales en los ratones evaluados, pudiendo descartar estas posibilidades como causales de la situación descrita anteriormente. Por otra parte vemos una serie de alteraciones cardiacas importantes, que quizás puedan reducir efectivamente el gasto cardiaco y adicionalmente reportes previos en venenos de serpientes como *Crotalus durissus cascavella*, *Bothrops moojeni* y *B. jararacá* entre otros, han atribuido parte de la fisiopatología de la falla renal a las alteraciones circulatorias e hipotensión ocasionada por la liberación de mediadores químicos endógenos tales como histamina, bradiquinina, eicosanoides, óxido nítrico y citoquinas, los cuales podrían afectar el control del flujo arteriolar glomerular (Havt y col., 2001; Barbosa y col., 2002; Castro y col., 2004; Koscinczuc y col., 2007; Goncalves y col., 2008). Aspectos que no se pueden descartar y hasta podrían sugerir la necesidad de estudios al respecto, que permitan establecer en este veneno botrópico, la presencia de proteínas que medien la producción de agentes hipotensores endógenos y su posible relación en la uremia pre-renal mediada por este veneno.

En la evaluación histopatológica del páncreas los expertos refieren en algunos pocos individuos (4 ratones correspondientes a las 24, 48, 144 y 168 horas) lesiones no relacionadas a los efectos del veneno y no hay alteraciones estadísticamente significativa en los niveles de glicemia de los ratones evaluados, sugiriendo que no hubo afectación por los constituyentes tóxicos del veneno objeto de este estudio, del componente endocrino del páncreas. Sin embargo en la determinación de la amilasa sérica se observó un patrón que implicó el incremento sostenido de sus niveles desde las 24 a las 144 horas post

tratamiento. La amilasa es una metaloenzima dependiente de calcio, la cual pertenece a la clase de las hidrolasas, sus principales fuentes tisulares son las glándulas salivales y las células acinares del páncreas, es una enzima que contribuye principalmente a la digestión del almidón, el glucógeno y sus productos de descomposición. Su significado clínico está asociado básicamente con el diagnóstico de pancreatitis, sin embargo se observa hiperamilasemia en otras patologías como apendicitis aguda, enfermedades de las glándulas salivales, adenocarcinoma de pulmón, ovarios o páncreas y trastornos hepáticos y renales (Ward y Cockayne, 1993). Por otra parte es necesario considerar, que la concentración de amilasa en suero refleja el estado regular entre los índices de ingreso y depuración de la amilasa de la sangre, así que la hiperamilasemia puede ser producto tanto de un aumento del índice de ingreso o de una disminución de la depuración metabólica de amilasa de la circulación, proceso mediado a nivel renal (Mcphee, 2000). Entonces en consecuencia a este último punto, una pobre función renal podría conllevar implícitamente a un incremento de la amilasa sérica (Ward and Cockayne, 1993), por lo que considerando que nuestros resultados muestran una hiperuremia posiblemente de causas pre-renales y que no hay alteraciones fisiopatológicas a nivel pancreático, la hiperamilasemia observada posiblemente responda a las alteraciones renales derivadas en los roedores tratados con el veneno de *Bothrops colombiensis* y refleja la necesidad de evaluaciones al respecto, para esclarecer la compleja fisiopatología mediada por este veneno botrópico.

Finalmente, en la evaluación histopatológica del pulmón los expertos refieren la ausencia de lesiones inducidas por la acción del veneno de *Bothrops colombiensis*, aspecto que sugiere su escasa toxicidad sobre los tejidos pulmonares bajo las condiciones de éste

estudio, a diferencia de lo reportado en evaluaciones previas con venenos de *Bothrops asper* (100 µg por la vía IM en ratones) (Chaves y col., 1989) o *Bothrops jararacussu* (25 µg por la vía IP en ratones) (Zeni y col., 2007), así como en accidentes fatales en humanos con *Bothrops jararacussu* (Benvenuti y col., 2003) en los cuales se ha reportado el desarrollo de edema, acompañado de la presencia de células inflamatorias y eritrocitos intra-alveolares, indicando el compromiso de la función alveolar lo cual podría llevar al colapso generalizado de la estructura pulmonar, efectos relacionados a posibles alteraciones hemostáticas y a la acción secundaria de las metaloproteasas hemorrágicas presentes en los venenos botrópicos (Chaves y col., 1989; Benvenuti y col., 2003; Zeni y col., 2007), grupos enzimáticos evidenciados en nuestras evaluaciones con el veneno de *Bothrops colombiensis*, aunque la expresión de hemorraginas en éste veneno (DHM: 34,62 µg) se podría considerar notablemente baja en comparación con otros venenos botrópicos como se discutió anteriormente y quizás podría ser un factor limitante en el desarrollo de lesiones en este importante órgano blanco.

Fraccionamiento del veneno total de *Bothrops colombiensis*

En la evaluación del cromatograma obtenido para el veneno de *Bothrops colombiensis* de Paracotos, de acuerdo a las condiciones de este estudio, observamos que nuestros resultados son similares a los obtenidos para un lote general de veneno de *Bothrops colombiensis* evaluado previamente por Scannone and Grillo, 1979. Estas similitudes abarcan desde el número de picos totales obtenidos durante el proceso cromatográfico, hasta la distribución o proporción de proteínas presentes en cada uno de los picos detectados. Lo que sugiere una

composición similar en el contenido general de proteínas, que conforman ambos lotes de venenos evaluados, al menos en lo que se refiere a las proteínas principales o más abundantes. Estos picos estarían teóricamente constituidos por proteínas con más de 150.000 daltons para la FI, en los picos FII, FIII y FIV estarían presentes proteínas en un rango entre 150.000 y 4000 daltons, mientras que en la FV estarían localizados aquellos constituyentes del veneno con un peso molecular (PM) inferior a los 4000 daltons, esto de acuerdo al rango de fraccionamiento de la resina empleada (Sephadex® G100, Pharmacia®).

En cuanto al perfil electroforético, si comparamos nuestros resultados para en veneno total (siete bandas proteicas con pesos moleculares en el rango de 4,58 a 102,26 kDa) con el reportado por otros autores para venenos de la misma especie observamos que López y col. (1999) refieren un total de 13 bandas distribuidas en un rango entre 14,9 y 52 kDa, Rodríguez y col. (2010) en un estudio comparativo de 3 venenos botrópicos venezolanos empleando geles de SDS PAGE al 12 %, refieren para venenos de *B. colombiensis* del Guapo y Caucagua bandas distribuidas dentro de un rango aproximadamente entre los 15 y 97 kDa, aunque con algunas variaciones entre ellos y en Comunicación Personal el Laboratorio de Investigaciones-UCV señala para lotes de venenos de especímenes de *B. colombiensis* de las regiones Barlovento y Maracay una serie bandas distribuidas 9 y 154 kDa y para veneno de especímenes recolectadas en Tejerías y Valencia refiere una distribución de proteínas entre los 9 y 62 kDa.

Al comparar con venenos de otras especies botrópicas, encontramos que Vargas y col. (1996) refieren para veneno de especímenes de *Bothrops atrox* de el Pauji-Edo. Bolívar 15 bandas definidas con PM comprendidos entre los 12 y 57 kDa y para especímenes de la región de Pto. Ayacucho-Edo Amazonas 20 bandas entre los 14 y 98 kDa. Para especímenes de *Bothrops venezuelensis*, procedentes de especímenes del Parque Nacional El Ávila, López y col. (1999) refieren un perfil constituido por 12 bandas en un rango entre los 10 y 61,5 kDa, mientras que Scannone y col. (1994) para un lote general veneno de *Bothrops venezuelensis*, refieren un perfil con 17 bandas en un rango de PM entre los 11,5 y 76 kDa. Más recientemente Rodríguez-Acosta y col. (2010) para especímenes de *Bothrops isabellae* del Edo. Trujillo, reportaron bandas de proteínas entre los 14 y 100 kDa, resaltando en todos los casos la presencia de notables diferencias entre el perfil obtenido para el veneno objeto de este estudio y los reportes previos citados anteriormente, diferencias que sugieren podríamos estar observando las típicas variaciones intra e inter especies en la composición de los venenos, aspecto ampliamente conocido y frecuentemente reportado en la literatura y que se ha relacionado a la edad/tamaño de los ejemplares, carga genética de la población, hábitos alimenticios y habitat, entre otras condiciones. (Jiménez-Porras, 1964; Meier, 1986; Chippaux y col, 1991; Furtado y col., 1991; Ferreira y col., 1992a; Otero y col., 1995; Vargas y col., 1996; Saldarriaga y col., 2003; Giron y col., 2008; Rodríguez-Acosta y col., 2010).

Por otra parte, si comparamos el perfil electroforético obtenido bajo las condiciones de este estudio para el veneno total con el de las diferentes fracciones evaluadas, observamos una serie de resultados que sugieren la digestión de algunas de las proteínas que conforman las

fracciones obtenidas. Por ejemplo al comparar las bandas obtenidas para el veneno total con las de la FI, se evidencian para esta última un grupo de bandas de bajo y medio PM, las cuales de acuerdo al rango de fraccionamiento reportado para la resina empleada no deberían estar presentes en dicha fracción, así como la presencia de bandas cruzadas entre la FII y la FIII, lo que sugiere que estamos observando productos de degradación de algunas proteínas presentes inicialmente en las fracciones. Resultados con observaciones similares, fueron reportados en evaluaciones previas con venenos botrópicos venezolanos como *Bothrops venezuelensis*, veneno que al ser evaluado cromatográficamente con Sephadex® G100 y electroforéticamente con SDS-PAGE, los autores refirieron para su FI 11 bandas con PM entre los 10 y 71 kDa y para el veneno total 12 bandas distribuidas entre los 10 y 61,50 kDa. Mientras que un lote general de veneno de *Bothrops colombiensis*, evaluado también bajo las condiciones mencionadas anteriormente, se reportó para su FI 16 bandas en un rango de 14,5 a 71 kDa (López y col., 1999).

Para comprobar que las bandas de bajo PM obtenidas para FI y FII; corresponden a productos de degradación de algunas proteínas presentes en el veneno total evaluado, se realizó nuevamente el perfil electroforético del veneno total y sus fracciones empleando inhibidores de proteasas, específicamente EDTA- Na_2 y Benzamidina a concentraciones de 5 mM y 1 mM respectivamente.

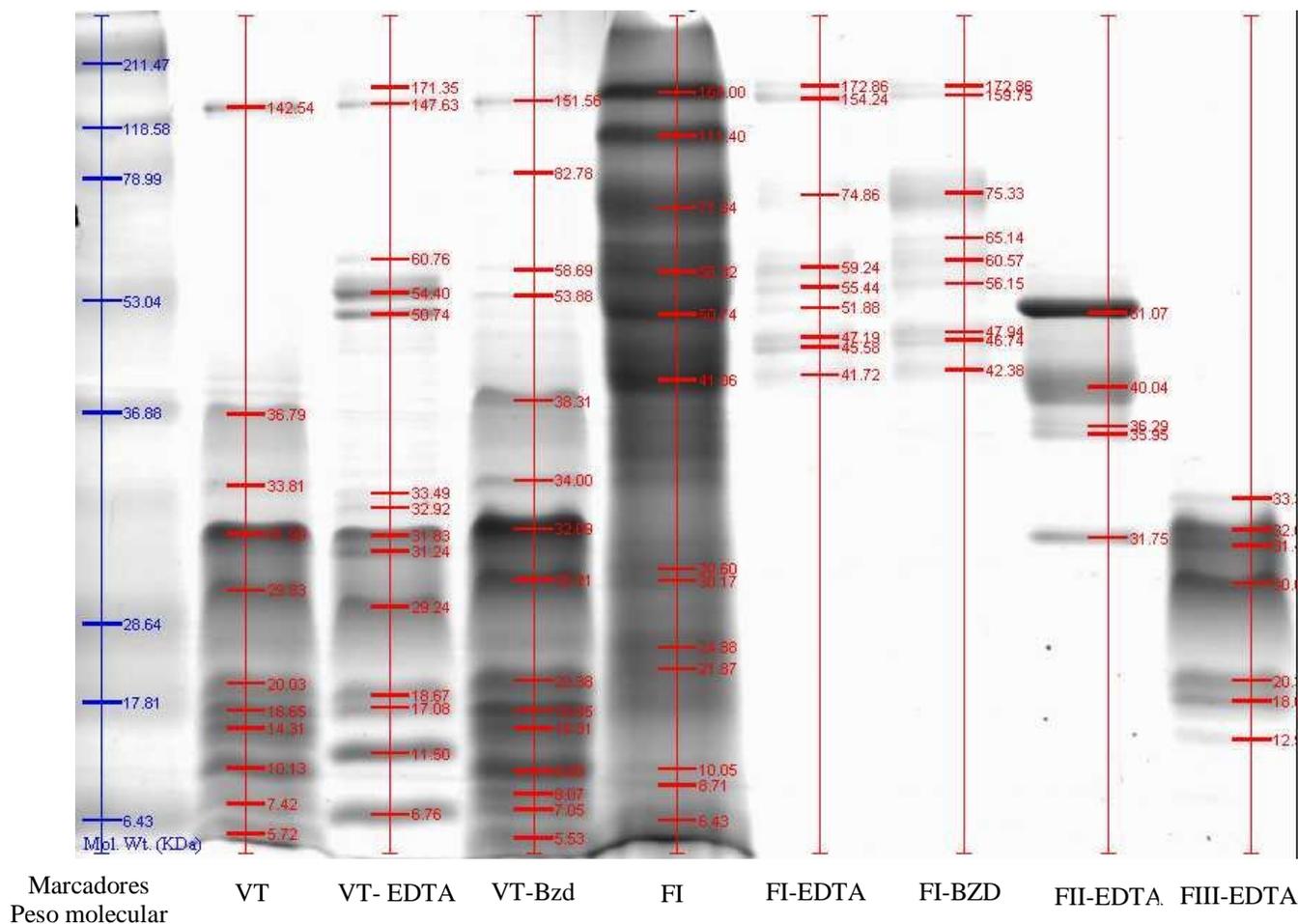
Los resultados obtenidos se presentan en la figura 13, en ésta observamos para el veneno total incubado con EDTA y Benzamidina la aparición de una serie de bandas entre los 50 y

171 kDa, las cuales no se evidenciaron en la corrida inicial del veneno total, resultados similares han sido obtenidos en el Laboratorio de Investigaciones de la UCV para un lote general de veneno de esta misma especie (sin incluir ejemplares de Paracotos-Edo. Miranda) evaluado por electroforesis en dos dimensiones en la presencia y ausencia de Benzamidina (Comunicación Personal. Laboratorio de Investigaciones-Facultad de Farmacia-UCV). Así como por López y col. (2002), quienes al comparar venenos de especímenes juveniles y adultos de *Bothrops atrox* (Manaus) refieren que durante el análisis SDS-PAGE observaron la desaparición de bandas de 50 kDa, simultaneo con la aparición de una banda proteica de 37 kDa para ambos venenos, aunado a la desaparición parcial de bandas de 23 kDa para los venenos de especímenes adultos y juveniles, entre otras observaciones. Durante este mismo estudio los autores empleando los inhibidores de proteasas EDTA y PMSF (fenil metil sulfonil fluoruro) refieren que las metaloproteasas del veneno mediaron la digestión (autoproteólisis) de las proteínas de 50 kDa, originando la formación de nuevas bandas de menor masa molecular.

En cuanto a las fracciones, al ser evaluadas en su constitución proteica con los inhibidores de proteasas los resultados obtenidos nos permiten señalar una distribución de proteínas para la FI de 41,72 a 172,86 kDa, para la FII de 31,75 a 51 kDa y para la FIII de 12,5 a 33 kDa, resultados más acordes con los conceptos de cromatografía de exclusión molecular (Sephadex® G100, Pharmacia) y que adicionalmente nos confirma la presencia de metaloproteasas y serina proteasas en el veneno objeto de este estudio capaces de clivar diferentes proteínas en el veneno (Figura 14).

Figura 14

Perfil electroforético (SDS-PAGE) del veneno total y fracciones de la serpiente *Bothrops colombiensis* empleando inhibidores de proteasas



Marcadores de Peso Molecular (BIO-RAD®. Catalog # 161-0318): Miosina (211,475 kDa).

B-galactosidasa (118,579 kDa). Albumina de suero bovino (78,995 kDa).

Ovalbumina (53,045 kDa). Anhidrasa carbónica (36,881 kDa).

Inhibidor de tripsina (28,643 kDa). Lisozima (17,809 kDa). Aprotinina (6,435 kDa).

VT: veneno total. **EDTA:** etilen-di-amino-tetra acetato sódico. **Bzd:** benzamidina. **FI:** Fracción I.
FII: fracción II. **FIII:** fracción III.

Estudio toxológico y clínico de las fracciones liofilizadas del veneno total de *Bothrops colombiensis*.

Las tres fracciones evaluadas del veneno de *Bothrops colombiensis* fueron capaces de inducir letalidad en ratones, de acuerdo a las condiciones de este estudio. Siendo la fracción más letal la FIII, mientras que la FI y la FII desarrollaron un grado de letalidad similar en ratones. Al comparar la DL_{50} del VT con la determinada para sus fracciones obtenidas por cromatografía de exclusión molecular, observamos que el VT presentó una DL_{50} menor que la de sus fracciones, señalando en consecuencia un mayor índice de letalidad en el VT que para cualquiera de las fracciones evaluadas. Estos resultados nos permiten referir que los constituyentes más letales del veneno de *Bothrops colombiensis* (Paracotos-Edo. Miranda), de acuerdo a las condiciones de este estudio, podrían ser aquellos presentes en la FIII y dada la baja toxicidad de las fracciones con relación al VT, podríamos sugerir que la toxicidad del VT es consecuencia del efecto aditivo y posiblemente sinérgico de la gran gama de proteínas que lo constituye, las cuales podríamos referir con un PM entre los 5,53 a 171 kDa de acuerdo a los perfiles electroforéticos obtenidos. Estos resultados son similares a los reportados en estudios previos para otros venenos botrópicos, como *Bothrops venezuelensis* en el cual la letalidad inducida por el veneno total en ratones es superior a la detectada para sus diferentes fracciones evaluadas por la vía IP. (Comunicación Personal. Laboratorio de Investigaciones-Facultad de Farmacia-UCV).

En el caso de la actividad hemorrágica, encontramos que todas las fracciones fueron capaces de inducir hemorragia en ratones de acuerdo con las condiciones de este estudio, localizándose la mayor actividad hemorrágica en la FI. Al comparar contra el VT, se

aprecia que esta fracción exhibió una DHM equivalente a 13,52 veces el VT, en segundo nivel estaría la FII con 4,58 veces el VT, mientras que el caso de la FIII se observó una muy escasa actividad hemorrágica, con una DHM equivalente a 2 veces la determinada para el VT, la cual podríamos considerar en parte consecuencia de una posible contaminación con la FII, con base en el perfil electroforético obtenido para estas fracciones.

Como se ha mencionado anteriormente, la actividad hemorrágica en los venenos botrópicos es consecuencia de la acción de las ampliamente documentadas hemorraginas, toxinas reconocidas como enzimas multifuncionales de elevado PM, el cual se ha observado varia en un rango entre 20 a 100 kDa (Bjarnason and Fox, 1988-89; Gutiérrez and Lomonte, 1989; Braud y Col., 2000; Petretski y col., 2000b; Rodrigues y col., 2001; Rodrigues y col., 2004; Patiño y col., 2010), rango en el cual fluctúan la gran mayoría de las proteínas que constituyen las tres fracciones evaluadas, pero obviamente para atribuirles tal actividad se requieren evaluaciones al respecto.

Por otra parte el perfil de distribución de las hemorraginas, obtenido en las fracciones evaluadas es similar al reportado en estudios previos con diferentes venenos botrópicos, como *Bothrops venezuelensis* (López y col., 1994a, b), *Bothrops colombiensis* del Guapo y Caucagua (Girón y col., 2008), *Bothrops atrox* (Puerto Ayacucho), entre otros, en los cuales se observó un predominio de hemorraginas en el Pico I o FI (volumen muerto) al fraccionar estos venenos con Sephadex® G-100 (rango de fraccionamiento 4 a 150 kDa),

sugiriendo la presencia mayoritaria en estos venenos de hemorraginas de elevado PM, las cuales podrían corresponderse básicamente con hemorraginas de la Clase PIII, las cuales incluyen las toxinas hemorrágicas menos tóxicas, con un PM entre 50 y 100 kDa. (Bjarnason and Fox, 1988-89; Gutiérrez and Rucavado, 2000; Petrestski y col., 2000b; Gutiérrez, 2002; Isla y col., 2003; Serrano y col., 2006; Moura y col., 2008).

En la evaluación de la actividad edematizante observamos que las tres fracciones evaluadas fueron capaces de inducir edema en roedores, de acuerdo a las condiciones de este estudio. La fracción con mayor capacidad edematizante fue la FIII, seguida por la FI y la FII, sin embargo ninguna de estas fracciones evidenció una DEM menor a la detectada para el VT, sugiriendo que este efecto en el veneno objeto de este estudio, es consecuencia del efecto aditivo y/o sinergista de las diferentes toxinas presentes en las fracciones evaluadas.

Esta participación de diversas toxinas del veneno en el desarrollo del edema, podría verse quizás también reflejado en las características de las lesiones observadas en las extremidades de los roedores durante las evaluaciones, por ejemplo el edema inducido por las FI y FII se acompañó de lesión hemorrágica en el área plantar, mientras que el edema desarrollado por la FIII no implicó el desarrollo de hemorragia, sugiriendo la participación de las toxinas hemorrágicas, en el edema desarrollado por el veneno de *Bothrops colombiensis*, aunque con una participación posiblemente secundaria en base a la magnitud del edema mediado por las dos primeras fracciones. Resultados que están en consenso con reportes previos, los cuales evidenciaron la participación de estas toxinas en la patogénesis del edema mediado por los venenos botrópicos (Chaves y col., 1995; Gutiérrez and Rucavado, 2000; Petrestski y col., 2000b; Gay y col., 2005), por ejemplo Chaves y col.

(1995) observaron una reducción significativa del edema inducido por el veneno de *Bothrops asper* en ratones, tras la incubación previa a la inyección del veneno a evaluar con el agente quelante EDTA (Inhibidor de metaloproteasas y fosfolipasas). Así como en evidencias más directas, entre las que se pueden señalar aquellas presentadas por Gay y col. (2005), quienes aislaron una hemorragina con un PM de 55 kDa del veneno de *Bothrops alternatus*, enzima que exhibió una DEM de 1,3 µg y una DHM de 1,9 µg o por Petretski y col. (2000) quienes identificaron una hemorragina de la clase PIII en el veneno de *Bothrops atrox*, capaz de inducir un proceso edematogénico, efecto que se ha considerado una consecuencia de su acción directa sobre la microvasculatura induciendo extravasación, además de un posible efecto indirecto el cual implica la inducción de mediadores endógenos, mecanismo sugerido por observaciones que señalan que estas toxinas pueden inducir la liberación de citoquinas inflamatorias cuando se inyectan en tejido muscular y cuando se incuban con macrófagos *in vitro*. (Gutiérrez and Rucavado, 2000).

