



UNIVERSIDAD DE ORIENTE  
NÚCLEO DE ANZOÁTEGUI  
ESCUELA DE CIENCIAS DE LA SALUD  
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FISIOLÓGICAS

**ACTIVIDAD BIOLÓGICA *IN VITRO* Y DOSIS LETAL CINCUENTA DEL  
VENENO DE *Thalassophryne maculosa* (PISCES, BATRACHOIDIDAE)**

Asesores

Aleikar Vásquez-Suárez

Leonardo De Sousa

Trabajo de Grado presentado por

Alcalá Cermeño, Osmary Nathalee

Mendoza, Giannina Desiree

Navarro Gómez, Nohelys del Jesús

Como requisito parcial para optar al título de  
Médico Cirujano.

UNIVERSIDAD DE ORIENTE  
NÚCLEO DE ANZOÁTEGUI  
ESCUELA DE CIENCIAS DE LA SALUD  
COMISIÓN DE TRABAJOS DE GRADO

**DECLARACIÓN JURADA**

El Trabajo de Grado presentado por las Estudiantes Universitarias **Alcalá Cermeño, Osmary Nathalee**, C.I. № V-18.593.185; **Mendoza, Giannina Desiree**, C.I. № V-16.344.720 y **Navarro Gómez, Nohelys del Jesús**, C.I. № V-17.410.292, titulado “**ACTIVIDAD BIOLÓGICA IN VITRO Y DOSIS LETAL CINCUENTA DEL VENENO DE *Thalassophryne maculosa* (PISCES, BATRACHOIDIDAE)**”, ha sido aprobado por el Jurado Evaluador, quienes lo han encontrado correcto en su contenido y forma de presentación; asimismo, declaran que los datos presentados son responsabilidad exclusiva de los autores, en fe de lo cual firman:

Prof. Demetrio Kiriakos  
Presidente del Jurado

Prof. Stefano Bónoli  
Miembro Principal

Prof. Aleikar José Vásquez-Suárez  
Segundo Miembro Principal Asesor

Prof. Leonardo De Sousa  
Segundo Miembro Principal Asesor

Prof. Rosibel Villegas  
Coordinadora Comisión de Trabajos de Grado  
Escuela de Ciencias de la Salud

Mayo 2010

## RESUMEN

### **ACTIVIDAD BIOLÓGICA *IN VITRO* Y DOSIS LETAL CINCUENTA DEL VENENO DE *Thalassophryne maculosa* (PISCES, BATRACHOIDIDAE)**

Alcalá Cermeño, Osmary Nathalee; Mendoza, Giannina Desiree; Navarro Gómez, Nohelys del Jesús. Asesores Vásquez-Suárez, Aleikar José y De Sousa, Leonardo. Laboratorio de Toxinología, Secciones de Bioquímica y Farmacología, Departamento de Ciencias Fisiológicas, Escuela de Ciencias de la Salud, Universidad de Oriente, Núcleo de Anzoátegui.

El envenenamiento causado por el pez *Thalassopyrne maculosa*, produce manifestaciones clínicas fundamentalmente inflamatorias, conllevando en ciertas ocasiones a lesiones muy severas e incapacitantes, aunque generalmente no letales. A pesar de ello, muchos de los componentes responsables de tales efectos no han sido estudiados ni identificados con precisión. Por lo tanto, se hace necesario el estudio de algunos efectos biológicos *in vitro* e *in vivo* del veneno del “pez sapo cano” *Thalassophryne maculosa* (Pisces, Batrachoididae). Se determinó la concentración de proteínas en la fracción soluble mediante espectrofotometría. La actividad biológica de los venenos fue ensayada luego de su inyección intraperitoneal en ratones hembra, homocigotos, cepa C57BL/6. La letalidad fue cuantificada a través de la dosis letal cincuenta (DL<sub>50</sub>), determinada según el método de Dixon y Mood, para 60 minutos de experimentación; calculada como el valor de la mediana obtenida el método no paramétrico de Hodges y Lehmann. El efecto clínico de los venenos se evaluó observando el curso temporal de toxicidad aguda experimental. La actividad proteolítica del veneno se estudió con diluciones sucesivas, colocadas sobre gel radiográfico para evidenciar la digestión de la gelatina. La actividad fosfolipasa se precisó mediante la emulsión de volúmenes determinados de yema de huevo y buffer