Por otra parte, dentro del amplio grupo de proteínas que constituyen la FI y la FII, no se debe descartar la posibilidad de contribución al edema desarrollado por estas fracciones, de otras de las múltiples proteínas que las constituyen como la L-amino ácido-oxidasa, flavoenzima responsable del color amarillo de estos venenos la cual cataliza la deaminación oxidativa de un L amino ácido con la producción de amoníaco y peróxido de hidrógeno (Nget-Hong and Shin-Yee, 2008). Este tipo de enzima ha sido aislada de venenos de serpientes como *Bothrops pirajai* (Brasil) o *Bothrops atrox* (Perú), entre otros y luego de caracterizada bioquímica y funcionalmente, se observaron comprometidas en el desarrollo de edema en ratones, entre otras actividades (Lu and Clemetson, 2005; Izidoro y col., 2006; Lazo y col., 2007; Nget-Hong and Shin-Yee, 2008). Esta actividad enzimática

fue reportada en un lote general del veneno de *Bothrops colombiensis* evaluado por Scannone y col. (1979), posteriormente tras el fraccionamiento de este veneno por cromatografía de exclusión molecular con Sephadex® G100, se reportó distribuida entre los picos I y II, con un máximo de actividad en el pico I (Grillo y col., 1994b, c). Estas consideraciones, aunadas con el muy limitado conocimiento sobre la fisiopatología y tratamiento de este complejo efecto, además de la importancia fisiopatológica del edema desarrollado por los venenos botrópicos sugiere la necesidad del desarrollo de evaluaciones al respecto.

Con relación a la FIII, principal fracción con actividad edematizante y constituidas por proteínas en rango de PM entre los 12 y 33 kDa, de acuerdo a nuestros resultados concentra una serie de enzimas muy relevantes para los venenos de serpientes, las enzimas tipo PLA₂. Al comparar este resultado con lo reportado en estudios previos con venenos de esta misma especie, encontramos que Scannone y col. (1979) para un lote de veneno de *Bothrops colombiensis* para el cual se reportó un perfil cromatográfico similar al observado en este estudio tras caracterizar bioquímicamente las fracciones obtenidas, localizaron las enzimas con actividad tipo PLA₂ distribuidas en el pico 3, lo cual coincide con lo determinado en el veneno objeto de este estudio. Así como en las evaluaciones de López y col. (1996) quienes al caracterizar el veneno de *Bothrops venezuelensis* y dos de sus fracciones obtenidas por exclusión molecular (Sephadex® G100) localizaron la actividad tipo PLA₂ exclusivamente en su FII la cual reúne proteínas entre los 11,5 y 34 kDa. Por otra parte el rango de masa molecular sugerido para las enzimas tipo PLA₂ del veneno objeto de este estudio, coincide adicionalmente con reportes previos los que han permitido señalar que las PLA₂ comúnmente aisladas de los venenos de serpientes son proteínas con un PM entre los 11 a

32 kDa (Kanashiro y col., 2002; Huatuco y col., 2004; Angulo and Lomonte, 2009), las cuales han sido identificadas como las principales enzimas relacionadas con el edema inducido por los venenos botrópicos (Chaves y col., 1998; Toyama y col., 2001; Kanashiro y col., 2002; Kini, 2003; Huatuco y col., 2004; Nuñez y col., 2004), efecto mediado por mecanismos dependientes o independientes de su actividad enzimática (Chaves y col., 1998; Kanashiro y col., 2002; Kini, 2003).

Por otra parte, es necesario resaltar que la actividad PLA₂ evaluada en este estudio y localizada exclusivamente en la FIII corresponde específicamente a las enzimas con actividad catalítica (Asp 49), quedando silentes en la FIII de acuerdo a estudios previos con diferentes venenos botrópico, las PLA₂ carentes de actividad enzimática (Lys 49) pero que igualmente se han reportado capaces de mediar una variedad de efectos fisiopatológicos como edema, necrosis, inducción de citoquinas y degranulación de mastocitos entre otros (Gutiérrez, 2002; Kanashiro y col., 2002; Núñez y col., 2004; Angulo and Lomonte, 2009), pudiendo entonces contribuir de forma aditiva o sinérgica al edema desarrollado por la FIII, lo que sugiere la necesidad de realizar estudios al respecto de modo de establecer su presencia en la FIII y su compromiso a la fisiopatología del envenenamiento mediado por el veneno objeto de este estudio.

En el caso de las enzimas que median alteraciones de los mecanismos hemostáticos, nuestros resultados señalan que las enzimas responsables de estos efectos se encuentran distribuidas en la FI y la FII. Sugiriendo en consecuencia que estas enzimas pudieran estar distribuidas en un rango entre los 31 y los 173 kDa. Evidenciándose adicionalmente la participación de enzimas que median diferentes vías de acción con base en las variaciones

observadas para las fracciones evaluadas en sus dosis coagulante y desfibrinante mínimas. En el caso de la actividad desfibrinante observamos que la FII fue más efectiva bajo las condiciones de este estudio, esta presentó una DDM aproximadamente 18 veces más efectiva que la FI, superando incluso al veneno total el cual presentó una DDM 7 veces menos efectiva que la de dicha fracción.

Al comparar estos resultados, con los obtenidos en estudios previos para otros venenos encontramos que en el caso del veneno de *Bothrops atrox* (Pto. Ayacucho) al evaluar sus fracciones obtenidas por cromatografía de exclusión molecular (Sephadex[®] G100), se reportó que esta actividad estaba restringida a su fracción I, la cual estuvo constituida por proteínas de más de 60 kDa. En el caso del veneno de *Bothrops atrox* de la localidad del Pauji, tratado bajo las mismas condiciones, los autores refieren resultados similares, su fracción II tampoco presentó actividad desfibrinante (Comunicación Personal. Laboratorio de Investigaciones-Facultad de Farmacia. Universidad Central de Venezuela), resultados que difieren significativamente de nuestras observaciones con el veneno de *Bothrops colombiensis* y que sugieren para este veneno una mayor complejidad en el grupo de enzimas capaces de alterar los mecanismos hemostáticos en roedores y evidencia la necesidad de evaluaciones al respecto.

Con relación a la actividad coagulante sobre plasma humano se observó una muy ligera diferencia entre la FI y la FII, encontrándose la FI 1,5 veces más coagulante que la FII. Pero ninguna de estas fracciones expresó mayor actividad coagulante que el veneno total, siendo este último 3,2 y 5 veces más potente que FI y FII respectivamente.

Al comparar nuestros resultados con reportes previos, encontramos que López y col. (1998) quienes evaluaron un lote de veneno de *Bothrops venezuelensis*, reportaron la distribución de la actividad coagulante en las 2 primeras fracciones obtenidas por fraccionamiento con Sephadex[®] G100, las cuales incluyeron proteínas en un rango entre los 10-71 kDa, sin embargo ninguna de las fracciones evidenció mayor capacidad pro-coagulante sobre plasma humano que el veneno total, resultados que están en concordancia con los observados en este estudio para el veneno de *Bothrops colombiensis* (Paracotos).

Mientras que en el caso del veneno de *Bothrops atrox* de la localidad de Pto. Ayacucho estudios previos refieren que la actividad coagulante se observó restringida a la FI, también obtenida por cromatografía de exclusión molecular con Sephadex[®] G100, refiriendo adicionalmente los autores que dicha FI mostró un efecto procoagulante sobre plasma humano equivalente a su veneno total. Resultados similares fueron observados en la evaluación del veneno de especímenes de *Bothrops atrox* procedente de la región de El Pauji, en el Edo. Bolívar. (Comunicación Personal. Laboratorio de Investigaciones. Universidad Central de Venezuela), aspectos que difieren de lo observado en este estudio. Estas diferencias podrían ser la consecuencia de las variaciones intraespecie en la composición de los venenos de serpientes, aspecto ampliamente soportado en la literatura (Cavinato y col., 1998; Giron y col., 2008) y que podrían reflejar adicionalmente una mayor diversidad de enzimas capaces de interferir con la fina regulación de los mecanismos hemostáticos, en el veneno de *Bothrops colombiensis* de Paracotos que en otros de los venenos botropicos venezolanos. Entre estas enzimas se podría encontrar enzimas tipo trombina las cuales fueron señaladas como serino proteasas con una masa molecular entre los 30 y 45 kDa, activadores de protrombina descritos como enzimas de una sola

cadena con un peso molecular entre los 50-90 kDa (metaloproteasas con esta actividad se han aislado de *Bothrops atrox*), activadores del factor X correspondientes a metaloproteasas con un rango de peso molecular entre los 70-90 kDa (aisladas de *Bothrops atrox*), activadores de plaquetas correspondientes a serino proteasas con masa molecular de alrededor de 36 kDa o algunas L-amino ácido oxidasas flavoproteinas con una masa molecular generalmente entre 112-140 kDa, enzimas con actividad fibrinolítica caracterizadas en algunos casos como metaloproteasas (aisladas de *Bothrops jararaca* y *Bothrops moojeni*) o serino proteasas (aisladas de *Bothrops moojeni*) con una masa molecular entre los 20-65 kDa (Hoffmann and Bond, 1987; Rosing and Tang, 1991; Stocker, 1994; Kamiguti and Sano-Martins, 1995; Markland, 1998b; Petretski y col., 2000a; López y col., 2002; Lu and Clementson, 2005; Nget-Hong and Shin-Yee, 2008; Angulo and Lomonte, 2009), diversidad de enzimas que abarca el rango de proteínas de la FI y FII objeto de este estudio y que han sido ampliamente reportadas en venenos de serpientes sur americanas, sin embargo para su establecimiento se requiere el desarrollo de evaluaciones al respecto.

Por otra parte, es importante mencionar que durante la evaluación de estas fracciones (FI y FII), se observó un marcado efecto central en los animales tratados, efecto que se caracterizó por el desarrollo de opistótono, parálisis flácida en trenes anteriores y posteriores, convulsiones tónico clónicas, exoftalmo y giros de los ratones sobre su propio eje (giro tipo barril). Sin embargo en el caso de la FI este cuadro se evidenció en algunos individuos tratados con dicha fracción por la vía IV e IP, pero sólo a altas dosis (13,5 µg IV y 333 µg IP), mientras que con la FII dicha clínica se hizo evidente en el tratamiento de los

ratones por las vías IV con 1,5 µg, IM con 100 µg, IP con 400 µg (200 µg parálisis flácida de tren posterior) e intraplantar con 24 µg. Lo cual sugiere una mayor concentración de los constituyentes responsables por tales efectos en la FII, pudiendo incluso corresponder la presencia de las mismas en la FI a alguna posible contaminación. Por otra parte un cuadro similar pero limitado a opistótono y convulsiones tónico-clónicas ha sido reportado con otros venenos botrópicos venezolanos como *Bothrops venezuelensis*, entre otros, actividad que fue localizada en su FI obtenida por cromatografía de exclusión molecular con la resina Sephadex® G100 (López y col., 1994a).

Así mismo no se puede dejar de mencionar que Angulo y col. (2009), refieren que una enzima denominada “Ficozima” aislada del veneno de *Bothrops asper* y recientemente caracterizada como una serino proteasa de 27 kDa, con actividad tipo trombina y que promueve la defibrinogénesis en ratones, después de la inyección intravenosa es capaz adicionalmente de causar alteraciones neurotóxicas en el comportamiento tales como la pérdida del reflejo de enderezamiento, opistótono y rotación intermitente sobre el eje del cuerpo, características que de acuerdo al autor se asemejan a las inducidas por la giroxina, neurotoxina, caracterizada como una enzima tipo trombina con un peso entre 33-35 kDa, presente en venenos crotálicos. Observaciones que coinciden con algunos aspectos reportados en este estudio para la FI y FII y sugiere la necesidad de realizar estudios al respecto que promuevan el aislar y caracterizar los constituyentes del veneno de *Bothrops colombiensis* de Paracotos responsables de estos efectos neurológicos, no tradicionalmente reconocidos en los venenos botrópicos.

Por otra parte, en el caso de la actividad necrosante observamos que las tres fracciones evaluadas son capaces de incrementar los niveles de CPK en suero de ratones y con tres perfiles diferentes. Evidenciando que las lesiones desarrolladas por el veneno total y que indujeron al incremento del marcador de lesión celular CPK, son mediadas por una diversidad de constituyentes tóxicos presentes en el veneno objeto de este estudio, que pudieran estar distribuidas en un rango entre los 12-173 kDa, actuando en consecuencia de manera aditiva y/o sinérgica. Lo cual coincide con evaluaciones previas con otros venenos botrópicos venezolanos y sus fracciones como *Bothrops venezuelensis* o *Bothrops atrox* (El Pauji), en los que se ha observado que fracciones carentes de actividad tipo Fosfolipasa A₂ son capaces de mediar incrementos en CPK en suero de roedores (Fernández y col., 1996; López y col., 1996).

En el caso de los ratones tratados con la FI objeto de este estudio, tenemos que el incremento de la CPK en suero, se observó entre las 24 y 72 horas post-tratamiento sugiriendo un efecto tardío y posiblemente indirecto en el desarrollo de las lesiones celulares, aspectos que pudieran estar relacionados con la elevada actividad hemorrágica, edematizante y quizás hasta procoagulante presente en dicha fracción, aspectos relacionados al desarrollo de lesión celular, incluyendo necrosis debida a la isquemia local desarrollada al comprometer la adecuada perfusión tisular como una consecuencia de la interrupción de la microvasculatura, la hemorragia, la compresión de los tejidos y/o una posible coagulación intravascular (Rodríguez y col., 2001; Gutiérrez, 2002; Gay y col., 2005; Angulo and Lomonte, 2009; Gutiérrez y col., 2009).

En las evaluaciones con la FII, observamos que los niveles de CPK comenzaron a incrementarse en la primera hora post tratamiento, manteniéndose elevados hasta las 15 horas post inoculación, evidenciando un efecto desarrollado a corto plazo, aunque de magnitud similar al observado en los ratones tratados con la FI. Esta fracción fue también carente de actividad tipo fosfolipasa A₂, sin embargo como la FI también concentra enzimas con actividades hemorrágica, edematizante y procoagulante que pudieran contribuir a mediar lesión celular como se señaló anteriormente (Gutiérrez and Rucavado, 2000; Rodrigues y col., 2001; Angulo and Lomonte, 2009; Patiño y col., 2010). Adicionalmente debemos resaltar que estudios previos han reportado que algunos componentes hemorrágicos podrían inducir actividad miotóxica directa, como ha sido propuesto para la viriditoxina y la toxina hemorrágica b aisladas de los venenos de *Crotalus viridis* y *Crotalus atrox* respectivamente (Gutiérrez and Lomonte, 1989), así como para la neuwiedasa o la toxina LHF-II, metaloproteasas de la clase PI y carentes de actividad hemorrágica, aisladas de los venenos de *Bothrops neuwiedi* y *Lachesis muta*, respectivamente (Rodrigues y col., 2001; Baldo y col., 2010), aspectos que aunados a nuestras observaciones sugieren la necesidad de realizar evaluaciones al respecto, de manera de esclarecer el compromiso de sus constituyentes en la fisiopatología de la mionecrosis mediada por este veneno botrópicos y principalmente en el caso de aquellas fracciones que sugieren mediar un efecto directo y no involucran el compromiso de las toxinas tradicionalmente reconocidas.

En cuanto a la FIII, se observó que ésta indujo un importante incremento en los niveles de CPK en suero de ratón, el cual fue marcadamente superior al mediado por la FI o FII y que

practicamente se limitó a la sexta hora post-exposición. Este efecto es atribuido en base a estudios previos, principalmente a las enzimas tipo Fosfolipasa A₂ presentes en los venenos botrópicos, las cuales sean Asp 49 o Lis 49 afectan directamente la integridad de la membrana plasmática de las células musculares lo cual conlleva a la necrosis selectiva del músculo esquelético (Gutiérrez, 2002; Kanashiro y col., 2002; Kini, 2003; Nuñez y col., 2004), tipo enzimático localizado exclusivamente en la fracción III de acuerdo a las condiciones de este estudio.

Con relación a los estudios histopatológicos en tejido muscular de los ratones tratados con las diferentes fracciones, encontramos que sólo se reportaron lesiones en las muestras tomadas a individuos tratados con la FI y la FII. En el caso de las muestras procedentes de ratones a los que se les administró la FIII, los expertos reportaron la ausencia de lesiones microscópicas en dichos tejidos, lo cual podría coincidir con la determinación clínica de CPK en suero. Sin embargo a las 6 horas post tratamiento, donde tenemos niveles de CPK equivalentes a 8 veces lo detectado para los controles del experimento, tampoco hubo reportes de lesión en las muestras evaluadas sugiriendo que la acción de las miotoxinas presentes en la fracción, pudo haberse localizado exclusivamente en la extremidad tratada evidenciando una posible limitada difusión de estas toxinas a zonas distantes del área de entrada de las mismas al individuo vivo y que además presenten menos irrigación que otros blancos como músculo cardiaco, quizás por la ausencia en dicha fracción de enzimas tipo hialuronidasa o metaloproteasas hemorrágicas, las cuales se ha demostrado provocan la rápida extensión de los componentes del veneno del área inyectada a la circulación

sistémica, favoreciendo el desarrollo de los efectos tóxicos que puedan ser mediados por las enzimas constituyentes de los venenos (Anai y col., 2002).

En el caso de los ratones tratados con la FI y FII, los estudios histopatológicos mostraron lesiones en tejido muscular lo cual está de acuerdo con los incrementos en los niveles CPK detectados para los ratones tratados con ambas fracciones y es además consistente con las lesiones observadas en los individuos tratados con veneno total, las cuales implican para la FII desde la primera hora y FI a partir de las tres horas post-inyección lesiones tipo degeneración e hipercontractibilidad de fibras musculares esqueléticas lo cual sugiere el compromiso de los constituyentes de estas fracciones con dichas lesiones desarrolladas por el veneno total. Adicionalmente y a diferencia de lo observado con el tratamiento con veneno total encontramos ausencia de fragmentación de fibras musculares y el reporte de miositis (FI a 72 horas y FII a 1 y 72 horas) por parte de los expertos, lo cual pudiera sugerir que la fragmentación de fibras musculares evidenciada con el veneno total pudiera ser consecuencia de la acción conjunta de las miotoxinas que constituyen las diferentes fracciones evaluadas.

Estas observaciones de miotoxicidad (degeneración e hipercontractibilidad de fibras musculares esqueléticas), evidenciadas con la FI y FII, coinciden con reportes de estudios previos en los cuales se evaluó la actividad miotóxica de metaloproteasas hemorrágicas y no hemorrágicas en ratones y donde los autores adicionalmente señalaron que las alteraciones observadas son similares a aquellas inducidas por las enzimas PLA₂ en tejido muscular,

sólo diferenciándose en la intensidad del daño y el periodo en el cual ellas se hacen evidentes (Gay y col., 2005; Angulo and Lomonte, 2009), por ejemplo Baldo y col. (2010), en la evaluación de las alteraciones ultraestructurales mediadas en ratones por una metaloproteasa no hemorrágica aislada del veneno de *Bothrops neuwiedi*, refieren el desarrollo de dichas lesiones a las 6 horas post exposición. En el caso las metaloproteasas hemorrágicas, estas lesiones tisulares se acompañan obviamente de la presencia de eritrocitos en el espacio extracelular, como ha señalado por ejemplo Gay y col. (2005) en la evaluación de una hemorragina aislada del veneno de *Bothrops alternatus*, en la cual los autores refirieron desde las 3 a las 12 horas post inoculación la presencia de hemorragia interfibrilar, de intensidad decreciente en el músculo gastronemio de los ratones tratados la cual desapareció completamente a las 24 horas post tratamiento, observaciones que no se evidenciaron en el tratamiento con las fracciones I y II bajo las condiciones de este estudio. Sin embargo al incluir adicionalmente cortes de tejido muscular de las extremidades tratadas con dichas fracciones, para su evaluación histopatológica, los expertos reportaron sólo para la FI la presencia de hemorragia entre fibras musculares esqueléticas, en los lapsos correspondientes de 6 a 24 horas post inoculación y con intensidad decreciente, lo que podría sugerir para esta fracción un mecanismo de miotoxicidad mediado posiblemente por isquemia local resultante de la acción hemorrágica de algunos de sus constituyentes. Lo cual coincide adicionalmente con la aparición retardada de los efectos histopatológicos e incrementos en niveles del marcador CPK mediados por la FI en comparación con la FII y sugiere para esta última fracción una actividad miotóxica mediada posiblemente por un mecanismo alternativo, evidenciando la necesidad de evaluaciones al respecto.

Estudio clínico de las fracciones liofilizadas del veneno total de *Bothrops colombiensis*.

En lo concerniente a la caracterización clínica de las fracciones del veneno de *Bothrops colombiensis* (Paracotos) de acuerdo a las condiciones de este estudio, observamos de manera general que las 3 fracciones evaluadas indujeron alteraciones en marcadores de daño tisular como AST, ALT y urea. Mientras que la FI y FIII mediaron alteraciones en la amilasa sérica, la FII afectó ligeramente los niveles séricos de glicemia y sólo la FIII indujo ligeras alteraciones en los niveles creatinina en suero de ratones. Lo cual evidencia una vez más, que la acción del veneno total sobre una serie de órganos blanco, relacionadas con el incremento en los marcadores de lesión evaluados es dependiente de la acción conjunta (aditiva y/o sinergista) de las diferentes actividades tóxicas que lo constituyen.

En el caso de las transaminasas AST y ALT, como se mencionó anteriormente a pesar de su amplia distribución en diferentes tejidos como hígado, riñón, músculo cardiaco y esquelético (Gráfica 37), los incrementos séricos de ambas enzimas se consideran principalmente un reflejo de enfermedad hepatocelular que puede ser aguda o crónica (Ward and Cockayne, 1993; Limdi and Hyde, 2003). Durante la evaluación de la actividad de estos marcadores de lesión hepatocelular observamos que todas las fracciones fueron capaces de mediar incremento de los niveles de AST y ALT en suero de los grupos de trabajo tratados, lo cual nos permite sugerir en consecuencia que las tres fracciones evaluadas del veneno de *Bothrops colombiensis* podrían presentar toxinas con un posible potencial hepatotóxico y dada la diversidad de enzimas presentes en las mismas, las cuales podrían incluir de acuerdo a evaluaciones previas de Scannone y col. (1979) hialuronidasa,

enzimas proteolíticas, L amino ácido oxidasa, 5´nucleotidasa, fosfatasas, esterases en la FI y la FII y PLA₂ en la FIII, entre otras, podría también implicar que dicha hepatotoxicidad sea posiblemente mediada por diferentes mecanismos fisiopatológicos.