Tris incubándose con diferentes concentraciones del veneno para cuantificar el tiempo de coagulación. Se obtuvo una cantidad total de proteínas de 79,41 mg mediante ordeño manual de 20 ejemplares. El índice de letalidad (en mg kg<sup>-1</sup>) del veneno de *T. maculosa* fue de 70,80 (66,95-75,12) mg.kg<sup>-1</sup>; el índice de variabilidad fue de 7,02%. El tiempo de aparición de las manifestaciones clínicas inducidas por el veneno fue gradual presentando de forma inmediata hiperactividad y taquipnea, seguida de hipoactividad y distensión abdominal para suceder, alrededor de los 30 minutos del curso temporal de toxicidad, periodos de bradipnea/apnea a la cual sobreviene la muerte o en algunos casos la sobrevida de los ratones. La actividad proteolítica evidenció digestión de gelatina hasta una dilución 1:64 y la actividad de fosfolipasa, fue comprobada por prolongación en el tiempo de coagulación de una emulsión de yema de huevo, solo a la mayor concentración de veneno utilizada (8,0 mg.mL<sup>-1</sup>). Al comparar el índice de letalidad del veneno de *T. maculosa* con diferentes especies de escorpiones y serpientes se evidencia baja potencia letal del veneno de *T. maculosa*, con marcada diferencia con relación a la letalidad del grupo del veneno de las víboras y artrópodos, superado únicamente por la DL<sub>50</sub> del veneno del escorpión *R. laticauda*. La actividad proteolítica exhibida por este veneno es baja en comparación con la mayoría de los vipéridos; solo poco mayor que la ostentada por *Crotalus durissus ruruima* o la de *Crotalus durissus pifanorum*. Los resultados aquí expuestos; permitirían iniciar la caracterización e identificación de algunos componentes proteicos presentes en este veneno que podrían poseer aplicaciones biotecnológicas, principalmente en el campo de la farmacología.

## **DEDICATORIA**

Primeramente a Dios, por regalarme la oportunidad de vivir y de ser hoy lo que soy, llevarme de su mano en todos mis caminos y mantenerme firme para lograr todas mis metas. De verdad Señor, me siento muy feliz por regalar innumerables cosas a mi vida, en especial tu amor, mi hermosa familia y mis amistades.

A mi madre Marina, por estar conmigo en toda circunstancia. Por ser una mujer luchadora, emprendedora y siempre encontrar de forma acertada, soluciones en problemas difíciles. Madre, eres un ejemplo a seguir, gracias por guiarme y ser parte de esta y muchas metas más por cumplir. Te amo madre.

A mis hermanos, porque en ellos he tenido siempre ese apoyo, en las buenas y en las malas. Por quererme tanto, hacerme sentir segura y no desvanecer ante cualquier obstáculo. Siempre los tengo presente en cada decisión que he de tomar. Los amo mucho.

A mi Tía Olga y mi Abuela Marina, por darme su apoyo. Ser pilar fundamental en mi formación y llenarme de alegría en tantos momentos de mi vida. Las amo.

A mi Tío Rafael, que fue como un padre para mí. Gracias por llenarnos de alegría y aunque ya no te tenga físicamente, estas en mis pensamientos...Siempre serás parte de todas mis metas.

A mi sobrina Marian V, por ser ese pedacito de cielo que nos regaló Dios en el momento preciso, por llenarme de felicidad con solo pensarla...Por ser tan inteligente, tan dulce...Te amo sobrina.

A mi cuñado Alejandro, por brindarme su apoyo y su cariño. Comparto este logro contigo, porque eres parte de él.

A mi novio Francisco, por mantenerme firme, por llenarme de felicidad, por apoyarme siempre en mi carrera y entenderme, por estar ahí y alentarme cuando creo que todo se va a desvanecer. Gracias por existir y hacerme feliz. Te amo.

A mis Tíos y mis primos, gracias por su apoyo incondicional, por cuidarme y guiarme a lo largo de mi carrera...Me siento muy feliz por tenerlos. Gracias por estar ahí. Los quiero mucho.

A mis verdaderos amigos, gracias por brindarme su apoyo y su cariño incondicional. Por ser parte importante en mi formación. Los quiero mucho! Este logro también va por ustedes.

Al Profesor Aleikar Vásquez-Suárez, le estoy muy agradecida por aceptarnos como sus tesis. Gracias por su perseverancia durante todo este tiempo, por su apoyo incondicional y por ser parte principal de esta meta.

Al Doctor Leonardo De Sousa, gracias por guiarnos y apoyarnos en todo momento durante el desarrollo de este Trabajo de Grado y ser parte principal de este logro; siento mucha admiración por usted, tanto por su humildad como por su dedicación como profesor.

A todo el resto de mi familia, amigos, que aunque no los haya nombrado no significa que no tengan peso en este logro. Gracias por brindarme su apoyo de forma incondicional. Se les quiere.

*Osmary N. Alcalá C.*

## DEDICATORIA

A **Dios todopoderoso**, quien independientemente de la raza y religión, me ha permitido el ser, la fe y el bienestar espiritual en todo momento.