Al comparar entre si los resultados obtenidos en la evaluación de la actividad de la enzima alanina aminotransferasa (ALT/SGPT) para las tres fracciones objeto de este estudio, observamos tres diferentes perfiles de actividad. En el caso de la FI y FII se evidenció un efecto de rápida instalación (1 hora) con resolución a corto plazo, a diferencia de la FIII la cual indujo un efecto que se desarrolló a largo plazo (6 horas) y se resolvió a las 48 horas post inoculación, sugiriendo la posible participación de diferentes mecanismos de acción, por parte de las diferentes fracciones evaluadas esto aunado a la diversidad de enzimas o actividades tóxicas presentes en dichas fracciones. Adicionalmente también tenemos variaciones en función de la magnitud de la respuesta observada, siendo ésta mayor con la FIII, sugiriendo un mayor compromiso de los constituyentes tóxicos presentes en esta fracción en el desarrollo de lesiones tisulares que medien la liberación de este marcador.

Mientras que al comparar entre si los resultados obtenidos en la evaluación de la actividad de la enzima aspartato aminotransferasa (AST/SGPT) para las tres fracciones objetos de este estudio, observamos uniformidad en los resultados de AST en suero para los ratones tratados con la FI y la FII en lo referente a la magnitud de la respuesta obtenida, adicionalmente para estas dos fracciones dicho incremento se desarrolló en las primeras horas post exposición, localizándose específicamente de 1 a 6 horas para la FI y de 1 a 3 horas para la FII, sugiriendo la posible participación de mecanismos de acción similares en

la secuencia de eventos tóxicos mediados por estas fracciones y que llevaron a los incrementos observados en el suero de los animales tratados. Mientras que el caso de la FIII, se observó una respuesta mucho más intensa y prolongada en el tiempo, la cual abarcó desde la 1 a las 24 horas post exposición, sugiriendo un mayor compromiso de los constituyentes tóxicos presentes en esta última fracción con el desarrollo de las lesiones responsables por este incremento de AST en suero para los grupos tratados con dicha fracción. Constituyentes que de acuerdo a lo evidenciado en este estudio, se distribuyen en un rango de masa molecular ente 12-33 kDa y presentan una muy importante actividad tipo fosfolipasa A₂, ausente en la FI y la FII.

Por otra parte, si comparamos entre si los perfiles obtenidos en este estudio para la ALT y la AST por cada fracción, observamos un perfil similar en cuanto a su comportamiento el momento de su inicio, progreso y el tiempo en el que se alcanzaron los niveles basales de actividad para ambas enzimas, con la excepción de la FIII, lo cual podría sugerir que estos marcadores en suero podrían tener una procedencia tisular en común. Mientras que si comparamos los incrementos detectados para los niveles de AST y ALT obviamente con relación a sus respectivos controles, observamos que el incremento en los niveles de AST fueron mayores a los de ALT (AST>ALT) en todas las fracciones evaluadas, lo que podría sugerir no sólo alteraciones en la permeabilidad de las células hepáticas, sino principalmente lesiones que abarcan las mitocondrias hepáticas donde la AST se encuentra principalmente distribuida alcanzando hasta un 80 % (Franca y col., 2009), sin descartar obviamente el desarrollo de posibles lesiones en otros tejidos donde esta enzima se

encuentra también predominantemente distribuida como corazón, músculo esquelético y riñón (Ward and Cockayne, 1983; Franca y col., 2009).

Considerando que la enzima AST puede aumentar también considerablemente en respuesta al daño muscular severo, se comparó la localización de los picos de actividad obtenidos para ésta y CPK en las diferentes fracciones, esto nos permite referir que el incremento observado para la AST podría estar también relacionado al desarrollo de lesiones musculares y/o cardíacas para la FII y en menor proporción para la FIII. Con la FII observamos puntos de coincidencia para la 1 y 6 horas post exposición, mientras que en el caso de la FIII sólo encontramos coincidencia para las 6 horas post tratamiento, a diferencia de la FI donde no encontramos puntos en común, sugierendo que la AST detectada en el suero de algunos de los grupos de animales tratados con la FI y FIII podría tener procedencia diferente al tejido hepático, como por ejemplo músculo (cardíaco y/o esquelético) o riñón, tejidos donde también se encuentra ampliamente distribuida (Ward and Cockayne, 1993).

Con relación a las evaluaciones histopatológicas en tejido hepático para las fracciones evaluadas, los expertos no reportaron resultados concluyentes con relación a las lesiones reportadas. Estas lesiones correspondieron específicamente a degeneración hidrópica difusa y microvacuolar, las cuales coinciden con las reportadas para el tratamiento con veneno total y que se ha referido constituyen lesiones celulares reversibles, que no significan un riesgo vital para la célula (Teibler y col., 1999; Maruñak y col., 2011). Adicionales a éstas se refirieron, degeneración macrovacuolar, degeneración de hepatocitos (FI, FII y FIII), congestión de vasos sanguíneos e infiltrado inflamatorio, estas últimas sólo evidenciadas en

individuos tratados con la FI, mientras que en aquellos individuos tratados con la FIII se observó la congestión de venas centrolobulillares. Este tipo de lesiones, consideradas de procedencia dudosa por los expertos del INH-RR, también han sido reportadas en estudios previos con venenos de serpiente, por ejemplo Zeni y col. (2007) en la evaluación del veneno de especímenes de *Bothrops jararacussu* reportaron congestión vascular en venas centrolobulillares de hígado de ratón 4 horas post inyección de 25 µg de veneno. Mientras que Franca y col. (2009) en la evaluación de la hepatotoxicidad del veneno de *Crotalus durissus terrificus*, reportaron en ratas tratadas con 200 µg/Kg tras 9 horas post exposición una alta densidad de vasos sanguíneos congestionados, mientras que con una dosis de 300 µg/Kg señalaron adicionalmente la degeneración de los hepatocitos. A las 12 horas post exposición los autores refirieron en ratas tratadas con 200 µg/Kg que la congestión inicial evolucionó a la degeneración de hepatocitos, mientras que con altas dosis (300 µg/Kg) los individuos presentaron un progresivo incremento en sus lesiones hepáticas, implicando una marcada desorganización de hepatocitos con edema y necrosis, siempre en comparación de las proporciones de las lesiones (número de células/mm² de tejido) con los controles del experimento, alteraciones que fueron relacionadas teóricamente con la actividad de enzimas tipo PLA₂, enzimas tipo trombina que podrían mediar la deposición de fibrina y el desarrollo de isquemia y también la activación de varios tipos celulares como linfocitos, macrófagos, mastocitos y plaquetas.

Estos reportes, nos permiten sugerir que nuestras observaciones podrían ser el resultado de la acción de las enzimas del veneno sobre este importante órgano blanco, lo que asociado básicamente a la presencia en el veneno de *Bothrops colombiensis* de enzimas tipo PLA₂,

enzimas que median alteraciones en la coagulación entre otras, al perfil dosis dependiente observado para las lesiones en estudios previos y la posibilidad de que la congestión (alteración hemodinámica que conlleva al incremento del volumen de sangre en un órgano o tejido, consecuencia de una variación en el drenaje venoso) al ser intensa y/o crónica pueda conducir a necrosis (Franca y col., 2009), refleja la necesidad del desarrollo de evaluaciones al respecto de manera de esclarecer el compromiso tanto del veneno total y de las diferentes fracciones evaluadas sobre las alteraciones fisiopatológicas evidenciadas en tejido hepático.

Finalmente, como en el caso del veneno total para las tres fracciones evaluadas observamos la persistencia de las lesiones en el tiempo, en el caso de la FI y la FII estas fueron reportadas hasta las 72 horas (máximo periodo evaluado) y para la FIII las lesiones se mantuvieron, de acuerdo a los expertos, hasta las 168 horas posteriores a la aplicación del tratamiento, lo que podría sugerir la cronicidad de las alteraciones fisiopatológicas implicadas.

En cuanto al músculo cardíaco, de acuerdo a los resultados histopatológicos obtenidos, las tres fracciones evaluadas fueron capaces de mediar el desarrollo de lesiones en dicho órgano blanco, lo cual permite sugerir la presencia de enzimas con posible potencial cardiotoxico en las diferentes fracciones evaluadas y evidencia la posible acción aditiva y/o sinérgica de diversos constituyentes con actividad enzimática en el veneno sobre el tejido cardíaco.

Si comparamos el efecto mediado por las fracciones entre si, se observó que la FI y la FII ejercieron un efecto a corto plazo, el cual implicó la presencia de lesiones en ratones desde la primera hora post exposición, mientras que con la FIII las lesiones se evidenciaron después de las 3 horas de exposición al tratamiento aplicado, aspectos que podrían sugerir la participación de mecanismos fisiopatológicos alternativos en la posible cardiotoxicidad mediada por las fracciones objeto de este estudio. En cuanto a las lesiones reportadas, estas implicaron fragmentación de fibras cardíacas reportada sólo en aquellos roedores tratados con la FI e hipercontractibilidad de fibras musculares, efecto común para las tres fracciones evaluadas, lesiones que coinciden con lo reportado para el veneno total. Adicionalmente evidenciamos que en los ratones tratados con las fracciones, no se observó el desarrollo de necrosis multifocal y ruptura multifocal de fibras cardíacas alteraciones morfológicas observadas en el tratamiento con el veneno de *Bothrops colombiensis*, lo cual permite sugerir que estas lesiones podrían ser consecuencia de la acción conjunta (aditiva y/o sinergista) de los diferentes constituyentes del veneno sobre la estructura cardíaca.

Adicionalmente y a diferencia del veneno total, también se reportó la presencia de hemorragia entre fibras cardíacas tras el tratamiento con las tres fracciones evaluadas, así como la congestión de vasos sanguíneos alteración hemodinámica observada en el tratamiento con la FI y la FII. Efectos que podrían ser la consecuencia de la concentración de enzimas alcanzada en cada fracción, aunque en el caso de la hemorragia reportada con la FIII llama la atención que dicha fracción presentó una muy escasa actividad hemorrágica en comparación con el veneno total, lo cual podría sugerir una mayor sensibilidad de la vasculatura cardíaca por las hemorraginas presentes en esta fracción. Finalmente, como en

el caso del veneno total para las tres fracciones evaluadas se observó la persistencia de las lesiones en el tiempo, lo que podría sugerir la cronicidad de las alteraciones fisiopatológicas implicadas.

Estudios previos con venenos de serpientes han permitido establecer la toxicidad de los mismos sobre el músculo cardíaco, en base a observaciones de disminución de presión arterial, bradicardia, disminución de la descarga ventricular y el gasto cardíaco (Morales y col., 1976; Liberato y col., 2010) y en menor cuantía por la observación de alteraciones histológicas tras el tratamiento de animales de experimentación con veneno total (Hernández y col, 2005). Mientras que hay pocas evaluaciones puntuales que verifiquen la carditoxidad de las diferentes toxinas presentes en los venenos, siendo estas relacionadas a las enzimas tipo fosfolipasas A_2 . Entre estas Liberato y col. (2010) en evaluaciones con veneno de *Bothrops marajoensis* y una PLA_2 aislada de dicho veneno, reportaron el compromiso de ambos sustratos en el desarrollo de efectos cardiovasculares como hipotensión y bradicardia, simultáneamente con el bloqueo de la conducción eléctrica en el corazón. Tipo enzimático localizado exclusivamente en la FIII del veneno de *Bothrops colombiensis* (Paracotos), aspecto que aunado a las lesiones en tejido cardíaco reportadas en roedores tratados con las diferentes fracciones evaluadas, así como el mantenimiento de las mismas hasta 7 días post exposición al tratamiento, específicamente con la FIII, sugiere la necesidad de evaluaciones al respecto.

A nivel renal los expertos señalaron para todas las fracciones evaluadas, la observación de lesiones que relacionaron al desarrollo de patología espontánea en los ratones empleados, a diferencia de lo reportado por INH-RR para el veneno total. Esta complicación no evidenciada en los animales empleados en el estudio del veneno, podría estar enmascarando la manifestación de la toxicidad de los diversos constituyentes presentes en las fracciones y sugiere la necesidad de continuar evaluaciones al respecto en otros modelos experimentales a fin de confirmar estos resultados.

Por otra parte, al observar los parámetros bioquímicos encontramos que para las fracciones I y II no hay alteración estadísticamente significativa (α : 0,05) en los niveles séricos de creatinina al comparar con los controles del experimento. Sólo se observó un ligero incremento en el grupo de roedores tratados con la FIII a las 1, 3 y 96 horas post exposición, alteración que de acuerdo a los hallazgos histopatológicos no es claramente indicativo de la actividad del veneno.

Con relación a los niveles de BUN para las tres fracciones evaluadas, en todos los casos se observó un incremento de este marcador en el suero de los animales tratados, los cuales se evidenciaron desde la 1^{era} hora post exposición y fueron aparentemente más pronunciado con la FIII. Sin embargo dado los hallazgos histopatológicos, que refieren la ausencia de lesiones determinantes a nivel renal que teóricamente justifiquen este incremento del BUN en comparación con los controles, que presentaron de acuerdo a los expertos hallazgos fisopatológicos similares y en el caso de los ratones tratados con la FI y FII no se observó

alteraciones en los niveles séricos de creatinina, se podría sugerir que el incremento sérico del BUN en respuesta al tratamiento con las fracciones I y II, podría ser una consecuencia de una reducción en el índice de filtración glomerular aspecto derivado de un flujo sanguíneo renal inadecuado, lo cual podría sugerir una insuficiencia renal de causas pre-renales. En el caso de los individuos tratados con la Fracción III este incremento del BUN, podría ser una consecuencia de alguna alteración glomerular evidenciada por el incremento sérico de creatinina, sin embargo la evaluación histopatológica descarta que estas alteraciones sean consecuencia del tratamiento aplicado y sugiere la necesidad de evaluaciones al respecto de manera de verificar el compromiso de la FIII en la alteración de marcadores de función renal.

La uremia pre-renal, como se señaló anteriormente se considera una consecuencia de hipovolemia, hipotensión, anomalía cardíaca, lesiones estructurales de las arterias renales o cualquier causa que produzca hipoperfusión renal (Oliveira y col., 2007). En el caso de las fracciones I y II, estas fueron responsables de una serie de alteraciones cardíacas importantes, que quizás podrían comprometer efectivamente el gasto cardíaco, de igual forma dichas fracciones pudieran contener diversos constituyentes capaces de mediar alteraciones circulatorias e hipotensión, por ejemplo por medio de la liberación de mediadores químicos endógenos tales como histamina, bradiquinina, eicosanoides, óxido nítrico y citoquinas, los cuales podrían afectar el control del flujo arteriolar glomerular (Havt y col., 2001; Barbosa y col., 2002; Castro y col., 2004; Koscinczuc y col., 2007; Goncalves y col., 2008) como: a) las metaloproteasas presentes principalmente en nuestras fracciones I y II, enzimas de este tipo en otros venenos botropicos como *Bothrops atrox*, se

han relacionado con la liberación de quininas y óxido nítrico (Barros y col., 1998; Granados y Aragon, 1998; Gutierrez, 2000), b) quizás la L amino ácido oxidasa, enzima reportada por Scannone y col. (1979) en un lote de veneno de esta especie y posiblemente localizada en nuestra FI por la coloración amarillenta de la misma, en el caso de esta enzima aislada de venenos crotálicos, se ha señalado que su actividad procoagulante se ha observado inhibida por inhibidores de la ciclooxigenasa (Izidoro y col., 2006) y entre otras c) la 5´nucleotidasa, también reportada en un lote de veneno de *Bothrops colombiensis* por Scannone y col. (1979), en sus fracciones I y II, esta enzima hidroliza nucleosidos 5´monofosfatos a nucleosidos y ortofosfato, habiéndose reportado que los compuestos derivados adenilados son hipotensores y lesivos para el músculo cardíaco (Heredia y col., 1982). Aspectos que evidencian la necesidad del desarrollo de estudios al respecto, que permitan establecer en las fracciones evaluadas la presencia de proteínas que medien la producción de agentes hipotensores endógenos y su posible relación en la uremia pre-renal sugerida por nuestras observaciones.

Aunque tampoco se pueden descartar, la presencia de mecanismos alternativos, por ejemplo el bloqueo en la conducción eléctrica en músculo cardíaco como se ha evidenciado en evaluaciones con PLA₂ aisladas del veneno de *Bothrops marajoensis* en ratas (Liberato y col., 2010).

En la evaluación histopatológica del páncreas, a diferencia de lo observado para el veneno total, los expertos reportaron para las tres fracciones evaluadas el desarrollo de importantes

lesiones sobre este órgano blanco, las cuales estuvieron constituidas básicamente por la degeneración leve de Islotes de Langerhans lesión que fue común para todas las fracciones, aunque con magnitud y periodo de incidencia variable. El desarrollo de las mismas se observó de manera temprana en los ratones tratados con la FII, desde la primera hora post-tratamiento, mientras que con la FI las lesiones se hicieron evidentes desde las seis horas post-exposición y en los individuos tratados con la FIII se comenzaron a observar hasta las quince horas después de la aplicación del tratamiento. Lo que podría sugerir el desarrollo de mecanismos de toxicidad alternativos entre las diferentes fracciones, una posible vía de toxicidad directa mediada por los constituyentes tóxicos presentes en la FII dado el muy rápido desarrollo de las lesiones anteriormente mencionadas, así como una vía indirecta posiblemente mediada por las toxinas presentes en la FI y la FIII en base al largo plazo de desarrollo de las alteraciones fisiopatológicas reportadas por los expertos a nivel pancreático o quizás por una posible mayor concentración de constituyentes con capacidad de mediar toxicidad pancreática en la FII con relación a la FI o la FIII, aunque no se debe descartar la diferencia toxinológica entre dichas fracciones, recordemos por ejemplo que la FI y la FII están exentas de actividad PLA₂ a diferencia de la FIII, mientras que nuestras dos primeras fracciones están enriquecidas en enzimas con actividad hemorrágica (> FI) y procoagulante (> FII), sin embargo hasta el nivel evaluado no tenemos evidencias que nos permitan señalar la relación de ellas con las lesiones observadas, aspecto aunado a la carencia de soportes bibliográficos que relacionen las toxinas presentes en venenos botrópicos con alteraciones histopatológicas pancreáticas y sugiere la necesidad de evaluaciones al respecto.

Por otra parte y adicionalmente a la degeneración de los Islotes de Langerhans se describió el desarrollo de pancreatitis, en individuos tratados con la FIII y la FII, así como la degeneración de acinos atribuida exclusivamente a la FI, lo que nos evidencia la variabilidad en la susceptibilidad de los componentes endocrinos y exocrinos del páncreas a los diferentes constituyentes del veneno y sugiere la posibilidad de continuar evaluaciones al respecto, de manera de especificar los mecanismos fisiopatológicos implicados en el desarrollo de estas alteraciones.

Los Islotes de Langerhans son cúmulos celulares bien definidos, que se encuentran dispersos en toda la extensión del páncreas (1-2% del volumen del páncreas) y constituyen el componente endocrino de dicha glándula, aspecto mediado por la síntesis y secreción a la sangre de las hormonas insulina, glucagon y somatostatina, las cuales regulan la concentración de glucosa a la sangre (Ross y col., 2005), la disfunción de este componente interfiere con la adecuada regulación de dicho sustrato pudiendo derivar en un trastorno conocido como diabetes mellitus. Mientras que la pancreatitis aguda es referida como un síndrome clínico debido a la inflamación aguda y autodigestión del páncreas y de los tejidos peripancreáticos, clínicamente se ha relacionado con el escape de enzimas proteolíticas activadas de los conductos que conducen a lesión tisular, inflamación e incluso hasta la necrosis, empleándose en consecuencia los incrementos séricos de las enzimas amilasa y lipasa, producidas principalmente por las células acinares (componente exocrino del páncreas, el cual sintetiza y secreta hacia el duodeno enzimas indispensables para la digestión intestinal), para el diagnóstico de dicha patología. (Ward and Cockayne, 1993; Mcphee, 2000; Ross y col., 2005).

Al observar entonces, los niveles de glicemia y amilasa detectados en el suero de los ratones tratados con las fracciones evaluadas, encontramos que los niveles de glicemia sólo fueron ligeramente incrementados en los individuos tratados con la FII y exclusivamente en el grupo expuesto durante una hora a dicha fracción. Lo que podría sugerir, como se señaló anteriormente, un efecto directo de las toxinas presentes en la FII sobre las células insulares, el cual interfiere con los mecanismos que regulan las concentraciones séricas de glucosa, pero que fue reversible o de rápida resolución. Con relación a los otros lapsos post-tratamientos y otras fracciones evaluadas donde no observamos una aparente correlación entre histopatología y niveles de glicemia, podríamos referir que en la mayoría de los casos la lesión se reportó en una fracción minoritaria del total de animales tratados (aproximadamente 1/3 de los ratones con tratamiento) y por otra parte varias de estas lesiones fueron calificadas como leves, lo que nos permite referir que posiblemente ésta degeneración de células insulares sólo pudo haber afectado un pequeño número de islotes de manera que no compromete la secreción endocrina pancreática al punto de alterar sus finos mecanismos de regulación metabólica.

En cuanto a la determinación de la amilasa sérica se observó que sólo la FI y la FIII indujeron incrementos en los niveles séricos de este marcador. En el caso de la FI se observó correspondencia en los lapsos de incidencia y magnitud entre los reportes de histopatología, los cuales señalan degeneración multifocal leve de acinos y los niveles de amilasa en suero, lesiones que se evidenciaron a partir de las 3 horas post exposición, se intensificaron a las 15 horas post tratamiento, seguido de una reducción pero que no alcanzó a igualarse a los controles del experimento (sano o vehículo) aun a las 72 horas de

la aplicación de dicha fracción, correspondencia que podría sugerir que los incrementos séricos de amilasa detectados en los animales tratados podrían ser dependientes del tratamiento aplicado, pero obviamente se requieren evaluaciones al respecto. Mientras que con la FIII, desde el punto de vista histopatológico no hay reportes de lesiones que comprometan el componente exocrino del páncreas, sugiriendo que los incrementos séricos de amilasa detectados en los grupos tratados con esta fracción no obedecen a cambios histopatológicos en este órgano derivados del tratamiento aplicado a los ratones y considerando que la hiperamilasemia pudiera relacionarse con otras patologías como apendicitis aguda, enfermedades de las glándulas salivales, trastornos hepáticos y renales, entre otras (Ward and Cockayne, 1993), que la concentración de amilasa en suero refleja el estado regular entre los índices de ingreso y depuración de la amilasa de la sangre (proceso mediado a nivel renal) (Mcphee, 2000) y que la uremia e incremento de creatinina manifestada en los grupos de ratones tratados con la FIII en el lapso de 1 a 6 horas es coincidente con la tendencia inicial de incremento y pico principal de amilasa en el suero detectado en nuestras evaluaciones, podríamos sugerir que la hiperamilasemia observada en este caso puede ser producto de una disminución de la depuración metabólica de amilasa de la circulación, ya que una pobre función renal conlleva implícitamente a un incremento de la amilasa sérica (Ward and Cockayne, 1993).

Finalmente, en la evaluación histopatológica de los pulmones tomados de ratones tratados con la fracciones I, II y III del veneno objeto de éste estudio, los expertos reportaron la ausencia de lesiones atribuidas a la acción de las toxinas presentes en las diferentes fracciones evaluadas, aspectos que coinciden con los resultados obtenidos en el estudio del

veneno total y podríamos considerar confirma la escasa toxicidad sobre las estructuras pulmonares de los constituyentes con actividad biológica presentes en el veneno de *Bothrops colombiensis*, bajo las condiciones de este estudio.