A *mi madre*, **Teresa Medoza**, mujer admirable, quien no solo ha sido intermediaria en darme la vida, sino que ha luchado día a día a mi lado por mantenerla. Con su apoyo incondicional, esfuerzos con sentimientos de lucha y perseverancia, temple y fortaleza ante las vicisitudes, y a su vez, con noble y humilde corazón, ha sabido ser madre y padre a la vez, cubriendo a plenitud con todos los requisitos que se necesitan para ser una *gran mujer, madre y mi amiga*.

A *mis hermanos* **Karina** y **Wilmer**, y sin faltar mi pequeño sobrino **Kristhian**, quienes en buenas y malas siempre me han apoyado y confiado en mí: *familia es familia y cariño es cariño, siempre con amor y control*.

Al **doctor Cesar Verde**, aunque ausente, pilar fundamental en mi formación, era y será mi mayor ejemplo y médico digno de admiración; inconscientemente me transmitió su experiencia y vocación para emprender este tanpreciado camino como lo es *ser médico*.

A **Joel Azuaje**, quien siempre ha recalcado mis fortalezas, con mucho cariño a sabido orientarme en la vida en lo que es *quiere y poder ser*; y a **Freddy Moncada**, hombre de grandes éxitos, sabio y sobre todo gran corazón, quien me ha tomado de la mano en los momentos precisos, para tomar caminos alternos ante las dificultades de la vida.

A mis amigas, **Kassmir Flores**, **Suellen Diaz**, **Alexa Dominguez**, no hay palabras para resumir lo incondicionales que han sido conmigo en tantos años y los especiales que cada día serán para mí.

A **todos aquellos** que hoy, presentes o ausentes, en las alegrías y tristezas, riquezas y pobrezas, salud y enfermedad, han estado a mi lado y han contribuido no solo en mi crecimiento académico, sino profesional y personal... **Mil Gracias!**

*Giannina Desiree Mendoza*



## **DEDICATORIA**

Ante todo gracias a Dios por permitirme recorrer este camino de la mano de las personas indicadas y necesarias sin las cuales no habría logrado esta meta tan anhelada.

A mi querida madre, por forjar en mí a través de su compañía perpetua y su ejemplo diario, los valores fundamentales que guían cada una de mis acciones, sin duda alguna eres la principal acreedora de este merito, por ser siempre la mano que me levanta y la palabra única e incondicional. Infinitas gracias a ti “Mami Bella”.

A mi padre por ser mi respaldo y ejemplo de perseverancia y constancia, enseñándome desde niña que cada huella de mi andar tiene su apreciado valor. Te quiero mucho mi Viejo Bello.

A mis hermanas, Carmen, Beatriz y Esther por proporcionarme incondicionalmente sus manos amigas y por reforzar en mí los valores concebidos en nuestro hogar.

A mi hermano, compañero y amigo, Canio por facilitar a través de su indispensable ayuda el transcurrir hacia esta meta y por inspirar en mí, un espíritu curioso y sediento de conocimiento. Te quiero “chus”.

A mis amigas por brindarme momentos únicos e irrepetibles, con los cuales he confirmado que siempre las recordare con mucho cariño.

A nuestros asesores Aleikar Vásquez-Suárez y Leonardo De Sousa por permitirme ser su tesista y por orientar pacientemente la trayectoria de tan anhelado objetivo.

*Nohelys Navarro Gomez*

## **AGRADECIMIENTOS**

A la Universidad de Oriente y Escuela de Ciencias de la Salud del Núcleo Anzoátegui por brindarnos la oportunidad de ser sus hijos académicos y así poder cumplir uno de nuestros más anhelados sueños; a través de sus conocimientos teóricos y prácticos llenos de ética, profesionalismo y mucha sabiduría.

Al Laboratorio de Toxinología, Secciones de Bioquímica y Farmacología, Departamento de Ciencias Fisiológicas, Escuela de Ciencias de la Salud, Núcleo Anzoátegui, por permitirnos el desempeño y elaboración de nuestro Trabajo de Grado, bajo el ejemplo de su gran experiencia en el ámbito de la investigación.

Al profesor Aleikar Vásquez-Suárez, por su capacidad de emprender un gran proyecto, aptitud para desempeñarlo y sobre todo por ofrecernos la oportunidad de formar parte como tesisistas, de este excelente tema de investigación y equipo de trabajo.

Al profesor Leonardo De Sousa, no solo por su más admirada colaboración, sino también por su gran perseverancia y dedicación en cada paso a seguir en este proyecto, transmitiendo sus valiosos conocimientos con muchísimo optimismo, carisma, fortaleza y confianza a cada una de nosotras.