Como se aprecia con la evaluación del veneno de *Bothrops colombiensis* (Paracotos) y sus fracciones, este veneno es capaz de desarrollar un perfil toxinológico cualitativamente similar al descrito para especímenes del género *Bothrops*, el cual es la consecuencia de la acción conjunta (aditiva y/o sinergista) de la amplia gama de enzimas y actividades tóxicas que lo constituyen, entre las cuales se encuentran localizadas enzima(s) con un aparente potencial neurotóxico. Este conjunto enzimático de acuerdo a este estudio podrían mediar, de manera general, efectos sistémicos por la afectación de diversos blancos celulares como **hígado, corazón, músculo y páncreas**, además del desarrollo de posibles complicaciones renales derivadas de estas fallas sistémicas.

Varios de nuestros resultados fueron coincidentes con estudios previos con otros venenos de serpientes, como se mencionó anteriormente, así como con observaciones clínicas realizadas en individuos mordidos por especímenes de *Bothrops colombiensis* de la región de Paracotos en el estado Miranda. Este es el caso específico de un trabajador de la UCV (asistente de veterinario), mordido en la extremidad inferior derecha cuando se encontraba en sus labores de campo. Dicho paciente ingresó al Hospital Dr. Leopoldo Manrique Terrero aproximadamente 2¹/₂ hora post accidente (y tras las administración de un vial de 10 ml de SAOP), presentando sólo alteraciones en coagulación (coágulo friable a los 12

min.) y se le diagnosticó envenenamiento botrópico leve. Las evaluaciones de laboratorio del paciente aproximadamente a las 6^{1/2} horas post accidente mostraron niveles de glucosa, urea y creatinina dentro de rango normal (con tendencia al límite superior) y los niveles séricos de CPK y LDH se encontraron notablemente elevados. Mientras que a las 42 horas posteriores al accidente, el paciente presentó una disminución de los niveles de urea (51,26%) acompañado de un notable incremento de los niveles de glucosa (178%) aunque no se puede obviar que el paciente desde el ingreso fue mantenido con hidratación parenteral constituida por una solución de NaCl al 0,9% alternada con una solución al 0,45% NaCl/5% dextrosa. Estas variaciones en los parámetros clínicos podrían sugerir, que éste envenenamiento leve curso con el desarrollo de lesiones a nivel de tejido muscular y posiblemente hepático (Ward y Cockayne, 1993), con alteraciones de los mecanismos que regulan las concentraciones séricas de glucosa, así como una afectación renal que aparentemente no involucró los mecanismo de filtración glomerular (Guyton y Hall, 2001) y podríamos referir que refleja varias de las alteraciones bioquímicas observadas en el transcurso de nuestras evaluaciones y sugiere la necesidad de continuar estudios al respecto, incluso de carácter clínico de manera de recolectar evidencias que expongan la posible toxicidad renal, pancreática, hepática y muscular (cardiaca y esquelética) sugerida en este estudio, lo cual podría repercutir en la optimización de los cuidados clínicos de las víctimas del accidente ofídico, específicamente en el tratamiento de sosten y seguimiento de los pacientes.

CAPITULO V

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

- El veneno total de *Bothrops colombiensis* (Paracotos) presentó un perfil toxinológico cualitativamente similar al descrito para especímenes del género *Bothrops*, caracterizado por el desarrollo de actividad letal, edematizante, coagulante, desfibrinante, necrosante y hemorrágica. Aunque la evaluación semicuantitativa de la actividad hemorrágica, mostró una DHM relativamente alta para un veneno de este género.
- En la caracterización de las actividades, el veneno de *Bothrops colombiensis* presentó una relación dosis dependiente, entre el efecto y la concentración de veneno evaluado, con la obvia excepción de la actividad necrosante, que se evaluó con dosis fija y en función del tiempo.
- En la caracterización clínica del veneno total, éste indujo incrementos en los niveles séricos de AST, ALT, CPK, BUN y amilasa. Los estudios histopatológicos confirmaron el desarrollo de lesiones en músculo esquelético, corazón y riñón.
- El fraccionamiento por cromatografía de exclusión molecular (Sephadex[®] G100) y la electroforesis en gel, mostraron que el veneno total de *Bothrops colombiensis* evaluado está constituido principalmente por proteínas con un PM entre los 12,50-

33 kDa (FIII), tiene una proporción intermedia por proteínas entre los 41,72-172,86 kDa (FI) y minoritariamente por proteínas entre los 31,75-51 kDa (FII).

- Las fracciones evaluadas no superaron la letalidad del veneno total, infiriendo la importancia de la acción conjunta (aditiva y/o sinérgica) de la variedad de constituyentes tóxicos presentes en el veneno.
- Las fracciones I, II y III evaluadas presentaron actividad hemorrágica y edematizante, las fracciones I y II fueron las responsables por las actividades desfibrinante y coagulante *in vitro*, mientras que sólo la FIII presentó actividad tipo PLA₂. Adicionalmente la FI presentó las más efectivas DHM y DCM, la FII presentó la mayor capacidad desfibrinante, mientras que la FIII se caracterizó por su letalidad y menor DEM.
- Las fracciones I y II indujeron un marcado cuadro neurotóxico en los animales tratados, caracterizado por opistótono, parálisis flácida en trenes anteriores y posteriores, convulsiones tónico clónicas y giros sobre su propio eje, efectos nunca antes descritos en evaluaciones con venenos de especímenes de *Bothrops colombiensis* en Venezuela. La importancia de dicho cuadro sugiere la necesidad de aislar, purificar y caracterizar los constituyentes del veneno objeto de este estudio, comprometidos con este perfil neurotóxico.

- Las fracciones I y II evaluadas indujeron incrementos de los marcadores CPK, AST, ALT y BUN. Los marcadores pancreáticos fueron inversamente afectados la FI indujo incrementos de los niveles séricos de amilasa, mientras que la FII medió incrementos séricos de glicemia en los ratones tratados, sugiriendo el desarrollo de lesiones en tejido muscular (cardíaco y/o esquelético), hepático, pancreático (exocrino/endocrino) y renal. Las evaluaciones histopatológicas posteriores confirmaron el desarrollo de lesiones en músculo esquelético, corazón y páncreas. No hay resultados concluyentes con relación a hígado y riñón.
- La fracción III evaluada indujo incrementos de los marcadores CPK, AST, ALT, creatinina, BUN y amilasa en suero, sugiriendo el desarrollo de lesiones en tejido muscular (cardíaco y/o esquelético), hepático y pancreático. Las evaluaciones histopatológicas posteriores confirmaron el desarrollo de lesiones en corazón y páncreas. No hay resultados concluyentes con relación a hígado y riñón.
- El conjunto de lesiones observadas en blancos celulares como corazón, músculo e hígado tras el tratamiento de los ratones con el veneno evaluado o en páncreas tras el tratamiento con las fracciones, además de las posibles complicaciones renales derivadas de las lesiones en músculo cardíaco evidenciadas en este estudio, sugieren la necesidad de continuar evaluaciones al respecto incluso de carácter clínico, de manera de recolectar evidencias en víctimas humanas del accidente ofídico por esta

especie, que expongan la posible toxicidad sistémica sugerida por nuestras observaciones.

- La persistencia de hasta una semana de alteraciones en la histopatología por Ej. en músculo cardíaco ó páncreas evidenciadas en evaluaciones con veneno total y la FIII, así como en los marcadores de lesión tisular como CPK, AST y urea, indicadores de miotoxicidad y disfunción renal, evidenciadas en las evaluaciones con veneno total, sugieren la necesidad de alertar a los profesionales del área de la salud a fin de que tomen previsiones en la evaluación y seguimiento de los pacientes que sufran accidentes por ésta especie. Así como con el importante hallazgo de constituyentes con actividad neurotóxica en dos de nuestras fracciones evaluadas, ya que dada la variabilidad intraespecie en la composición de los venenos no se puede descartar que los efectos de estas toxinas pudieran en algún momento expresarse tras el accidente ofídico.
- Dada la importancia de las lesiones sistémicas evidenciadas en este estudio y su permanencia en el tiempo, es necesario evaluar la capacidad neutralizante del suero antiofídico comercialmente disponible en nuestro país, sobre las actividades tóxicas desarrolladas por el veneno total de *Bothrops colombiensis* (Paracotos) y sus fracciones, todas ampliamente comprometidas con el cuadro clínico desarrollado por el veneno evaluado.

BIBLIOGRAFÍA.

- Acosta O, Koscinczuc P, Negrette M, Teibler P and Ruíz R. (1996). Effects of *Bothrops alternatus* venom of Argebtina on muscle and different organs in mices. *Acta Physiol Pharmacol Ther Latinoam.* 46 (2): 97-102.
- Acosta O, Koscinczuc P, Teibler P, Sánchez M, Ruiz R, Maruñak S y Bogarin G. (1998). Actividades hemorrágica y edematizante y alteraciones histológicas en almohadilla plantar del ratón inducidas por venenos de serpientes de los géneros *Bothrops* y *Crotalus* de Argentina. (1998). *Toxicon.* 36 (8): 1165- 1172.
- Aline P, Rocha J and Da Cruz M (1999). Histologic and functional renal alterations caused by *Bothrops moojeni* snake venom in rats. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 61 (5): 698-706.
- Álvarez M, Giron M, Ercolino J, Suárez E, Perdomo L y Rodríguez-Acosta A. (2010). Cardiotoxicidad inducida por veneno crudo de mapanare (*Bothrops colombiensis*) en modelo experimental de embrión de pollo “*In vivo*” e “*In vitro*”. RETEL <http://www.sertox.com.ar/retel/default.htm>.
- Anai K, Sugiti M, Yoshida E and Maruyama M. (2002). Neutralization of a snake venom hemorrhagic metalloproteinase prevents coagulopathy after subcutaneous injection *Bothrops jararaca* of venom in rats. *Toxicon.* 40: 63-68.
- Angulo Y and Lomonte B. (2009). Biochemistry and toxicology of toxins purified from the venom of the snake *Bothrops asper*. *Toxicon* 54: 949-957.
- Aronson P y Thier S (1988). El riñón. En Smith L and Their S. Fisiopatología. Principios biológicos de la enfermedad. Segunda edición. Editorial Médica Panamericana. Argentina. pp 663-682.
- Badillo R, Casas M y Gamarra G. (1989) Ofiditoxicosis en el Hospital Universitario Ramón González Valencia de Bucaramanga. *Acta Med. Colomb.* 14 (6): 352-368.
- Báez A, Teibler P, Merlo W, Burna A, Acosta M, Solana M, Infuleski R y Acosta O. (2005). Lesiones sistémicas en un canino por intoxicación ofídica. *Revista Veterinaria de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la UNNE.* 16 (2): 95–98.
- Baldo C, Ferreira M, Lopes D, Izidoro L, Gomes A, Ferro E, Hamaguchi A, Homsy M and Rodrigues V (2010). Action of neuwiedase, a metalloproteinase isolated from *Bothrops neuwiedi* venom, on skeletal muscle: an ultrastructural and immunocytochemistry study. *J Venom Anim Toxins incl Trop Dis.* 16 (3): 462-469.
- Baramova E, Shannon J, Bjarnason J and Fox J. (1989). Degradation of extracellular matrix proteins by hemorrhagic metalloproteinases. *Arch. Bioch. Bioph.* 275 (1): 63-71.
- Barraviera B. (1995). Liver dysfunction in patients bitten by *Bothrops* and *Crotalus* snakes in Botucatu (State of Sao Paulo) Brazil: experimental hepatic study in Wistar rats inoculated with *Crotalus durissus terrificus* (Laurenti, 1768) venom. *J. Venom. Anim. Toxins* 1(1): 39.
- Barbosa A, do Amaral R, Teixeira C, Hyslop S and Cogo J. (2003). Pharmacological characterization of mouse hind paw oedema induced by *Bothrops insularis* (jararaca ilhoa) snake venom. *Toxicon.* 42: 515-523.
- Barbosa P, Havt A, Facó P, Sousa T, Bezerra I, Fonteles M, Toyama M, Marangoni S, Novello J and Monteiro H. (2002). Renal toxicity of *Bothrops moojeni* snake venom and its main myotoxin. 40: 1427-1435.
- Barbosa P, Martins A, Alves R, Amora D, Martins R, Tomaya M, Havt A, Nascimento N, Rocha V, Menezes D, Fonteles M and Monteiro H. (2006). The role of

- indomethacin and tezosentan on renal effects induced by *Bothrops moojeni* Lys49 myotoxin I. *Toxicon* 47 (8): 831-837.
- Barros S, Friedlanskaia I, Petricevich V and Kipnis T (1998). Local inflammation, lethality and cytokine release in mice injected with *Bothrops atrox* venom. *Mediators Inflamm.* 7 (5): 339-46.
- Benvenuti L, Franca F, Barbaro K, Nunes J, Cardoso J. (2003). Pulmonary haemorrhage causing rapid death after *Bothrops jararacussu* snakebite: a case report. *Toxicon.* 42: 331-334.
- Bjarnason J and Fox J. (1988-89). Hemorrhagic Toxins from snake venoms. *J. Toxicol. Toxin. Reviews.* 7 (2): 121-209.
- Boer P, Rocha J, and Da Cruz H. (1999). Histologic and functional renal alterations caused by *Bothrops moojeni* snake venom in rats. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 61 (5): 698-706.
- Bogarin G, Romero M, Rojas G, Lutsch C, Casademont M, Lang R and Gutiérrez J. (1999) Neutralization, by a monospecific *Bothrops lanceolatus* antivenom, of toxic activities induced by homologous and heterologous *Bothrops* snake venom. *Toxicon* 37: 551-557.
- Bogarin G, Morais J, Kazuko I, Stephano M, Marcelino J, Keiko A, Guidolin R, Rojas G, Gondo H and Gutiérrez J. (2000). Neutralization of crotaline snake venoms from Central and South America by antivenoms produced in Brazil and Costa Rica. *Toxicon* 38: 1429-1441.
- Braud S, Bon C and Wisner A. (2000). Snake venom proteins acting on hemostasis. *Biochem.* 82: 851-859.
- Braunwald E. (1998). Edema en Fanci A, Braunwld E, Isselbacher K, Wilson J, Martin J, Kasper D, Hamer S y Lungo D. (Editores). *Harrison principios de medicina interna.* McGrawHill Interamericana. Decimo cuarta edición. España. pp: 240-242.
- Bucarechi F, Fontoura S, Hyslop S; Bacarat E and Vieira R. (2001). Snakebites by *Bothrops* spp in children in Campinas, São Paulo, Brazil. *Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo.* 43 (6): 329-333.
- Calil S, Thattassery E, Martínez A and Melo P. (2002). Effect of perimuscular injection of *Bothrops jararacussu* venom on plasma creatine kinase levels in mice: influence of dose and volume. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research.* 35: 1233-1235.
- Camey K, Velarde D and Sánchez E. (2002). Pharmacological characterization and neutralization of the venoms used production of Bothropic antivenom in Brazil. *Toxicon.* 40: 501-509.
- Caraballo A, Navarro J, Sánchez E, Pérez J y Rodríguez-Acosta A. (2004). Aspectos clínicos y epidemiológicos de las mordeduras de serpientes en el estado Bolívar, Venezuela. *Rev. Fac. Med.* 27 (1): 25-28.
- Castro I, Burdmann E, Seguro A and Yu L. (2004). *Bothrops* venoms induces direct renal tubular injury: role for lipid peroxidation and prevention by antivenom. *Toxicon.* 43: 833-839.
- Cavinato R, Remold H and Kipnis. (1998). Purification and variability in the thrombin-like activity of *Bothrops atrox* venom from different geographic regions. *Toxicon* 36 (2): 257-267.
- Chaves F, Barboza M and Gutiérrez (1995). Pharmacological study of edema induced by venom of the snake *Bothrops asper* (terciopelo) in mice. *Toxicon.* 33: 31-39.

- Chaves F, Gutierrez J, Lomonte B and Cerdas L. (1989). Histopathological and biochemical alterations induced by intramuscular injection of *Bothrops asper* (terciopelo) venom in mice. *Toxicon* 27, (10):108-1093.
- Chaves F, León G, Alvarado V and Gutierrez J. (1998). Pharmacological modulation of edema induced by lys-49 and asp-49 myotoxic phospholipases A2 isolated from the venom of the snake *Bothrops asper* (terciopelo). *Toxicon*. 36 (12): 1861-1869.
- Chippaux J-P and Goyffon (1998). Venoms, antivenom and immunotherapy. *Toxicon* 36: 823-846.
- Chippaux J-P, Williams V and White J. (1991). Snake venom variability: methods of study, results and interpretation. *Toxicon*. 29: 1299-1303.
- Cintra M, Caccin P, Chiavegato A, Pizzo P, Carmignoto G, Angulo Y, Lomonte B, Gutiérrez J and Montecucco C. (2010). *Bothrops* snake myotoxins induce a large efflux of ATP potassium with spreading of cell damage and pain. *PNAS*. 107 (32): 14140-14145.
- Colimodio H y Aguilar M. (1993). Envenenamiento ofídico en Venezuela. *Med. Crit. Venez.* 8 (1): 23-38.
- Devi A, Ashgar S and Sarkar K. (1966). 5´nucleotidase activity in snake venoms. *Mem Inst. Butantan*. 33 (3): 943-950.
- Duque C y Scannone H. (2006). Evaluación de las principales actividades biológicas del veneno de *Bothrops atrox* de Puerto Ayacucho, estado Amazonas y su neutralización por un suero antiofídico venezolano. Trabajo Especial de Especialización en Toxicología. Facultad de Farmacia. Universidad Central de Venezuela.
- Eubanks D, Parker C and Lollar P (1989). Differential proteolytic activation of factor VIII-von Willebrand factor complex by thrombin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 86: 6508-6512.
- Fernández I, Scannone H, Vargas A y Fernández N. (1996). Caracterización bioquímica y toxicológica de la fracción I del veneno de *Bothrops atrox* proveniente del Edo. Bolívar (El Paují). *Acta Científica Venezolana*. 47 (Sup. 1): 196.
- Ferreira M, Moura A, Franca F, Cardoso J and Mota I. (1992a). Toxic activities of venoms from nine *Bothrops* species and their correlation with lethality and necrosis. *Toxicon*. 30: 1603-1608.
- Ferreira M, Moura A and Mota I. (1992b). Neutralization of different activities of venoms from nine species of *Bothrops* snakes by *Bothrops jararaca* antivenom. *Toxicon* 30: 1591- 1602.
- Franca R, Vieira R, Ferrari E, Souza R, Osorio R, Prianti A, Hyslop S, Zamuner S, Cogo J and Ribeiro W. (2009). Acute hepatotoxicity of *Crotalus durissus terrificus* (South American rattlesnake) venom in rats. *J. Venom Anim Toxins incl Trop Dis*. 15 (1): 61-78.
- Fry B, Winkel K, Wickramaratna J, Hodgson W and Wüster W. (2003). Effectiveness of snake antivenoms: Species and regional venom variation and its clinical impact. *J Toxicol. Toxin. Review*. 22 (1): 23-34.
- Furtado M, Maruyama M, Kamiguti A and Antonio L. (1991). Comparative study of nine *Bothrops* snake venoms from adult female snakes and their offspring. *Toxicon*. 29 (2): 219-226.
- Furukawa Y. and Hayaslei K. (1977). Factor X converting and thrombin-like activities of *Bothrops jararaca* snake venom. *Toxicon* 15: 107-114.

- Gabrijelcic D, Drujan B and Gubensek F. (1982). Coagulant proteinase from *Bothrops colombiensis* venoms. *Toxicon* 20 (1): 275-278.
- Garcia M, Rey L, Leiva L and Acosta O. (2006). Histochemical analyses of muscle injury induced by venom from Argentine *Bothrops alternatus* (víbora de la cruz). *Rev. Vet.* 17 (2): 67-71.
- Gay C, Leiva L, Maruñak S, Teibler P and Acosta O. (2005). Proteolytic, edematogenic and myotoxic activities of a hemorrhagic metalloproteinase isolated from *Bothrops alternatus* venom. *Toxicon* 46: 546-554.
- Gené J, Roy A, Rojas G, Gutiérrez J, Cerdas L. (1989). Comparative study on coagulant, defibrinating, fibrinolytic and fibrinogenolytic activities of Costa Rica crotaline venoms and their neutralization by a polyvalent antivenom. *Toxicon* 27: 841-848.
- Girón M, Salazar A, Aguilar I, Perez J, Sánchez E, Arocha C, Rodríguez-Acosta A and Guerrero B. (2008). Hemorrhagic, coagulant and fibrino(geno)lytic activities of crude venom and fractions from mapanare (*Bothrops colombiensis*) snakes. *Comp. Biochem. and Phys. Part C* 147: 113-121
- Goncalves D, Silva E, Graca F, Lira E, Zanon N, Mendes G, Burdmann E, Migliorini R, Kettelhut I, and Navegantes L. (2008). In vivo effects of *Bothrops jararaca* venom on metabolic profile and on muscle protein metabolism in rats. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 79(5): 771-778.
- Granados J y Aragon F. (1998). Alteraciones cardiovasculares inducidas por el veneno de *Lachesis muta* (Serpentes: Viperidae) y por su enzima fibrinogenolítica. *Rev. Biol. Trop.* 46 (4): 1149-1157.
- Gregus Z and Klaassen C. (2001). Mechanisms of toxicity in Klaassen C. (Ed.). Casarett and Doull's toxicology . The Basic Science of Poisons. Sixth edition. USA. McGraw-Hill. pp 58-64.
- Grillo O, Scannone H y Fernández I. (1994a). Estudio del veneno de *Bothrops venezuelensis*. *Acta Científica Venezolana* 45 (Sup. 1): 123-124.
- Grillo O, Scannone H y Fernández I. (1994b). Estudio del veneno de *Bothrops colombiensis*. Fraccionamiento por filtración en gel. *Acta Científica Venezolana* 45 (Sup. 1): 315
- Grillo O, Scannone H, Vargas A y Fernández I. (1994c). Estudio del veneno de *Bothrops colombiensis*. *Acta Científica Venezolana* 45 (Sup. 1): 315.
- Gutiérrez J. (2002). Comprendiendo los venenos de serpientes: 50 años de investigaciones en América Latina. *Rev. Biol. Trop.* 50 (2): 377-394.
- Gutiérrez J. (2011). Envenenamientos por mordedura de serpientes en América Latina y el Caribe: Una visión integral de carácter regional. *Bol. Mal. Salud Amb.* 51(1): 1-16.
- Gutiérrez J. (2003). Fisiopatología del envenenamiento por mordedura de serpiente en Centro-América. *Jornada de Ofidismo*.
- Gutiérrez J, Avila C, Rojas E and Cerdas L. (1988). An alternative *in vitro* method for testing the potency of the polyvalent antivenom produced in Costa Rica. *Toxicon* 26: 411-413.
- Gutiérrez J y Bolaños R. (1980). El problema de los efectos hemorrágico y mionecrótico por mordeduras de serpientes en el continente americano. *Bol. Of. Sanit. Panam.* 89 (2): 149-156.
- Gutiérrez J y Chaves F. (1980). Efecto proteolítico, hemorrágico y mionecrótico de los venenos de serpientes costarricenses de los géneros *Bothrops*, *Crotalus* y *Lachesis*. *Toxicon* 18: 315-321.

- Gutiérrez J, Chaves F, Bolaños R, Cerdas L, Rojas E, Arroyo O y Portilla E. (1981). Neutralización de los efectos locales del veneno de *Bothrops asper* por un antiveneno polivalente. *Toxicon* 19: 493-500.
- Gutiérrez J, Gene J, Rojas G and Cerdas L (1985). Neutralization of proteolytic and hemorrhagic activities of Costa Rica snake venom by a polyvalent antivenom. *Toxicon* 23 (6): 887-893.
- Gutiérrez J and Lomonte B. (1989). Local tissue damage induced by *Bothrops* snake venoms. A review. *Mem. Inst. Butantan.* 51 (4): 211-223.
- Gutiérrez J and Lomonte B. (1995). Phospholipase A₂, myotoxins from *Bothrops* snake venoms. *Toxicon* 33 (11): 1405-1424.
- Gutiérrez J, Rojas G y Aymerich R. (1996). El envenenamiento ofídico: fisiopatología y tratamiento. Instituto Clodomiro Picado. Universidad de Costa Rica.
- Gutiérrez J and Rucavado A (2000). Snake venom metalloproteinases: Their role in the pathogenesis of local tissue damage. *Biochimie* 82: 841-850.
- Gutiérrez J, Rucavado A, Chaves F, Diaz C and Escalante T. (2009). Experimental pathology of local tissue damage induced by *Bothrops asper* snake venom. *Toxicon* 54 (7): 958-75.
- Guyton A y Hall J. (2001). Tratado de fisiología médica. Décima edición. México. McGraw-Hill Interamericana. pp 344-345, 509-521.
- Guyton A y Hall J. (2006). Tratado de fisiología médica. Décimo Primera edición. México. McGraw-Hill Interamericana. pp 45-55.
- Haad J. (1980/1981). Accidentes humanos por las serpientes de los géneros *Bothrops* y *Lachesis*. *Mem. Inst. Butantan.* 44/45: 403-423.
- Havt A, Fonteles M and Monteiro H. (2001). The renal effects of *Bothrops jararacussu* venom and the role of PLA₂ and PAF blockers. *Toxicon.* 39: 1841-1846.
- Heredia V, Campos S and Yarleque A. (1982). Actividad de una 5' nucleotidasa en el veneno de la serpiente *Bothrops atrox*. *Act. Cient. Vez.* 33: 333-337.
- Hernández M, Finol H, López J, Fernández I, Scannone H y Rodríguez-Acosta A. (2005). Alteraciones ultraestructurales de tejido cardiaco tratado con veneno crudo de serpiente de cascabel (*Crotalus durissus cumanensis*). *RFM.* 28 (1): 12-16.
- Hoffmann H and Bond C. (1987). Blood coagulation induced by the venom of *Bothrops atrox*. 1. Identification, purification, and properties of a prothrombin activator. *Biochem.* 26: 772-780.
- Huatuco S, Escobar E and Yarleque A. (2004). Aislamiento y caracterización parcial de una miotoxina del veneno de la serpiente *Bothrops atrox*. (*Ophidia: Viperidae*). *Rev. Peru. Biol.* 11 (1): 79-86.
- Instituto Clodomiro Picado (1998). Técnicas para determinación de actividades tóxicas de venenos y su neutralización por antivenenos. Manual de procedimientos. Facultad de Microbiología. Universidad de Costa Rica.
- Isla M, Málaga O y Yarleque A. (2003). Características bioquímicas y acción biológica de una hemorragina del veneno de *Bothrops brazili*. *Anales de la Facultad de Medicina.* 64 (3): 159-166.
- Izidoro L, Ribeiro M, Souza G, Sant C, Hamaguchi A, Honsi M, Goulart L, Belebani R, Nomizo A, Sampaio S, Soares A and Rodrigues V. (2006). Biochemical and functional characterization of an L-amino acid oxidase isolated from *Bothrops pirajai* snake venom. *Bio. Med. Chem.* 14: 7034-7043.

- Jiménez–Porras J. (1964). Venom proteins of the Fer de Lance, *Bothrops atrox*, from Costa Rica. *Toxicon*. 2: 155-166.
- Kamiguti A, Cardoso J, Theskston G, Sano I, Hutton R, Rugman F, Warrell D and Hay C. (1991). Coagulopathy and haemorrhage in human victims of *Bothrops jararaca* envenoming in Brazil. *Toxicon*. 29 (8): 961-972.
- Kamiguti A, Hay C, Theskston G and Zuzel M. (1996). Insights into the mechanism of haemorrhage caused by snake venom metalloproteinases. *Toxicon* 34: 627-642
- Kamiguti A and Sano-Martins. (1995). South american snakes venoms affecting haemostasis. *J. Toxicol. Toxin Reviews*. 14: 359-374.
- Kanashiro M, Escocard R, Petretski J, Prates M, Alves E, Machado O, Dias W and Kipnis T. (2002). Biochemical and biological properties of phospholipases A₂ from *Bothrops atrox* snake venom. *Biochem Pharmacol* 64 (7): 1179-1186.
- Kang T, Georgieva D, Genov N, Murakami M, Simha M, Kumar R, Kaur P, Kumar S, Dey S, Sharma S, Vrieland A, Betzel C, Takeda S, Arni R, Singh T and Kini R. (2011). Enzymatic toxins from snake venom: structural characterization and mechanism of catalysis. *FEBS Journal* 278: 4544-4576.
- Kini M. (2003). Excitement ahead: structure, function and mechanism of snake venom phospholipase A₂ enzymes. *Toxicon*. 42: 827-840.
- Kirby E, Niewiarowski S, Stocker K, Kettner C and Shaw E. (1979). Thrombocytin, a serine protease from *Bothrops atrox* venom. 1. Purification and characterization of the enzyme. *Biochem*. 18 (16): 3564-3569.
- Klaassen C. and Watkins J. (2001). Casarett & Doull. Manual de Toxicología La ciencia básica de los tóxicos. 5ª edición. México. McGraw-Hill Interamericana. pp 753-758
- Koscinczuk P, Daillard B, Ortega H, Maruñak S and Borda J. (2003). Marcación inmunohistoquímica de mioglobina en tejido renal de ratas intoxicadas con veneno de *Bothrops neuwidii dipurus* de Argentina. Versión online: <http://www.unne.edu.ar/Web/cyt/cyt/2003/comunicaciones/cyt.htm>
- Koscinczuk P, Ortega H, Daillard B and Mussart N. (2007). Valoración bioquímica e inmunohistoquímica de daño renal causado por veneno de *Bothrops neuwiedii* en ratas. *Rev. Vet.* 18 (1): 14-19.
- Koscinczuk P, Borda T, Maruñak S y Acosta O. (2011). Alteraciones histopatológicas del tejido renal inducidas por veneno de serpientes (*Bothrops neuwiedii*, *Bothrops alternatus* y *Crotalus durissus terrificus*) en ratas. Version online. <http://www1.unne.edu.ar/cyt/2002/04-Veterinarias/V-019.pdf>.
- Laemmli U. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 227: 680-685.
- Lancini A. (1986). Serpientes de Venezuela. 2ª ed. Venezuela. Tecniciencia. pp:78-225.
- Landucci E, Castro R, Pereira M, Cintra A, Giglio R, Marangoni S, Oliveira B, Cirino G, Antunes E and De Nucci G. (1998). Mast cell degranulation induced by two phospholipase A₂ homologues: dissociation between enzymatic and biological activities. *Eur J. Pharmacol.* 343: 257-63.
- Lazo F, Malaga O, Yarlequé A, Severino R y Gutiérrez S. (2007). Actividad antimicrobiana de una flavoproteína aislada del veneno de la serpiente peruana *Bothrops atrox* (“Jergón”). *Rev. Soc. Quim. Perú.* 73 (4): 197-207.
- Leite R, Franco W and Sobreiro H. (2011). The role of extracellular calcium in the effect of a snake venom Lys 49-phospholipase A₂ on water transport across epithelial membranes. *Journal of Biophysical Chemistry*. 2 (3): 222-225.

- Liberato I, Costa A, Falcao N, Havt A, Azul J, Batista T, Hihari M, Brito E, de Oliveira D, Fonteles M and Azul H. (2010). Renal and cardiovascular effects of *Bothrops marajoensis* venom and phospholipase A₂. *Toxicon*. 55 (6): 1061-1070.
- Limdi J and Hyde G. (2003). Evaluation of abnormal liver function test. *Postgrad. Med. J.* 79: 307-312.
- Li3n V, Rojas A y Rodr3guez-Acosta A. (2004). Dise1o de una prueba de aglutinaci3n en l3tex, para detectar venenos de serpientes *Viperidae* en sueros de pacientes. *Rev. Cubana Med. Trop.* 56 (1): 1-10.
- Lobo A, de Souza A, da Cruz A, Flores C and Bon C. (2000). *Bothrops lanceolatus* (Fer de lance) venom induces oedema formation and increases vascular permeability in the mouse hind paw. *Toxicon* 38: 209-221.
- Lomonte B, Guti3rrez J, Moreno E and Cerdas L. (1987). Antibody neutralization of myotoxin from the venom of *Bothrops asper* (Terciopelo). *Toxicon*. 25 (4): 443-9.
- L3pez J, Vargas A y Fuentes C (1996). Caracterizaci3n Bioqu3mica y Toxicol3gica del Veneno Total y Fracciones I y II de la serpiente *Bothrops venezuelensis*. Trabajo Especial de Grado para optar al t3tulo de Licenciado en Biolog3a. Universidad del Zulia.
- L3pez J, de Sousa M, Andr3 C, Chavez C, Flores E, Muniz E, B3hrnheim P and Morhy L. (2002). Ontogenetic variation of metalloproteinases and plasma coagulant activity in venoms of wild *Bothrops atrox* specimens from Amazonian rain forest. *Toxicon*. 40: 997-1006.
- L3pez J, Fern3ndez I, Pineda M y Scannone H. (2004). Neutralizaci3n de actividades biol3gicas de cuatro especies de "mapanare" venezolanas por las antiveninas producidas en Venezuela y Costa Rica. *Acta. Cient3fica Venezolana*. 55 (Sup. I): 84.
- L3pez J, Vargas A, Fern3ndez I. y Scannone H (1994a). Caracterizaci3n bioqu3mica y toxicol3gica de la fracci3n I del veneno de *Bothrops venezuelensis* (Tigra Mariposa). *Acta Cientifica Venezolana*. 45 (Sup. 1): 314.
- L3pez J, Vargas A, Fern3ndez I. y Scannone H (1994b). Caracterizaci3n bioqu3mica y toxicol3gica de la fracci3n II del veneno de *Bothrops venezuelensis* (Tigra Mariposa). *Acta Cientifica Venezolana*. 45 (Sup. 1): 124.
- L3pez J, Vargas A, Scannone H y Fern3ndez I. (1999). Estudio cromatogr3fico, electrofor3tico y enzim3tico del veneno total y fracci3n I de la serpiente venezolana *B. venezuelensis* (Tigra Mariposa). *Revista Cient3fica FCV-LUZ*. 9 (4): 314-320.
- Loria G, Rucabado A, Kamiguti A, Theakston R, Fox J, Alape A and Guti3rrez J. (2003) Characterization of 'basparin A,' a prothrombin-activating metalloproteinase, from the venom of the snake *Bothrops asper* that inhibits platelet aggregation and induces defibrination and thrombosis. *Arch Biochem Biophys* 418 (1): 13-24.
- Lu Q and Clemetson. K (2005). Snake venoms and hemostasis. *J. Thromb Haemost.* 3: 1791-1799.
- Manjunatha K. (2005). Structure-function relationships and mechanism of anticoagulant phospholipase A₂ enzymes from snake venoms. *Toxicon*. 24: 1147-1161.
- Manjunatha K, Evans H. (1989). A model to explain the pharmacological effects of snake venom phospholipases A₂. *Toxicon*. 27 (6): 613-635.
- Markland F. (1991). Inventory of α -and β fibrinogenases from snake venoms. *Thromb. Haemost.* 65 (4): 438-443.
- Markland F. (1998a). Snake venoms and the hemostatic system. *Toxicon*. 36 (12): 1749-1800.

- Markland F. (1998b). Snake venoms fibrinogenolytic and fibrinolytic enzymes: an updated inventory. *Tromb Haemost.* 79: 668-74.
- Maruñak S, Leiva L, Gay C, Ruíz R y Teibler G. (2005). Mionecrosis inducidas por fosfolipasa A₂ aislada del veneno de *Bothrops jararacusso* de Argentina. Universidad Nacional del Nordeste. Comunicaciones Científicas y Tecnológicas. Resumen V-016.
- Maruñak S, Teibler G, Ruíz R, Koscinczuc P, Acosta O. (2011). Efecto del veneno de viboreznos de *Bothrops alternatus* sobre músculo, hígado y riñón. Versión online. <http://www1.unne.edu.ar/cyt/veterinarias/v-021.pdf>.
- Maruyama M, Kamiguti A, Cardoso L, Sano I, Chudzinski A, Santoro M, Morena P, Tomy S, Antonio L, Mihara H and Kelen E. (1990). Studies on blood coagulation and fibrinolysis in patients bitten by *Bothrops jararaca* (jararaca). *Trombosis and Haemostasis.* 63 (3): 449-453.
- Mcphee S. (2000). Trastornos del páncreas exocrino. En Mcphee S, Ganong W, Lingappa V y Lange J. *Fisiopatología médica: Una introducción a la medicina clínica.* Editorial El Manual Moderno. México. pp. 413-433.
- Meier J. (1986). Individual and age-dependence variations in the venom of the Fer de Lance (*Bothrops atrox*) *Toxicon.* 24: 41-46.
- Mello S, Linardi A, Rennó A, Tarsitano C, Pedreira E and Hyslop S. (2010). Renal kinetics of *Bothrops alternatus* (Urutu) Snake venoms in rats. *Toxicon* 55: 470-480.
- Meza M y Vargas A. (2008). Caracterización clínica y toxicológica del veneno de la serpiente venezolana *Crotalus durissus cumanensis* de la Isla de Margarita (Estado Nueva Esparta) en ratones. Trabajo Especial. Escuela de Bioanálisis. Facultad de Medicina. Universidad Central de Venezuela.
- Morales O, Sandi M y Marielena C. (1976). Efectos cardiovasculares del veneno de *Bothrops asper* en corazón de anfibios. *Rev. Biol. Trop.* 24 (1): 69-83.
- Moura A, Ramos O, Baldo C, Niland S, Hansen U, Ventura J, Burlan S, Butera D, Della M, Tanjoni I, Clissa P, Fernández I, Chudzinski A and Able J. (2008). Collagen binding is a key factor for the hemorrhagic activity of snake venom metalloproteinases. *Biochimie.* 90: 484-492.
- Munis E, Wany M, Estevao-Acosta M, Buhrnheim O and Chávez-Olórtegui C (2000). Neutralizing potency of horse antiothropic Brazilian antivenom against *Bothrops* snake venom from the Amazonian rain forest. *Toxicon* 38: 1858-1863.
- Nahas L, Kamiguti A and Barros A. (1979). Thrombin-like and factor X-activator components of *Bothrops* snake venoms. *Thrombos Haemostas.* 41: 315-328.
- Navarrete L. (2002). Taxonomía e historia natural de las serpientes de Venezuela. "Jornadas de Actualización. Manejo básico de accidentes con animales venenosos en Venezuela". Instituto de Medicina Tropical. Universidad Central de Venezuela.
- Nget-Hong T and Shin-Yee F. (2008). Snake venoms L-amino acid oxidases and their potential biomedical applications. *Malaysian Journal of Biochemistry and Molecular Biology.* 16 (1): 1-10.
- Niewiarowski S, Kirby E, Brudzynski T and Stocker K. (1979). Thrombocytin, a serine protease from *Bothrops atrox* venom. 2. Interaction with platelets and plasma-clotting factors. *Biochem.* 18 (16): 3570-3576.
- Noriega J, Colmenarez D, Mogollón A, Márquez N, Hernández V y Pérez M. (2009). Cambios séricos en las enzimas ALT, AST, FA, CK-total y LDH inducidos por

- venenos de *Crotalus durissus cumanensis* en ratones Balb/C. Revista Científica, FCV-LUZ / Vol. XIX, (4): 408 – 413.
- Noriega J, Marín R, Mendoza J, Álvarez C, Mogollón A, Pérez M y Salas Y. (2010). Modificaciones en los marcadores enzimáticos hepáticos promovidos por veneno de ejemplares jóvenes de *Crotalus durissus cumanensis*. Archivos Venezolanos de Farmacología y Terapéutica. 29 (4): 72-75.
- Núñez V, Arce V, Gutiérrez J and Lomonte B. (2004). Structural and functional characterization of myotoxin I, a Lys49 fosfolipase A₂ homologue from the venom of snake *Bothrops atrox*. Toxicon 44: 91-101.
- Oliveira L, Sakate M, Madruga R and Barbosa N. (2007). Biochemical and hematological study of goat envenomed with natural and 60Co-irradiated bothropic venom. J. Venom. Anim. Toxins incl. Trop. Dis. 13 (3): 576-597.
- Otero R. (2008). Seroterapia antivenenosa. Ventajas del uso de antivenenos del tipo IgG, F(ab')₂ o Fab en picaduras de escorpiones y mordeduras de serpientes. Rev. Ped. Versión Online: <http://encolombia.com/medicina/pediatria/pedi37102-seroterapia.htm>.
- Otero R, Gutiérrez J, Núñez V, Robles A, Estrada R, Segura E, Toro M, García M, Díaz A, Ramírez E, Gómez G, Castañeda J, Moreno M and The Regional Group on Antivenom Therapy Research. (1996). A randomized double-blind clinical trial of two antivenoms in patients bitten by *Bothrops atrox* in Colombia. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene. 90 (696-700).
- Otero R, Núñez V, Osorio R, Gutiérrez J, Giraldo C and Posada L. (1995) Ability of six latin american antivenoms to neutralize the venom of Mapana equis (*Bothrops atrox*) from Antioquia y Chocó (Colombia). Toxicon 33, 809-815.
- Otero R, Osorio R, Valderrama R y Giraldo C (1992). Efectos farmacológicos y enzimáticos de los venenos de serpientes de Antioquia y Choco (Colombia). Toxicon 30 (5/6): 611-620.
- Okinaka S, Kumagai H, Ebashi S, Sugita H, Momoi H, Toyokura Y, Fujie Y (1961). Serum creatine phosphokinase. Activity in progressive dystrophy and neuromuscular diseases. Arch Neurol. 4: 520.
- Patiño A, Pereañez J, Núñez V, Benjumea D, Fernández M, Rucuvado A, Sanz L and Calvete J. (2010). Isolation and biological characterization of Batx-I, a weak hemorrhagic and fibrinogenolytic PI metalloproteinase from Colombian *Bothrops atrox* venom. Toxicon 56 (6): 936-43.
- Petretski J, Kanashiro M, Alves E, Silva C and Kipnis T. (2000a). Two related thrombin-like enzymes present in *Bothrops atrox* venom. Braz. J. Med. Biol. Res. 33: 1293-1300.
- Petretski J, Kanashiro M, Rodrigues F, Alves E, Machado O and Kipnis T. (2000b). Edema induction by the Disintegrin-like/Cysteine-Rich Domains from a *Bothrops atrox* Hemorrhagin. Biochem. Biophys. Res. Com. 276: 29-34.
- Pocock G and Richards C.(1999). Human Physiology The basis of medicine. 1^a edition. Great Britain Oxford University Press. Pp 569-570.
- Quintini J. (1957). Serpientes y Curanderismo. Segunda edición. Caracas, Venezuela. pp: 34-47.
- Quiroz G y Bouda J. (2007). Patología clínica del hígado. En Núñez L y Bouda J. Patología clínica veterinaria. Segunda Edición. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad Nacional Autonoma de México. pp 120-135.

- Queiroz M, Mamede C, Fonseca K, Canabrava L, Franca L, Silva M, Stanziola L, Beletti M, Canabrava H and Oliveira F. (2011). Biological characterization of a myotoxin phospholipase A₂ homologue purified from the venom of the snake *Bothrops moojeni*. *J Venon Anim Toxins Incl Trop Dis*. 17 (1): 49-58.
- Rengifo C. (2002). Accidente botrópico. "Jornadas de actualización. Manejo básico de accidentes con animales venenosos en Venezuela". Instituto de Medicina Tropical. Universidad Central de Venezuela.
- Reyes A, Aguilar L, Vargas C y Peinado A. (2009). Alteraciones histológicas en riñones de ratas, inducidas por dosis bajas del veneno de *Bothrops asper*. *REDVET*. 10 (9): 1-11.
- Rodrigues F, Petretski J, Kanashiro M, Lemos L, Dias W, Kipnis T. (2004). The complement system is involved in acute inflammation but not in the hemorrhage produced by a *Bothrops atrox* snake venom low molecular mass proteinase. *Mol. Immun.* 40: 1149-1156.
- Rodrigues V, Soares A, Andriao S, Franceschi A, Rucabado A, Gutiérrez J and Giglio J. (2001). Pathological alterations induced by neuwiedase, a metalloproteinase isolated from *Bothrops neuwiedi* snake venom. *Biochimie* 83: 471-479.
- Rodríguez-Acosta A, Mondolfi A, Orihuela A y Aguilar M. (1995) ¿Qué hacer frente un accidente ofídico?. Primera edición. Caracas. Venediciones. pp 23-29.
- Rodríguez-Acosta A, Monterrey F, Céspedes G y Finol H. (2003). Alteraciones estructurales y ultraestructurales del encéfalo ocasionados por veneno de la serpiente mapanare (*Bothrops colombiensis*). *Rev. Toxicol.* 20: 199-203.
- Rodríguez-Acosta A, Sánchez E, Márquez A, Carbajal Z, Salazar A, Girón M, Estrella A, Gil A y Guerrero B. (2010). Hemostatic properties of Venezuelan *Bothrops* snake venom with special reference to *Bothrops isabellae* venom. 56 (6) . 926-35.
- Rodríguez-Acosta A, Uzcategui W, Azuaje R, Aguilar I y Giron M. (2000). Análisis Clínico y epidemiológico de los accidentes por mordeduras de serpientes del genero *Bothrops* en Venezuela. *Rev. Cubana Med. Trop.* 52: 90-4.
- Rojas G. (2003). Producción y control de calidad de los sueros antiofídicos de Costa Rica. Jornada de Ofidismo. Panamá. www.medicina.up.ac.pa/ciimet/home.html.
- Rojas G, Gutiérrez J, Gené J, Gómez M y Cerdas L. (1987). Neutralización de las actividades toxicas y enzimáticas de cuatro venenos de serpientes de Guatemala y Honduras por el antiveneno polivalente producido en Costa Rica. *Rev. Biol. Trop.* 35 (1): 59-67.
- Rojas E, Quesada L, Arce V, Lomonte B, Rojas G and Gutierrez J. (2005). Neutralization of four peruvian *Bothrops* sp. Snake venoms by polyvalent antivenoms produced in Perú and Costa Rica: preclinical assessment. *Act. Trop.* 93: 85-95.
- Ross M, Kaye G y Pawlina W. (2005). Histología. Texto y Atlas Color con Biología Celular y molecular. Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires. pp 554-561
- Rosenfeld G. (1971). Symptomatology, pathology, and treatment of snake bites in South América. in Bücherl W and Buckley E. (Ed.) *Venomous animals and their venoms*. USA. Academic Press. pp 345-377.
- Rosenfeld G, Hampe O and Kelen E. (1959). Coagulant and fibrinolytic activity of animal venoms; determination of coagulant and fibrinolytic index of different species. *Mem. Inst. Butantan.* 29: 143-163.
- Rosing J and Tans G. (1991). Inventory of exogenous prothrombin activators. *Thromb and Haemost.* 65 (5): 627-630.

- Rucinski B, Niewiarowski S, Holt J, Soszka T and Knudsen K (1990). Batroxostatin an Agr-Gly-Asp containing peptide from *Bothrops atrox*, is a potent inhibitor of platelet aggregation and cell interaction with fibronectin. *Biochim. Biophys. Acta.* 1054: 257-262.
- Ruoslahti E and Pierschbacher M (1987). New perspectives in cell adhesion: RGD and integrins. *Science.* 238 (4826): 491-497.
- Ruiz R, Ruiz L, Zavaleta A, Salas M y Gutiérrez, J. (1993). Toxicidad y neutralización de venenos ofídicos peruanos de los géneros *Bothrops* y *Lachesis* (Serpentes: Viperidae). *Rev. Biol. Trop.* 41 (3): 351-357.
- Salina C y León J. (2007). Síndrome Compartimental. ¿Cuándo operar y cual técnica emplear? *Rev. Colomb. Ciruj. Vascul.* 7 (7): 56-63.
- Saldarriaga M, Otero R, Nuñez V, Toro M, Díaz A and Gutiérrez J. (2003). Ontogenic variability of *Bothrops atrox* and *Bothrops asper* snake venom from Colombia. *Toxicon.* 42: 405-411.
- Sánchez E, Ramírez M, Galán J, Rodríguez-Acosta A, López G and Pérez J. (2003). Cross reactivity of three antivenoms against North American snake venoms. *Toxicon.* 41: 315-320.
- Sánchez E, Rodríguez-Acosta A, Palomar R, Lucena S, Bashir S, Soto J and Pérez J. (2009). Colombistatin: a disintegrin isolated from the venom of the South American snake (*Bothrops colombiensis*) that effectively inhibits platelet aggregation and SK-Mel-28 cell adhesion. *Arch. Toxicol.* 83(3):271-9.
- Santoro M, Sano I, Fan H, Cardoso J, Theakston and Warrel D. (2008). Haematological evaluation of patients bitten by the jararaca. *Bothrops jararaca*, in Brazil. *Toxicon* 51: 1440-1448.
- Saravia P, Rojas E, Escalante T, Arce V, Chaves E, Velásquez R, Lomonte B, Rojas G and Gutiérrez J. (2001). The venom of *Bothrops asper* from Guatemala: toxic activities and neutralization by antivenoms. *Toxicon* 39: 401-405.
- Scannone H and Grillo O. (1979). Physical, chemical and biological characteristics of the venom of *Bothrops colombiensis*. *Toxicon.* 17. (Suppl. 1): 161.
- Scannone H, Grillo O y Fernández I. (1994). Estudio del veneno de *Bothrops venezuelensis*. *Acta Científica Venezolana.* 45 (1): 123.
- Segura A, Castillo M, Nuñez V, Yarlequé A, Goncalves L, Villalta M, Bonilla C, Herrera M, Vargas M, Fernández M, Yano M, Araújo H, Boller M, León P, Tintaya B, Sano-Martins I, Gómez A, Fernández G, Geoghegan P, Higashi H, León G and Gutiérrez J. (2010). Preclinical assessment of the neutralizing capacity of antivenom produced in six Latin American countries against medically-relevant *Bothrops* snake venom. *Toxicon* 56 (6): 980-989.
- Serrano S, Kim J, Wang D, Dragulev B, Shannon J, Mann H, Veit G, Wagener R, Koch M and Fox J. (2006). The cysteine-rich domain of snake venom metalloproteinases is a ligand for von Willebrand factor A domains. *J. Biol. Chem.* 281 (52): 39746-39756.
- Sifuentes D, El-Kik C, Ricardo H, Tomaz M, Strauch M, Calil S, Arruda E, Schwartz E and Melo. (2008). Ability of suramin to antagonize the cardiotoxic and some enzymatic activities of *Bothrops jararacussu* venom. *Toxicon* 51 (1): 28-36.
- Souza F, Spencer P, Rogero J, Nascimento N, Pai-Silva M and Gallacci M. (2002). ⁶⁰Co gamma irradiation prevents *Bothrops jararacussu* venom neurotoxicity and myotoxicity in isolated mouse neuromuscular junction. *Toxicon.* 40: 1101-1106.

- Stocker K. (1994). Inventory of exogenous hemostatic factors affecting the prothrombin activating pathways. *Thromb Haemost.* 71: 257-260.
- Sugiki M, Maruyama M, Yoshida E, Mihara H, Kamiguti A and Theakston D. (1995). Enhancement of plasma fibrinolysis in vitro by jararhagin, the main haemorrhagic metalloproteinase in *Bothrops jararaca* venom. *Toxicon* 33: 1605-1617.
- Tanjoni I, Evangelista K, Della M, Butera D, Magalhães G, Baldo C, Clissa P, Fernández I, Eble J, Moura A. (2010). Different regions of the class P-III snake venom metalloproteinase jararhagin are involved in binding to alpha 2 beta 1 integrin and collagen. *Toxicon* 55 (6): 1093-9.
- Teibler P, Acosta O, Maruñak S, Ruiz R, Koscinczuk P, Sánchez M, Mussart N. (1999) Lesiones locales y sistémicas inducidas por veneno de *Bothrops alternatus* (víbora de la cruz) de Argentina. *Acta Toxicol. Argent.* 7 (1): 7-10.
- Teng M and Huang T (1991). Inventory of exogenous inhibitors of platelet aggregation. *Tromb. Haemost.* 65 (5): 624-626.
- Theakston R and Reid H.(1983). Development of simple standard assay procedures for the characterization of snake venom. *Bull. Wld. Hlth. Org.* 61: 949-956.
- Theakston R, Warrell D and Griffiths E. (2003). Report of a WHO workshop on the standardization and control of antivenoms. *Toxicon.* 41: 541-557.
- Toyama M, Soares A, Andriao S, Novello J, Oliveira B, Giglio J, Fontes M and Marangoni S. (2001). Comparative biochemical studies of myotoxic phospholipase A₂ from *Bothrops* venom. *Prot. Pept. Lett.* 8 (3): 179-186.
- Trebién H and Calixto J. (1989). Pharmacological evaluation of rat paw oedema induced by *Bothrops jararaca* venom. *Agents Actions.* 26: 292-300.
- Tu A. (1977). *Venoms: chemistry and molecular biology.* USA. A Wiley-Interscience Publication. pp 5-346.
- Vargas A, Scannone H, Fernandez I y Fernandez N (1996). Estudio comparativo de los venenos de *Bothrops atrox* provenientes del estado Bolívar (Pauji) y estado Amazonas (Puerto Ayacucho) (II). *Acta Científica Venezolana.* 47 (Sup. 1): 111.
- Ward K y Cockayne S. Enzimología. En Anderson S y Cockayne S. (1993). *Química Clínica.* Editorial Interamericana Mc Graw-Hill. México. pp 241-281.
- World Health Organization. (1981). *Progress in the characterization of venoms and standardization of antivenoms.*
- Yamakawa M, Nozaki M and Hokama Z. (1976). Fractionation of sakishima habu (*Trimeresurus elegans*) venom and lethal, hemorrhagic and edema-forming activities of the fractions. In: Ohsaka A, Hayashi and Sawai (Eds.). *Animal, plant and microbial toxins, vol I.* Plenum Press. New York. pp. 97-109.
- Yang C and King K. (1980). Clinical modification of the histidine residue in phospholipase A₂ from the *Hemachatus haemachatus* snake venom. *Toxicon.* 18: 529-547.
- Zeni L. B, Becker A, Krug M and Albuquerque A. (2007). Histological and biochemical effects induced by sublethal doses of *Bothrops jararacussu* venom in mice. *J. Venom. Anim. Toxins. Incl. Trop. Dis.* 13 (3): 664-676.

ANEXOS

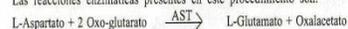


Stanbio AST/SGOT (Liqui-UV®) Procedimiento No. 2920

Para la determinación Cinética cuantitativa de la AST/SGOT en suero, para procedimientos Manuales o Automatizados.

Resumen y Principios

El aspartato de aminotransferasa (AST), es una de varias enzimas que catalizan el intercambio de grupos amino y oxo entre alfa-amino ácidos y alfa-oxoácidos. Está ampliamente distribuida en los tejidos corporales con mayor cantidad de AST como el corazón e hígado.¹ Los que está pero con menor cantidad de AST son el músculo esquelético, riñones, páncreas, vaso, pulmones y cerebro. El daño a estos tejidos de como resultado una liberación de la enzima AST a la circulación general. En el infarto del miocardio, la AST sérica, puede empezar a incrementarse dentro de las 6 - 8 horas después del ataque, por dos días y vuelve a la normalidad para el cuarto ó quinto día después del infarto.² En enfermedades como hepatitis, cirrosis y metástasis en hígado, se han entrado también incrementos en las concentraciones séricas de AST.³ Karmen⁴ fue el primero en reportar un método cinético para medir la actividad de AST en suero. Subsecuentemente el método ha sido actualizado y optimizado por Bergmeyer et al.⁵ El método de Stanbio para medir AST, es similar al método recomendado por la Federación Internacional de Química Clínica.⁶ Las reacciones enzimáticas presentes en este procedimiento son:



La AST, cataliza la transferencia del grupo amino entre el L-Aspartato y el 2 Oxo-glutarato. El Oxalacético formado en la primera reacción, va a reaccionar con el NADH en presencia de malato deshidrogenasa (MDH) para formar NAD. La actividad de AST se determina midiendo el valor total de oxidación del NADH a 340nm. La lactato deshidrogenasa se incluye en el reactivo para convertir al piruvato endógeno de la muestra a lactato, durante la fase lag anterior a la medición.

Reactivos

AST Buffer (R1), Ref. No. 2921

Composición:	
Tris, pH 7.5	80 mmol/L
L-Aspartato	240 mmol/L
MDH (músculo de porcino)	600 U/L
LDH (músculo de conejo)	600 U/L

Enzima AST (R2), Ref. No. 2922

Composición:	
2-Oxoglutarato	12 mmol/L
NADH (Sal Disodio)	0.18 mmol/L

Precauciones: Los reactivos son para uso de diagnóstico in vitro. Precauciones normales en el manejo de los reactivos en el laboratorio deberán ser seguidas. Los reactivos contienen azide de sodio que puede ser tóxico si se ingiere. El azide de sodio también puede reaccionar con el plomo y cobre de las cañerías formando metales azide altamente explosivos. Referirse a las hojas de Materiales de seguridad para estar al tanto de la información de seguridad y riesgos.

Preparación del Reactivo: Los reactivos líquidos de buffer y enzima, son suministrados ya listos para su uso. Prepare el reactivo con el que trabajara a razón de 5 partes de buffer (R1) y 1 de enzima (R2) (ej: 25 mL de buffer y 5 mL de enzima)

Almacenamiento y Estabilidad del Reactivo: El reactivo se mantiene estable hasta la fecha de expiración que esta en la etiqueta y cuando se almacena adecuadamente de 2 a 8°C y protegido contra la luz.

Los reactivos deben verse claro y sin color. Deseche si alguno aparece turbio o si contiene partículas de materia. El reactivo a utilizar, esta estable por 4 semanas si se mantiene de 2 a 8°C o 5 días a temperatura ambiente (de 15 a 30°C). El reactivo para trabajar, debiera ser desechado si la absorbancia inicial, leída contra el agua destilada a 340 nm., esta bajo de 0.800.

Materiales Requeridos Pero No Incluidos

Espectrofotometro capaz de leer absorbancias a 340 nm y 1 cm para paso de luz • Baño María (37°C) o celdillas de temperatura controlada • Pipetas capaces de medir exactamente • Tubos de prueba • Cronometro

Recolección y Preparación de la Muestra

Un suero claro y no hemolizado libre de hemolisis, debiera ser utilizado. Siempre que sea posible, los especímenes deben ser separados y analizados el día que se recolectan. El suero AST es relativamente estable por un mínimo de 7 días, si la muestra es refrigerada (de 2 a 8°C). Guarde el suero en tubos bien tapados.

Interferencia de Sustancias: La hemólisis debe ser evitada porque la concentración de AST en las células rojas excede 10 veces la del suero. Ciertas drogas y otras sustancias también se conoce que afectan los valores del AST. Los niveles de Bilirrubina arriba de 40mg/dL y los de triglicéridos hasta 2000 mg/dL, no muestran interferencia en esta prueba.

Procedimiento Automatizado

Adaptaciones especiales para analizadores automatizados estan disponibles solo contactando con el Departamento de Servicio al Cliente de Stanbio.

Procedimiento Manual

1. Prepare el reactivo de AST con la que va a trabajar de acuerdo a las instrucciones.
2. Calibre el cero del espectrofotometro a 340 nm con agua destilada.
3. Para cada muestra y control, anada 1.0 mL del reactivo dentro de la cubeta o en un tubo de prueba e incube por 3 minutos a 37°C.
4. Agregue 100µL (0.100 mL) de suero a sus respectivos tubos y mezcle suavemente.
5. Lea y anote el cambio en la absorbancia cada minuto. Continúe incubando a 37°C y anote los cambios en la absorbancia nuevamente a 2 y 3 minutos. Los valores deberan ser constantes.
6. Determine el promedio de la absorbancia por minuto (A/Min), multiplíquelos por el factor 1746 para obtener resultados en U/L.

NOTA: Si la cubeta no tiene temperatura controlada, incube las muestras a 37°C entre cada lectura.

Control de calidad: El control de suero normal Ser-T-Fy® I, Cat. No. G427-86 y el control de suero anormal Ser-T-Fy® II, Cat. No. G428-86 son recomendables para verificar precision y exactitud. Otros controles comerciales disponibles con valores de AST ensayados por este metodo son tambien convenientes. La actividad de la AST determinada en esos materiales, por este procedimiento, debiera caer dentro de los rangos fijados para los controles. Dos niveles de controles deben ser analizados cada día que se prueben.

Calibración: La actividad de la AST, se basa en "un coeficiente de extincion micromolar" de NADH a 340 nm (vea la seccion de "Resultados"). La guia de calibracion del instrumento por el fabricante, debe ser seguido para calibrar su analizador.

Resultados

Los valores se derivan en base al "coeficiente de extincion de absorptividad micromolar" de NADH 340 nm (0.0063). La actividad en unidades por litro (U/L) de AST/SGOT, es la cantidad de enzima que produce 1 nmol/L de NADH por minuto.

$$U/L = \Delta \text{Min/Absorptividad} \times \text{Volumen total/Volumen de la muestra}$$

$$U/L = \Delta A / \text{Min} \cdot 0.0063 \times 1.100 / 0.100$$

$$U/L = \Delta A / \text{Min} \times 1746$$

Limitaciones

Si el $\Delta A/\text{Min}$. es mayor de .342, diluya una parte de la muestra con 9 partes de salina isotonica y vuelva a probar. Multiplique los resultados por 10.

Valores Esperados¹⁰

El Rango normal (en adultos): 8-33 U/L (37°C)

Este rango unicamente debe servir como guia. Se recomienda que cada laboratorio establezca sus propios rangos de valores esperados, ya que existen diferencias entre instrumentos, laboratorios y la poblacion local.

Características⁸

Comparación: Un grupo de 62 sueros dentro de un rango de actividad AST de 12 a 463 U/L, fueron probados por el metodo AST descrito y por un reactivo comercial similar disponible. Al comparar resultados se produjo un coeficiente de correlacion de 0.993 y la ecuacion de regresion fue $y=0.988x + 0.43$. (Otros estudios comparativos fueron realizados de acuerdo con las guias tentativas de la NCCLS, EP9-T.)

Precisión: Dentro de una corrida, la precision fue establecida por 20 pruebas en 3 diferentes niveles de sueros de controles comerciales. Valores totales de precision se obtuvieron probando 3 controles comerciales por 5 dias seguidos.

	Durante de una corrida		
	Suero 1	Suero 2	Suero 3
Media AST (U/L)	25	51	116
Desv. Std (U/L)	0.8	1.6	0.9
C.V. (%)	3.3	3.1	0.8

	Precisión Total		
	Suero 1	Suero 2	Suero 3
Media AST (U/L)	26	49	115
Desv. Std (U/L)	1.1	0.7	0.8
C.V. (%)	4.4	1.4	0.7

Estudios de precision fueron realizados de acuerdo con las guias tentativas de la NCCLS, EPS-T.

Linealidad: Es lineal a 600 U/L y a 37°C. Llevado a cabo de acuerdo a las guias EP6-P de la NCCLS.

Sensitividad: Esta basada en la resolucio de un instrumento de $A=0.001$, el metodo presentado muestra una sensibilidad de 1.75 U/L.

Referencias

1. Wilkinson JH. Principles and Practice for Diagnosis Enzymology. Year Book Medical Publishers, 1976
 2. Kacchauer JR. Enzymes. In Fundamentals of Clinical Chemistry, NW Tietz, Editor, Saunders, Philadelphia, 1976, p 674.
 3. Sacks HJ, Lanzhanin GF. An elevation of serum transaminase in the jaundice state. Am J Clin Pathol 33:97, 1960
 4. Karmen A: A note on the spectrophotometric assay of glutamic-oxalacetic transaminase in human blood. J Clin Invest 34:131, 1955
 5. Bergmeyer HU, Schober P, Wählefeld AW. Optimization of methods for aspartate aminotransferase and alanine aminotransferase. Clin Chem 24: 58, 1978.
 6. Expert Panel of Enzymes of the International Federation of Clinical Chemistry: Part 3. Revised IFCC method for aspartate aminotransferase. Clin Chem 24:720, 1978.
 7. Demetrios JA et al. In Clinical Chemistry - Principles and Techniques 2nd ed. RJ Henry et al. Eds. Harper & Row, Hagerstown MD, 1974, p 873.
 8. International Federation of Clinical Chemistry. Provisional Recommendations on IFCC Methods for the Measurement of Catalytic Concentrations of Enzymes. Clin Chem 23: 887, 1977.
 9. Young D.S. Effects of drugs on clinical laboratory tests. AACN Press, Washington D.C., 1990
 10. Henry JB. Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods, 17th ed. WB Saunders Co., 1984, p 1437.
 11. Stanbio Laboratory Data
- Para asistencia tecnica llame: 800-531-5535 • (830) 249-0772
Fax (830) 249-0851 • e-mail: stanbio@stanbio.com
http://www.stanbio.com
Stanbio Laboratory • 1261 North Main Street • Boerne, Texas 78006
DN: RBR.2920CE.02 • Last Revision: 07/04 • Procedure No. 2920CE





Stanbio ALT/SGPT (Liqui-UV®) Procedimiento No. 2930

Para la determinación Cinética cuantitativa de la ALT/SGPT en suero, para procedimientos Manuales o Automatizados.

Resumen y Principios

La enzima alanina aminotransferasa (ALT), es reportada en una amplia variedad de tejidos. La principal fuente de ALT, es de origen hepático y su determinación se ha aplicado para el estudio de enfermedades hepáticas. Niveles séricos elevados se hallan en hepatitis, cirrosis e ictericia obstructiva. En los pacientes que han sufrido infarto del miocardio, los niveles de ALT están solo, ligeramente elevados.¹

Los métodos UV para la determinación de ALT, fueron primeramente desarrollados por Wroblewski y LaDue en 1956.² El método se basó en la oxidación del NADH por medio de la Lactato deshidrogenasa (LDH). En 1980, la Federación Internacional de Química Clínica (IFCC), recomendó un procedimiento de referencia para la determinación de ALT, basado en el método de Wroblewski y LaDue. El reactivo ALT se ajusta a la formulación recomendada por los métodos de la IFCC³ y de Bergmeyer.⁴



La Alanina aminotransferasa (ALT), cataliza la transferencia del grupo amino, desde una Alanina hasta un 2-oxoglutarato, para formar Glutamato y Piruvato. El Piruvato formado en la primera reacción, se reduce a lactato, en presencia de LDH y NADH. La actividad del ALT, se determinó midiendo el valor total de oxidación del NADH a 340 nm.

Reactivos

ALT Buffer (R1), Cat. No. 2931

Composición:	
Tris, pH 7.5	100 mmol/L
L-Alanina	500 mmol/L
LDH (músculo de conejo)	1200 U/L

Enzima ALT (R2), Cat. No. 2932

Composición:	
2-Oxoglutarato	15 mmol/L
NADH (Sal Disodio)	0.18 mmol/L

Precauciones: Los reactivos son para uso de diagnóstico in vitro. Precauciones normales en el manejo de los reactivos en el laboratorio deberán ser seguidas. Los reactivos contienen azide de sodio que puede ser tóxico si se ingiere. El azide de sodio también puede reaccionar con el plomo y cobre de las cañerías formando metales azide altamente explosivos. Refiérase a las hojas de Materiales de seguridad para estar al tanto de la información de seguridad y riesgos.

Preparación del Reactivo: Los reactivos líquidos de buffer y enzima, son suministrados ya listos para su uso. Prepare el reactivo con el que trabajara a razón de 5 partes de buffer (R1) y 1 de enzima (R2) (ej: 25 mL de buffer y 5 mL de enzima)

Almacenamiento y Estabilidad del Reactivo: El reactivo se mantiene estable hasta la fecha de expiración que esta en la etiqueta y cuando se almacena adecuadamente de 2 a 8°C y protegido contra la luz. Los reactivos deben verse claro y sin color. Desechelo si alguno aparece turbio o si contiene partículas de materia.

El reactivo a utilizar, esta estable por 4 semanas si se mantiene de 2 a 8°C o 5 días a temperatura ambiente (de 15 a 30°C). El reactivo para trabajar, debera ser desechado si la absorbancia inicial, leida contra el agua destilada a 340 nm., esta bajo de 0.800.

Materiales Requeridos Pero No Incluidos

Espectrofotometro capaz de leer absorbancias a 340 nm y 1 cm para paso de luz • Baño María (37°C) o celdillas de temperatura controlada • Pipetas capaces de medir exactamente • Tubos de prueba • Cronometro

Recolección y Preparación de la Muestra^{2,5,6,8}

El suero no hemolizado, es la muestra de elección. Siempre que sea posible, los especimenes deben ser separados y analizados el día que se recolectan. Guarde el suero en tubos bien tapados. Cerca de 10% del ALT se pierde en 3 días a 4°C ó en un día a 25°C.

Interferencia de Sustancias: La hemólisis debe ser evitada porque la concentración de ALT en las células rojas excede 10 veces la del suero. Ciertas drogas y otras sustancias también se conoce que afectan los valores del ALT. Los niveles de Bilirubina arriba de 40mg/dL y los de triglicéridos hasta 2000 mg/dL, no muestran interferencia en esta prueba.

Procedimiento Automatizado

Adaptaciones especiales para analizadores automatizados estan disponibles solo contactando con el Departamento de Servicio al Cliente de Stanbio.

Procedimiento Manual

1. Prepare el reactivo de ALT con la que va a trabajar de acuerdo a las instrucciones.
 2. Calibre el cero del espectrofotometro a 340 nm con agua destilada.
 3. Para cada muestra y control, anada 1.0 mL del reactivo dentro de la cubeta o en un tubo de prueba e incube por 3 minutos a 37°C.
 4. Agregue 100µL (0.100 mL) de suero a sus respectivos tubos y mezcle suavemente.
 5. Lea y anote el cambio en la absorbancia cada minuto. Continúe incubando a 37°C y anote los cambios en la absorbancia nuevamente a 2 y 3 minutos. Los valores deberan ser constantes.
 6. Determine el promedio de la absorbancia por minuto (A/Min), multiplíquelos por el factor 1746 para obtener resultados en U/L.
- NOTA:** Si la cubeta no tiene temperatura controlada, incube las muestras a 37°C entre cada lectura.

Control de calidad: El control de suero normal Ser-T-Fy* I, Cat. No. C427-86 y el control de suero abnormal Ser-T-Fy* II, Cat. No. C428-86 son recomendables para para verificar precisión y exactitud. Otros controles comerciales disponibles con valores de ALT ensayados por este metodo son tambien convenientes. La actividad de la ALT determinada en esos materiales, por este procedimiento, debera caer dentro de los rangos fijados para los controles. Dos niveles de controles deben ser analizados cada día que se prueben.

Calibración: La actividad de la ALT, se basa en "un coeficiente de extinción micromolar" de NADH a 340 nm (vea la seccion de "Resultados"). La guía de calibración del instrumento por el fabricante, debe ser seguido para calibrar su analizador.

Resultados

Los valores se derivan en base al "coeficiente de extinción de absorptividad micromolar" de NADH 340 nm (0.0063). La cantidad de enzima que produce 1 nmol/L de NADH por minuto

$$U/L = \Delta A / \text{Min} / \text{Absorptividad} \times \text{Volumen total} / \text{Volumen de la muestra}$$

$$U/L = \Delta A / \text{Min} / 0.0063 \times 1.100 / 0.100$$

$$U/L = \Delta A / \text{Min} \times 1746$$

Limitaciones

Si el $\Delta A / \text{Min}$ es mayor de 342, diluya una parte de la muestra con 9 partes de salina isotónica y vuelva a probar. Multiplique los resultados por 10.

Valores Esperados⁹

El Rango normal (en adultos): 3 - 35 U/L (37°C)

Este rango unicamente debe servir como guía. Se recomienda que cada laboratorio establezca sus propios rangos de valores esperados, ya que existen diferencias entre instrumentos, laboratorios y la población local.

Características

Comparación: Un grupo de 82 sueros dentro de un rango de actividad ALT de 3 a 682 U/L, fueron probados por el metodo ALT descrito y por un reactivo comercial similar disponible. Al comparar resultados se produjo un coeficiente de correlación de 0.999 y la ecuación de regresion fue $y = 0.988x + 0.43$. (Otros estudios comparativos fueron realizados de acuerdo con las guías tentativas de la NCCLS, EP9-T.)

Precisión: Dentro de una corrida, la precisión fue establecida por 20 pruebas en 3 diferentes niveles de sueros de control comerciales. Valores totales de precisión se obtuvieron probando 3 controles comerciales por 5 días seguidos.

	Durante de una corrida		
	Suero 1	Suero 2	Suero 3
Media ALT (U/L)	22	45	102
Desv. Std (U/L)	1.4	1.2	1.0
C.V. (%)	6.2	2.6	1.0

	Precisión Total		
	Suero 1	Suero 2	Suero 3
Media ALT (U/L)	23	43	99
Desv. Std (U/L)	0.7	0.7	0.9
C.V. (%)	3.1	1.6	0.9

Estudios de precisión fueron realizados de acuerdo con las guías tentativas de la NCCLS, EP9-T.

Linealidad: Es lineal a 600 U/L y a 37°C. Llevado a cabo de acuerdo a las guías EP9-P de la NCCLS.

Sensibilidad: Esta basada en la resolución de un instrumento de A=0.001, el metodo presentado muestra una sensibilidad de 2.0 U/L.

Referencias

1. Henry, J.B.: Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods, W.B. Saunders and Co., Philadelphia, PA, p-332-335 (1974)
2. Wroblewski, F. and LaDue, J.S. Proc. Soc. Exper. Biol. and Med. 91:569 (1956)
3. International Federation of Clinical Chemistry, Provisional Concentrations of Enzymes. Clin Chem 23: 887, 1977.
4. Bergmeyer HU, Scheibe P, Wahlefeld AW: Optimization of methods for aspartate aminotransferase and alanine aminotransferase. Clin Chem 24: 58, 1978.
5. Bergmeyer, H.U. Principles of Enzymatic Analysis. Verlag Chem, 1978.
6. Young D.S. Effects of drugs on clinical laboratory tests. AACCPress, Washington D.C., 1990
7. Henry J.B. Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods, 17th ed. WB Saunders Co., 1984, p 1437.
8. Stanbio Laboratory Data

Para asistencia técnica llame: 800-531-5535 • (830) 249-0772
Fax (830) 249-0851 • e-mail: stanbio@stanbio.com
http://www.stanbio.com
Stanbio Laboratory • 1261 North Main Street • Boerne, Texas 78006
DN: RBR.2930CE.01 • Last Revision: 01/04 • Procedure No. 2930CE





Stanbio CK, Liqui-UV® (NAC) Procedure No. 2910

For the Kinetic Quantitative Determination of Creatine Kinase in Serum

Summary and Principle

Serum creatine kinase (CK) levels have proven valuable in the assessment of cardiac and skeletal muscle diseases, including myocardial infarction and muscular dystrophy.¹ Determination of creatine kinase and lactate dehydrogenase isoenzymes provides a definitive diagnosis of acute myocardial infarction.²

The kinetic procedure presented is a modification of Szasz³ of the Rosalki⁴ technique, which optimizes the reaction by reactivation of CK activity with N-acetyl-L-cysteine (NAC).

CK specifically catalyzes the transphosphorylation of ADP to ATP. Through a series of coupled enzymatic reactions, NADPH is produced at a rate directly proportional to the CK activity. The method determines NADPH absorbance increase per min at 340 nm.

Reagents

CK Buffer Reagent (R1), Cat. No. 2911

Contents:

Imidazole Buffer (pH 6.7)	100.0	mmol/L
NADP	2.0	mmol/L
HK (Baker's yeast)	2.5	KU/L
Glucose	20.0	mmol/L
Magnesium Acetate	10.0	mmol/L
EDTA	2.0	mmol/L
N-acetylcysteine (NAC)	20.0	mmol/L

CK Enzyme Reagent (R2), Cat. No. 2912

Contents:

Imidazole Buffer (pH 6.7)	100.0	mmol/L
ADP	2.0	mmol/L
AMP	5.0	mmol/L
Diadenosine pentaphosphate	10.0	μmol/L
Creatine phosphate	30.0	mmol/L
G6P-DH (Baker's yeast)	1.5	kU/L
EDTA	2.0	mmol/L

Precautions: The reagents are for "In Vitro Diagnostic Use". Normal precautions exercised in handling laboratory reagents should be followed. The reagents contain sodium azide which may be toxic if ingested. Sodium azide may also react with lead and copper plumbing to form highly explosive metal azides. Refer to Material Safety Data Sheet for any updated risk, hazard or safety information.

Reagent Preparation: Enzyme and Buffer liquid reagents are supplied ready-to-use. Prepare Working Reagent in the ratio of 1 part Enzyme Reagent to 4 parts Buffer Reagent (i.e., 6 mL Enzyme and 24 mL Buffer).

Reagent Storage and Stability: Reagents are stable until the expiration date on their respective labels, when properly stored at 2-8°C and protected from light. Reagents should appear clear and colorless. Discard if either appears cloudy or contains particulate matter. The Working Reagent is stable for 3 weeks at 2-8°C or 2 days at room temperature (15-30°C).

Materials Required But Not Provided

Spectrophotometer capable of absorbance readings at 340 nm and 1 cm lightpath

Constant temperature block or bath, 37°C, or temperature controlled cuvet well

Accurate pipetting devices Test tubes Interval timer

Specimen Collection and Storage

Clear unhemolyzed serum is the specimen of choice. No special additives or preservatives are required. Whenever possible specimens should be separated and analyzed on the day of collection. Store serum in stoppered tubes. CK activity in serum is reportedly stable for three days at 2-8°C. Addition of sulfhydryl agents preserves CK activity during prolonged storage.^{5,6} Some control sera, however, show a considerable decrease in CK activity only a few hours after reconstitution.

Interfering Substances: Intramuscular injections and strenuous physical exercise may elevate serum CK. Chloride and sulfate inhibit CK activity. Bilirubin levels up to 40 mg/dL and triglyceride levels up to 2000 mg/dL show no interference in this test.⁷ Young et al.⁸ have reviewed drug effects on serum CK levels.

Manual Procedure

1. Prepare CK Working Reagent according to instructions.
2. Zero spectrophotometer at 340 nm with distilled water.
3. For each sample and control, add 1.0 mL Working Reagent to cuvet or test tube and warm to 37°C for 4 minutes.
4. Add 0.05 mL (50 μL) sample to its respective tube and mix gently.
5. Read and record absorbance at 2 minutes. Continue incubating at 37°C and record absorbance again at 3 and 4 minutes. Rate should be constant.
6. Determine the average absorbance per minute (ΔA/min), multiply by factor 3376 for results in U/L.

NOTE: If cuvet is not temperature controlled, incubate samples at 37°C between readings.

Quality Control: Stanbio Ser-T-Fy® I, Normal Control Serum, Cat. No. G427-86 and Stanbio Ser-T-Fy® II, Abnormal Serum, Cat. No. G428-86 are recommended for each run. Other commercially available controls with CK values assayed by this method are also suitable. CK activity determined in these materials, by this procedure should fall within the ranges stated for the controls. Two levels of controls should be analyzed with each run.

Calibration: CK activity is based on the "micromolar extinction coefficient" of NADP at 340 nm (see "Results" section). The instrument manufacturer's calibration guidelines should be followed to calibrate your analyzer. Assaying the CK contents of a control serum with known CK values can be used to assure instrument calibration has been performed correctly.

Results

Values are derived based on the "absorptivity micromolar extinction coefficient" of NADP at 340 nm (0.00622). A unit per liter (U/L) of CK activity is that amount of enzyme which oxidizes one μmol of NADP per minute.

$$U/L = \frac{\Delta A/Min}{0.00622} \times \frac{1.05}{0.05}$$

$$U/L = \frac{\Delta A/Min}{0.00622} \times \frac{Total\ Volume}{Sample\ Volume}$$

$$U/L = \Delta A/Min \times 3376$$

Limitations

If the ΔA/min. is greater than 0.345, dilute 1 part sample with 9 parts saline and re-assay. Multiply the results by 10. CK values for neonatal patients have not been established with this procedure.

Expected Values⁹

Normal Range:	Male:	38 - 174 U/L (37°C)
	Female:	26 - 140 U/L (37°C)

The range should serve only as a guideline. It is recommended that each laboratory establish its own range of expected values, since differences exist between instruments, laboratories, and local populations.

Performance Characteristic⁹

Comparison: A group of 77 sera ranging in CK activity from 3 - 700 U/L was assayed by the described CK method and by a similar commercially available CK reagent. Comparison of the results yielded a correlation coefficient of 0.999 and the regression equation was $y = 1.027x - 0.65$. (Comparison studies were performed according to NCCLS Tentative Guideline, EP9-T).

Precision: Within-run precision was established by 20 assays on three different levels of commercial controls. Total Precision values were obtained by assaying 3 commercial controls for 5 consecutive days.

	Within-Run		
	Serum 1	Serum 2	Serum 3
Mean CK (U/L)	159	220	508
Std. Deviation (U/L)	3.2	1.5	3.7
C.V. (%)	2.0	0.7	0.7

	Total Precision		
	Serum 1	Serum 2	Serum 3
Mean CK (U/L)	50	157	228
Std. Deviation (U/L)	1.1	1.6	2.3
C.V. (%)	2.1	1.0	1.0

Precision studies were performed according to NCCLS Tentative Guideline, EP5-T. **Linearity:** Linear from 1 to 1200 U/L at 37°C. Performed according to NCCLS Guideline EP6-P.

Sensitivity: Based on an instrument resolution of $\Delta A = 0.001$, the method presented shows a sensitivity of 1.0 U/L.

References

1. Kachmar JF, Moss DW. In Fundamentals of Clinical Chemistry, 2nd ed. NW Tietz, Editor. W.B. Saunders, Philadelphia, 1976, p 682.
2. Row CR et al. J Lab Clin Med 80:557, 1972.
3. Szasz G. Proceedings of the Second International Symposium on Clinical Enzymology, Chicago, October 1975.
4. Rosalki SB. J Lab Clin Chem 23:646, 1977.
5. Morin LG. Clin Chem 23:646, 1977.
6. Nealon DA, Henderson AR. Clin Chem 23:646, 1977.
7. Young DS et al. Clin Chem 21:2860, 1975 (Special Issue).
8. Tietz, Norbert W., Clinical Guide To Laboratory Tests, W.B. Saunders Company, Philadelphia, PA., (1995), p180.
9. Stanbio Laboratory Data

STANBIO LABORATORY, LP DISCLAIMS ALL EXPRESS AND IMPLIED WARRANTIES OF THE MERCHANTABILITY AND FITNESS PERTAINING TO THIS PRODUCT WHICH ARE NOT EXPRESSLY DETAILED IN THIS PACKAGING INFORMATION OR A WRITTEN AGREEMENT BETWEEN THE BUYER AND SELLER OF THIS PRODUCT. STANBIO LABORATORY, LP MAINTAINS THAT THIS PRODUCT CONFORMS TO THE INFORMATION CONTAINED IN THIS INSERT. PURCHASER MUST DETERMINE THE SUITABILITY OF THE PRODUCT FOR ITS PARTICULAR USE.

USE ONLY IN ACCORDANCE WITH LABELING INSTRUCTIONS.

For Technical Service call: 800-531-5535 • (830) 249-0772

Fax (830) 249-0851 • e-mail: stanbio@stanbio.com

http://www.stanbio.com

Stanbio Laboratory • 1261 North Main Street • Boerne, Texas 78006

DN: RBR.2910.02 • Last Revision: 02/05 • Procedure No. 2910





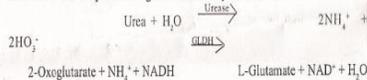
Stanbio Urea Nitrogen (BUN) Liqui-UV® Procedure No. 2020

For the Kinetic Quantitative Determination
of Urea Nitrogen (BUN) in Serum

Summary and Principle

Urea is the principle waste product of protein catabolism. It is synthesized in the liver from ammonia which is produced as a result of the deamination of amino acids. Normally, urea nitrogen in the blood comprises only about 45% of the non-protein nitrogen. The importance of urea nitrogen determination is its value as an indicator of liver and kidney functions. Decreases in Blood Urea Nitrogen (BUN) are seen with nephritis, acute liver destruction, amyloidosis and pregnancy.¹ Increases in BUN are encountered with acute and chronic nephritis, intestinal and urinary obstruction, uremia, metallic poisoning, pneumonia, Addison's Disease, peritonitis, surgical shock and cardiac failure.

The Stanbio BUN procedure is a modification of the method described by Sampson.¹ Urea is catalytically converted to ammonium carbonate by the use of urease. The reaction rate is dependent upon the concentration of the influence of glutamic dehydrogenase. The rate of this second reaction is dependent upon the first and can be measured by the rate of conversion of NADH to NAD by the change of absorbance at 340 nm.



Reagent

BUN Buffer (R1), Ref. No. 2021

Composition:

Tris, pH 7.8	120 mmol/L
2-Oxoglutarate	7.0 mmol/L
ADP (monosodium salt)	0.6 mmol/L
Urease (Jack Bean)	60000 U/L
G.L.D.H (Baker's yeast)	10000 U/L

BUN Enzyme (R2), Ref. No. 2022

Composition:

NADH (Disodium salt)	0.25 mmol/L
----------------------	-------------

BUN Standard - 30 mg/dL, Ref. No. 1022

Aqueous solution of urea in addition to trace amounts of stabilizers. Standard is referenced against NIST material.

Precautions: The reagents are for "In Vitro Diagnostic Use". Normal precautions exercised in handling laboratory reagents should be followed. The reagents contain sodium azide which may be toxic if ingested. Sodium azide may also react with lead and copper plumbing to form highly explosive metal azides. Refer to Material Safety Data Sheet for any updated risk, hazard or safety information.

Reagent Preparation: Buffer and Enzyme liquid reagents are supplied ready-to-use. Prepare Working Reagent in the ratio of 5 parts Buffer (R1) to 1 part Enzyme (R2), (i.e., 25 mL Buffer and 5 mL Enzyme). Before use allow to stand for at least 30 minutes at room temperature (15-25°C).

Reagent Storage and Stability: Reagents are stable until the expiration date on their respective labels, when properly stored at 2-8°C and protected from light. Reagents should appear clear and colorless. Discard if either appears cloudy or contains particulate matter. The Working Reagent is stable for 4 weeks at 2-8°C or 5 days at room temperature (15-25°C). Protect the reagent from direct light. The Working Reagent should be discarded if the initial absorbance, read against distilled water at 340 nm, is below 1.000.

Material Required But Not Provided

Spectrophotometer capable of absorbance reading at 340 nm
Constant temperature block or bath, 37°C, or temperature controlled cuvet
Accurate pipetting devices Test tubes Interval timer

Specimen Collection and Storage

Non-hemolyzed serum is the specimen of choice. Whenever possible specimens should be separated and analyzed on the day of collection. Anticoagulants containing ammonium or fluoride salts must be avoided.² Urea in serum is stable for up to 24 hours at room temperature (15-25°C), several days refrigerated at 2-8°C and for at least 2-3 months when frozen (-20°C). Bilirubin levels up to 40 mg/dL, hemoglobin levels up to 200mg/dL and triglyceride levels up to 2000 mg/dL show no interference in this test.³

Interfering Substances: In addition to hemolysis, fluoride at elevated concentrations and ammonia can cause interferences.³

Manual Procedure

1. Prepare BUN Working Reagent according to instructions.
2. Zero spectrophotometer at 340 nm with distilled water.
3. For each sample and control, add 1.0 mL Working Reagent to cuvet or test tube and warm to 37°C for 3 minutes.
4. Add 10 µL (0.010 mL) serum to its respective tube and mix gently.
5. After exactly 30 seconds read and record absorbance (A₁).
6. At exactly 60 seconds after reading (A₁), read and record absorbance (A₂).
7. Calculate change in absorbance (ΔA) by subtracting (A₂-A₁).
8. Run patients and controls by following steps 4 through 7.

NOTE: If cuvet is not temperature controlled, incubate samples at 37°C between readings.

Quality Control: Stanbio Ser-T-Fy* I, Normal Control Serum, Cat. No. G427-86 and Ser-T-Fy* II, Abnormal Control Serum, Cat. No. G428-86 are recommended for each run. Other commercially available controls with BUN values assayed by this method are also suitable. BUN activity determined in these materials, by this procedure should fall within the ranges stated for the controls. Two levels of controls should be analyzed with each run.

Calibration: Calibration is required. The instrument manufacturer's calibration guidelines should be followed to calibrate your analyzer.

Results

Values are derived by comparing the absorbance change(ΔA) of the unknown (u) with that of a standard (s) identically treated.

$$\text{Serum BUN (mg/dL)} = \frac{\Delta A_u}{\Delta A_s} \times 30$$

Where Au and As are the absorbance changes (decrease) of unknown and standard, respectively, and 30 the concentration of standard (mg/dL)

$$\text{Example: } \Delta A_u = 0.045, \Delta A_s = 0.090$$

$$\text{Serum BUN (mg/dL)} = \frac{0.045}{0.090} \times 30 = 15$$

Limitations

If the BUN value exceeds 140 mg/dL the specimen should be diluted 2-fold (1+1) with distilled water, the assay repeated and results multiplied by the dilution factor of 2. BUN values for neonatal patients have not been established with this procedure.

Expected Values³

Normal Range:	BUN	8 - 23 mg/dL
	Urea	17 - 49 mg/dL
	Urea (mg/dL) =	BUN (mg/dL) x 2.14
	Urea (mmol/L) =	Urea(mg/dL) x 0.167

This range should serve only as a guideline. It is ultimately the responsibility of the laboratory to establish its own range of expected values, since differences exist between instruments, laboratories, and local populations.

Performance Characteristics⁴

The following performance characteristics were performed using an Epos 5060

Comparison: A group of 68 sera ranging in BUN values from 11 - 97 mg/dL was assayed by the described BUN method and by a similar commercially available BUN reagent. Comparison of the results yielded a correlation coefficient of 0.999 and the regression equation was $y = 1.012x - 0.47$. (Comparison studies were performed according to NCCLS Tentative Guideline, EP9-T.)

Precision: Within-run precision was established by 20 assays on three different levels of commercial serum controls. Total Precision values were obtained by assaying 3 commercial controls for 5 consecutive days.

	Within-Run		
	Serum 1	Serum 2	Serum 3
Mean BUN (mg/dL)	22	45	54
Std. Deviation (mg/dL)	0.6	0.8	0.6
C.V. (%)	2.6	1.8	1.2

	Total Precision		
	Serum 1	Serum 2	Serum 3
Mean BUN (mg/dL)	15	46	70
Std. Deviation (mg/dL)	0.4	0.6	0.7
C.V. (%)	3.0	1.2	1.0

Precision studies were performed according to NCCLS Tentative Guideline, EP5-T.

Linearity: Linear from 2-140 mg/dL. Performed according to NCCLS Guidelines EP6-P.

Sensitivity: Based on an instrument resolution of A = 0.001, the method presented shows a sensitivity of 2.0 mg/dL. Values less than 2.0 mg/dL should be reported as < 2.0 mg/dL.

References

1. Sampson, E.J., Baird, M.A., Burtis C.A., et al.: A coupled-enzyme equilibrium method for measuring urea in serum: Optimization and evaluation of the AACC Study Group on urea candidate reference method. Clin Chem., 26, 816-826, 1980.
2. Tietz, N.W., Textbook of Clinical Chemistry, W.B. Saunders Company, Philadelphia, PA, (1986), p.1270-1271.2.
3. Henry, R.J., Clinical Chemistry Principles and Techniques, 2nd Edition, Harper and Row, Hagerstown, NY, (1974), p.511.
4. Stanbio Laboratory Data

Manufactured By:
Stanbio Laboratory • 1261 North Main Street • Boerne, Texas 78006 USA
Ph: (830) 249-0772 • Fax (830) 249-0851 • e-mail: stanbio@stanbio.com
http://www.stanbio.com

DN: RBR.2020CE.02 • Last Revision: 04/04 • Procedure No. 2020CE





Stanbio LiquiColor® Creatinina Proced. No. 0420

Para la determinación cinética cuantitativa de Creatinina en suero u orina.

Resumen y Principio

En 1986 Jaffe¹ describió un método para la determinación de creatinina, haciendo reaccionar un filtrado libre de proteínas con ácido pírico en una solución alcalina. Aunque desde entonces se han descrito muchos métodos, la reacción clásica de Jaffe es la más usada. Esta reacción está sujeta a interferencias a causa de varias sustancias como proteínas y glucosa^{2,3,4}. Para combatir ésta desventaja, se han desarrollado algunas modificaciones⁵. Los métodos, cinéticos son los más usados por ser rápidos, sencillos y sin interferencias. El presente método se basa en una modificación de la velocidad de reacción de Fabiny y Eringshausen.⁶

Creatinina + ácido pírico complejo
creatinina-píricato
(amarillo-naranja)

La creatinina reacciona con el ácido pírico en medio alcalino para formar un complejo de color el cual absorbe a 510 nm. La velocidad de formación de color es proporcional a la concentración de creatinina en la muestra.

Reactivos

Creatinina Ácida, Cat. No. 0421

Solución acuosa de ácido pírico, 3.6 mmol/L.

Creatinina Base, Cat. No. 0422

Hidróxido de sodio en agua 240 mmol/L.

Estandar de Creatinina (5.0 mg/dL), Cat. No. 0423

Solución acuosa de creatinina cloruro de cinc, 5.0 mg/dL.

Precauciones: Para uso de diagnóstico *in vitro*. El hidróxido de sodio debe manejarse con cuidado por ser cáustico. El ácido pírico es un agente oxidante fuerte. Evite el contacto con la piel. Limpie cualquier salpicadura, ya que el ácido pírico seco es explosivo.

Preparación del Reactivo: Mezcle un volumen de ácido pírico con un volumen de hidróxido de sodio.

Estabilidad y Almacenamiento del Reactivo: Los reactivos ya mezclados son estables por 30 días a 15-30°C. El estandar es estable hasta la fecha de caducidad marcada en la etiqueta, cuando se conserva a 2-8°C. No utilice los reactivos si estos están turbios.

Materiales Requeridos Pero No Incluidos

Espectrofotómetro para leer absorbancias a 510 nm.
Pipetas exactas para medir volúmenes de 0.05 mL y 1.0 mL.
Vasos de precipitado para mezclar reactivos (vidrio o plástico).
Tubos de ensayo y/o celdillas para espectrofotómetro
Cronómetro

Recolección y Preparación de la Muestra

Suero: Separa rápidamente el suero del coágulo para prevenir la hemólisis.

Orina: Colecte la orina de 24 horas, mezcle bien y diluya 1:20 (1x19) con agua destilada. Mezcle bien.

Estabilidad de Muestra: La creatinina sérica es estable por 24 horas a 2-8°C y por varios meses a -20°C en recipientes bien cerrados que eviten la evaporación y la contaminación. La muestra de orina de 24 horas debe conservarse añadiendo 15 g. de ácido bórico. La orina es estable 4-7 días a temperatura ambiente.

Substancias Interferentes: Varias sustancias afectan la exactitud en la determinación de la creatinina. Ver lista completa en Young, et al⁷.

Analizador Automatizado

Parámetros:	
Longitud de onda	510 nm
Tipo de reacción	Cinética
Dirección de la reacción	Increciente
Temperatura de reacción	37°C
Relación muestra/reactivo	1:20
Tiempo de equilibrio	20 seg.
Tiempo de lectura	60 seg.
Límite de absorbancia blanco	<0.200
Cambio de absorbancia alta/min	0.150 Δ A/Min.
Valor Estandar	5 mg/dL
Valor normal bajo	0.7 mg/dL
Valor normal alto	1.5 mg/dL
Linealidad	20 mg/dL
Paso de luz de la celda	1 cm

Los parámetros antes mencionados deben usarse para programar los analizadores automatizados de Creatinina. Consulte su manual del instrumento para instrucciones de programación.

Procedimiento Manual

- Coloque las celdillas del espectrofotómetro a 37°C.
- Lleve a 0 el espectrofotómetro con agua a 510 nm.
- Pipete 1.0 mL del reactivo en uso en los tubos de ensayo y incube a 37°C por 3 minutos.
- Transfiera 0.05 mL (50 μL) del estandar en un tubo de ensayo, mezcle e inmediatamente y pase a una celdilla.
- Transcurridos exactamente 20 seg. lea y registre la absorbancia (A₁).
- Exactamente 60 segundos después de la lectura (A₁), lea y registre la absorbancia (A₂).
- Calcule el cambio de absorbancias (ΔA) restando (A₂-A₁).
- Corra las muestras de pacientes y los controles siguiendo los pasos del 4 al 7.

Control de Calidad: Incluya en cada corrida de muestras un suero control y/o orina conocidos por este método.

Resultados

Los valores resultan de comparar el cambio de absorbancia (ΔA) de la muestra problema (u) con el de un estandar (s) tratado en forma idéntica.

$$\text{Creatinina Sérica (mg/dL)} = \frac{\Delta A_u}{\Delta A_s} \times 5$$

donde ΔA_u y ΔA_s son los cambios de absorbancia, (incrementos) de la muestra problema y del estandar respectivamente, y 5 es la concentración del estandar (mg/dL).

Ejemplo: ΔA_u = 0.01 ΔA_s = 0.05

$$\text{Creatinina Sérica (mg/dL)} = \frac{0.01}{0.05} \times 5 = 1.0$$

$$\text{Creatinina en orina (mg/dL)} = \frac{\Delta A_u}{\Delta A_s} \times 5 \times 20 \text{ (factor de dilución)}$$

$$\text{Creatinina en orina (mg/L)} = \text{Creatinina en orina (mg/dL} \times 10)$$

$$\text{Creatinina en orina (mg/L/24 hrs.)} = \text{Creatinina en orina (mg/L)} \times 24 \text{ hrs. (mL)}$$

Valores Esperados*

Hombres (Suero) 0.9 - 1.5 mg/dL (orina) 1000-2000 mg/24 hrs.
Mujeres (Suero) 0.7 - 1.4 mg/dL (orina) 600-1500 mg/24 hrs.

Características

Linealidad: Hasta 20 mg/dL.

Correlación: Muestras de suero y control (n = 38) con valores de creatinina entre 0.6-25 mg/dL fueron analizadas por el método aquí descrito y por un procedimiento cinético similar. El análisis estadístico reveló un coeficiente de correlación (r) de 0.988, con una ecuación de regresión y = 0.96 x + 0.046.

Precisión:	Intraensayo	CV%
Media (mg/dL)	SD	
0.9	0.08	4.0
8.6	0.09	2.1

	Intraensayo	CV%
1.1	0.08	4.8
8.4	0.16	2.6

Referencias

- Jaffe M. Z Physiol Chem 10:391, 1886
- DiGiorgio J. in Clinical Chemistry - Principles and Technis, RJ Henry et al, Eds, Harper & Row, Hagerstown, MD, 1974, pp. 549-550
- Cook JGH, Ann Clin BioChem 12:219, 1975
- Tausky HH, in Standard Methods of Clinical Chemistry Vol 3, D Seligson, Ed. Academic Press, New York, 1966, p99.
- Heinegard D, Tiderstrom G. Clin Chem Acta 43:305, 1973.
- Fabiny DL, Eringshausen G. Clin Chem 17:696, 1971.
- Young DS et al. Clin Chem 21:286 D, 1975 (Special Issue).
- Larsen K. Clin Chem Acta 41:209, 1972.
- Stanbio Laboratory data.

STANBIO LABORATORY, LP DECLINA TODAS LAS GARANTÍAS EXPRESADAS E INVOLUCRADAS EN LA NEGOCIABILIDAD Y PROPIEDAD CONCERNIENTE A ESTE PRODUCTO, QUE NO ESTEN EXPRESAMENTE DETALLADAS EN LA INFORMACIÓN CONTENIDA EN EL EMPAQUE O SI NO HAY UN ACUERDO ESCRITO ENTRE EL COMPRADOR Y EL VENEDOR DE ESTE PRODUCTO.

STANBIO LABORATORY, LP SOSTIENE QUE ESTE PRODUCTO CUMPLE CON LA INFORMACIÓN CONTENIDA EN ESTE INSERTO. EL COMPRADOR DEBE DETERMINAR LA CONFORMIDAD DEL PRODUCTO PARA SU USO PARTICULAR. USELO SOLO DE ACUERDO A LAS INSTRUCCIONES DE LA ETIQUETA.

Para asistencia técnica llame: 800-531-5535 • (830) 249-0772
Fax (830) 249-0851 • e-mail: stanbio@stanbio.com
http://www.stanbio.com

Stanbio Laboratory • 1261 North Main Street • Boerne, Texas 78006
DN: RBR.0420.CE.E5.00-P • Última Revisión: 09/05 • Proced No. 0420





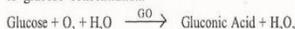
**Stanbio Glucose LiquiColor®
Procedure No. 1070**

For the Quantitative Enzymatic- Colorimetric
Determination of Glucose in Serum, Plasma or CSF

Summary and Principle

Measurement of blood glucose levels was among the first chemical procedures employed in clinical laboratory medicine.¹ Glucose oxidase methodology was introduced by Keilin and Hartree² in 1948. Keston³ later reported use of the combined glucose oxidase-peroxidase reagent, followed by the Teller⁴ addition of a chromogenic reagent to Keston's procedure. The Stanbio single reagent glucose method is based on a technique described by Trinder et al.⁵

Glucose is oxidized in the presence of glucose oxidase (GO). The hydrogen peroxide formed reacts, under the influence of peroxidase (PO), with phenol and 4-aminoantipyrine to form a red-violet quinone complex. The intensity of the color is proportional to glucose concentration.



Reagents

Glucose LiquiColor® Reagent, Ref. No. 1071

Contains:		
4-aminoantipyrine	0.2	mmol/L
Glucose Oxidase	15.0	U/mL
Peroxidase	1.2	U/mL
Phenol	4.0	mmol/L

No reactive ingredients and preservatives

Glucose Standard, (100 mg/dL), Ref. No. 1072

Glucose in aqueous benzoic acid.

Precautions: For In Vitro Diagnostic Use. Dispose of reagents in accordance with local requirements.

Reagent Preparation: Reagent and standard are ready-to-use.

Reagent Storage and Stability: Reagent is stable, when stored at 2-8°C until expiration date on the label. Once opened, contamination must be avoided. Measurement is not influenced by reagent color changes as long as absorbance of the reagent is < 0.80 at 500 nm in 1 cm lightpath. Standard is stable until expiration date on label when stored at 2-30°C. Reagent and standard should be at room temperature before use.

NOTE: To prevent contamination of Glucose reagent, pour into a separate vessel a volume slightly in excess of that required. DO NOT RETURN UNUSED PORTION.

Materials Required But Not Provided

- Spectrophotometer capable of reading at 500 nm (492-530 nm)
- Accurate pipetting devices
- Heating block or water bath, 37°C
- Cuvets Vortex Mixer Interval Timer

Specimen Collection and Preparation

Serum: Remove from clot within 30 minutes of collection in order to prevent glycolysis.

Plasma: An anticoagulant containing fluoride is recommended, but any of the common anticoagulants may be used if plasma is separated from cells promptly after centrifugation.

CSF: No special preparation is required.

Sample Stability: Glucose in serum/plasma processed in the manner described is stable for 40 hours at 2-8°C. CSF samples should be analyzed immediately because of possible bacterial contamination.

Interfering Substances: False low glucose values can result from excessive levels of ascorbic acid.⁷

Automated Analyzers

Parameters:

Wavelength	500 nm
Reaction Type	Endpoint
Reaction Direction	Increasing
Reaction Temperature	37°C
Sample/Reagent Ratio	1:100
Equilibration Time	3 Seconds
Read Time	4 Seconds
Lag Time	300 Seconds
Blank Absorbance Limit	0.800
High Absorbance	2.000A
Standard	100 mg/dL
Low Normal	70 mg/dL
High Normal	105 mg/dL
Linearity	400 mg/dL

Above parameters should be employed in programming automated analyzers for Glucose. Consult your instrument manual for programming instructions. Specific programming applications for most automated analyzers are available from Stanbio Customer Service Department.

Manual Procedure

Procedure #1: (Linear to 400 mg/dL)*

1. Pipet into cuvetts the following volumes (mL) and mix well:

	Reagent Blank (RB)	Standard (S)	Sample (U)
Reagent	1.0	1.0	1.0
Standard	-	0.010	-
Sample	-	-	0.010

*If linearity is desired to 500 mg/dL, increase reagent volume to 1.5 mL and proceed using 0.010 of sample.

2. Incubate all cuvetts at 37°C for 5 minutes.
3. Read S and U vs RB at 500 nm.

Procedure #2: (Linear to 650 mg/dL)

1. Pipet into cuvetts the following volumes (mL) and mix well:

	Reagent Blank (RB)	Standard (S)	Sample (U)
Reagent	1.0	1.0	1.0
Standard	-	0.005	-
Sample	-	-	0.005

NOTE: Volumes may be increased if the instrument requires a volume greater than 1.0 mL.

2. Incubate all cuvetts at 37°C for 5 minutes.
3. Read S and U vs RB at 500 nm.

Quality Control: Two levels of control material with known glucose levels determined by this method or a hexokinase procedure should be analyzed each day of testing. Stanbio recommends Ser-T-Fy[®] I, Normal Control and Ser-T-Fy[®] II, Abnormal Control be assayed with each patient run.

Results

Values are derived by the following equations:

$$\text{Glucose (mg/dL)} = \frac{\text{Au}}{\text{As}} \times 100,$$

where Au and As are the absorbance values of UNKNOWN and STANDARD, respectively and 100 the concentration of the STANDARD (mg/dL).

Example: Following readings were obtained using 1 cm cuvetts: Au = 0.130, As = 0.178

$$\text{Glucose (mg/dL)} = \frac{0.130}{0.178} \times 100 = 73$$

$$\text{Glucose (mmol/L)} = \text{Glucose (mg/dL)} \times 0.0556$$

NOTE: Samples having glucose values greater than 500 mg/dL are diluted 1:2 (1 + 1) with distilled water, the assay repeated and results multiplied by the dilution factor 2.

Expected Values⁸

Normal Range: Serum/Plasma: 70-105mg/dL

CSF: 40-75 mg/dL (2.2-3.9 mmol/L)

It is recommended that each laboratory establish its own range of expected values, since differences exist between instruments, laboratories, and local populations.

Performance Characteristics⁹

Precision: Using a serum containing glucose in the normal range and one with elevated values, a series of 5 assays were performed on each of 5 days. Coefficients of variation (CV) were within run of 1.6 and 1.2%, and between runs 3.0 and 2.0%, respectively.

Correlation: Determination of glucose by the procedure described (y) and by a hexokinase/UV method (x) on 40 sera (range: 56-582 mg/dL) showed a correlation coefficient (r) of 0.995 and a regression equation of y = 0.98x - 1.99.

Linearity: When performed as directed, the method is linear as listed for each procedure.

References

1. Folin O, Wu H: J Biol Chem 41:367, 1920
2. Keilin D, Hartree E.F.: Biochem J 42:230, 1948
3. Keston AS: Abstr 129th Meeting, Am Chem Soc, 1956, p 31c.
4. Teller J.D.: Abstr 130th Meeting, Am Chem Soc, 1956, p 69c.
5. Trinder, P., "Determination of Blood Glucose Using 4-Aminophenazone." J. Clin. Path., 22:246 (1959).
6. Howanitz P.J., Howanitz J.H.: IN Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods, 17th ed., J.B. Henry, Ed., W.B. Saunders, Philadelphia, 1984, p 168.
7. Cooper G.R., McDaniel V: Manual of Methods for the Determination of Glucose, CDC, USPHS, Atlanta.
8. Caraway W.T.: IN Fundamentals of Clinical Chemistry, 2nd ed., N.W. Tietz, Ed. Saunders, Philadelphia, 1976, p 242.
9. Stanbio Laboratory data

Manufactured By:
Stanbio Laboratory • 1261 North Main Street • Boerne, Texas 78006 USA
Ph: (830) 249-0772 • Fax (830) 249-0851 • e-mail: stanbio@stanbio.com
http://www.stanbio.com
DN: RBR.1070CE.02 • Last Revision: 10/05 • Procedure No. 1070CE





Stanbio Alpha-Amylase LiquiColor® Procedure No. 2970

For the Quantitative Determination of Amylase in Serum and Urine

Summary and Principle

Alpha-amylase is an enzyme found in bacteria and animal tissues that catalyzes the hydrolytic cleavage of starch and glycogen. Serum amylase activity determinations are of clinical interest in the diagnosis of pancreatic function.¹

The enzymatic procedure presented is based on modifications of Wallenfels, using as substrate p-Nitrophenyl-D-maltoheptaoside (PNPG7) with the terminal glucose blocked to reduce spontaneous degradation of the substrate by glucosidase and glycoamylase.² The test is performed in a kinetic mode with a very short lag time and offers much greater stability than previous amylase methodologies.

Amylase hydrolyzes p-Nitrophenyl D-maltoheptaoside (PNPG7) to p-Nitrophenyl-maltotriose (PNPG3) and maltotetraose. Glucoamylase hydrolyzes PNPG3 to p-Nitrophenylglycoside (PNPG1) and glucose. Then PNPG1 is hydrolyzed by glucosidase to glucose and p-Nitrophenol, which produces a yellow color. The rate of increase in absorbance is measured at 405 nm and is proportional to the amylase activity in the sample.

Reagent

Amylase LiquiColor Reagent, Cat. No. 2971

HEPES Buffer, pH 7.1 ± 0.1	0.1	mol/L
Glucosidase (microbial)	> 6	KU/L
Sodium Chloride	62.5	mmol/L
Magnesium Chloride	12.5	mmol/L
EPS-G7 (PNPG7)	> 8	mmol/L

Precautions: For In Vitro Diagnostic Use.

DO NOT PIPETTE REAGENT BY MOUTH to avoid contamination with salivary amylase.

Reagent Preparation: Amylase liquid reagents are supplied ready-to-use.

Reagent Storage and Stability: Reagent is stable until the expiration date on their respective labels, when properly stored at 2-8°C and protected from light. Discard reagent if it appears cloudy or contains particulate matter.

Materials Required But Not Provided

- Spectrophotometer capable of absorbance readings at 405 nm (400-420 nm)
- Constant temperature block or bath, 37°C, or temp. controlled cuvet well
- Accurate pipetting devices
- Test tubes
- Interval timer

Specimen Collection and Preparation

Unhemolyzed serum is the specimen of choice. Plasma from heparin tubes may be used. Other anticoagulants, such as Citrate and EDTA, bind calcium, an ion needed for amylase activity. Therefore, plasma with any anticoagulant other than heparin should not be used.

Urine specimens should be adjusted to a pH of 7.0 and kept refrigerated until assayed.

Sample Stability: Amylase in serum and urine is reported stable for one week at room temperature (15-30°C) and for several months when stored refrigerated and protected against evaporation and bacterial contamination.³

Interfering Substances: A number of drugs and substances affect the determination of amylase. Young et al have published a comprehensive list of such substances.⁴

Automated Analyzers

Parameters:

Wavelength	405 nm
Reaction Type	Kinetic
Reaction Direction	Increasing
Reaction Temperature	37°C
Sample/Reagent Ratio	1:40
Lag Time	30 Seconds
Read Time	30 Seconds
Factor	4824
Low Normal	25 U/L
High Normal	125 U/L
Linearity	2,000 U/L
Cuvet Lightpath	1 cm

Above parameters should be employed in programming automated analyzers for Amylase. Consult your instrument manual for programming instructions.

Manual Procedure

- For each sample, add 1.0 mL reagent to cuvet or test tube and prewarm at 37°C for at least 3 minutes.
- Zero spectrophotometer with water at 405 nm.
- Add 0.025 mL (25 µL) serum to its respective tube and read immediately.
- Record increase in absorbance at 30 second intervals for 2 minutes.
- Determine the mean absorbance difference per minute (ΔAbs./min.)
- Multiply the ΔAbs./min. by 4824 to obtain the result in U/L.

NOTE: If cuvet is not temperature controlled, incubate samples at 37°C between readings.

Quality Control: Two levels of control material with known amylase levels determined by this method should be analyzed each day of testing.

Results

Values are derived based on the millimolar absorptivity of p-Nitrophenol which is 8.5 at 405 nm under the test conditions described.

$$U/L = \frac{\Delta Abs./min. \times Total\ volume \times 1000\ (U/mL\ to\ U/L)}{Absorptivity \times Sample\ volume \times Light\ path}$$

$$U/L = \frac{\Delta Abs./min. \times 1.025 \times 1000}{8.5 \times 0.025 \times 1.0}$$

$$U/L = \Delta Abs./min. \times 4824$$

Expected Values⁵

Normal Range	Serum	25 - 125 U/L
	Urine	1 - 17 U/Hour

The range should serve only as a guideline. Since the expected values are affected by age, sex, diet and geographical location, each laboratory is strongly urged to establish its own reference for this procedure.

Performance Characteristics

Comparison: A comparison study was performed between this method and another manufacturer with the same methodology. Seventy-six samples, ranging in amylase activity from 34 to 2589 U/L were assayed. The resulting correlation coefficient was 0.999 and the regression equation was $Y = 1.01X - 2.1$

Precision:

Mean	Within Run		C.V.%
	S.D.		
4.0	1.5		3.8
364	4.5		1.2

Mean	Run to Run		C.V.%
	S.D.		
4.0	1.3		3.3
353	10.7		3.0

Linearity: To 2,000 U/L, samples exceeding this value should be diluted with an equal amount of saline, the assay repeated and results multiplied by 2.

References

- Tietz, N.W., Textbook of Clinical Chemistry, W.B. Saunders Co., Philadelphia (1986), 1270.
- Blair, H.E., U.S. Patent Pending
- Demetriou, J. et al, Clinical Chemistry: Principles and Techniques, 2nd ed., (Henry, R.J. et al eds.), Hagerstown (MD), Harper & Row (1974).
- Young, D.S., et al, Clin. Chem. 21:1D (1975).
- Burtis, C.A., Ashwood E.R., Tietz Textbook of Clinical Chemistry, 2nd Ed., W.B. Saunders Co., Philadelphia, PA (1994) p 2178.

For Technical Service call: 800-531-5535 • (830) 249-0772
 Fax (830) 249-0851 • e-mail: stanbio@stanbio.com
<http://www.stanbio.com>
 Stanbio Laboratory • 1261 North Main Street • Boerne, Texas 78006
 DN: RBR.2970.01 • Last Revision: 04/05 • Procedure No. 2970