Al Profesor Juan Bolaños Curvelo, corresponsable y coautor intelectual de este proyecto, Jefe del Laboratorio del Grupo de Investigación en Carcinología, Escuela de Ciencias Aplicadas al Mar, Universidad de Oriente, Núcleo de Nueva Esparta y a los demás miembros de su grupo de investigación especialmente a Régulo López, por la captura, mantenimiento y colaboración en el ordeño del veneno.

Al Profesor Stefano Bónoli, por el análisis digital de la actividad proteolítica del veneno del pez sapo cano evaluada en este trabajo.

A los Profesores Demetrio Kiriakos, Mercedes Matos por su contribución académica y espiritual en la realización del presente trabajo.

A todas aquellas personas que, en lo posible, aportaron ideas y ayuda logística para la consecución de esta meta.

## ÍNDICE

DECLARACIÓN JURADA.....	ii
RESUMEN.....	iii
DEDICATORIA.....	v
AGRADECIMIENTOS.....	x
ÍNDICE .....	xii
LISTA DE TABLAS.....	xiv
LISTA DE FIGURAS .....	xv
INTRODUCCIÓN.....	17
CAPITULO I: EL PROBLEMA .....	21
1.1 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA .....	21
1.2 JUSTIFICACIÓN.....	22
1.3 OBJETIVOS.....	23
1.3.1 General .....	23
1.3.2 Específicos.....	23
CAPITULO II: MARCO METODOLÓGICO.....	24
2.1 Obtención y purificación parcial del veneno.....	24
2.2 Cuantificación de la cantidad de proteínas del veneno .....	24
2.3 Determinación de la DL <sub>50</sub> y evaluación de los signos de toxicidad aguda ..	25
2.4 Determinación de la actividad proteolítica.....	27
2.5 Actividad de fosfolipasa.....	28
2.6 Análisis estadísticos .....	28
CAPITULO III: ANALISIS Y PRESENTACION DE RESULTADOS.....	30
3.1 Cuantificación de la cantidad de proteínas del veneno de <i>Thalassophryne maculosa</i> , determinación de la DL <sub>50</sub> y evaluación de los signos de toxicidad aguda .....	30

3.2 Actividad biológica (fosfolipasa y proteolítica) del veneno de <i>Thalassophryne maculosa</i> .....	39
3.3 Comparación de la actividad biológica <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> del veneno de <i>Thalassophryne maculosa</i> con el veneno de otros animales vertebrados e invertebrados.....	42
3.4 Discusión.....	47
CAPITULO IV: CONCLUSIONES .....	50
4.1 CONCLUSIONES.....	50
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	52
HOJA DE METADATOS PARA TESIS Y TRABAJOS DE ASCENSO.....	1

## LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Datos para el cálculo de la DL <sub>50</sub> del veneno de <i>Thalassophryne maculosa</i> en ratones C57BL/6, administrado por vía intraperitoneal, para una hora de observación. .....	34
Tabla 2. frecuencia de muerte y Secuencia de dosis administradas, por vía intraperitoneal, del veneno de <i>Thalassophryne maculosa</i> en el modelo mûrido C57BL/6.....	35
Tabla 3. Tiempos de coagulación de las muestras sometidas a diferentes concentraciones del veneno de <i>Thalassophryne maculosa</i> para la determinación de actividad fosfolipasa. ....	39
Tabla 4. COMPARACIÓN DE LA DL <sub>50</sub> DEL VENENO DE <i>Thalassophryne maculosa</i> CON EL VENENO de varias especies de vertebrados venezolanos, determinadas, en la Escuela de Ciencias de la Salud, Universidad de Oriente, Núcleo de Anzoátegui, por el método de Dixon y Mood (1948). ....	43
Tabla 5. COMPARACIÓN DE LA DL <sub>50</sub> DEL VENENO DE <i>Thalassophryne maculosa</i> CON EL VENENO de varias especies de escorpiones venezolanos de la familia buthidae determinadas, en la Escuela de Ciencias de la Salud, Universidad de Oriente, Núcleo de Anzoátegui, por el método de Dixon y Mood (1948).....	44
Tabla 6. COMPARACIÓN DE LA actividad proteolítica sobre placa radiográfica DEL VENENO DE <i>Thalassophryne maculosa</i> CON EL VENENO de varias especies de serpientes venezolanas, determinadas en la Escuela de Ciencias de la Salud, Universidad de Oriente, Núcleo de Anzoátegui, por el método de huang y perez (1980). ....	45

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. fotografías de un ejemplar de pez sapo cano <i>Thalassophryne maculosa</i> (Pisces, Batrachoididae) en su habitat natural.....	25
Figura 2. Barrido de absorbancia realizado a una muestra de veneno de <i>Thalassophryne maculosa</i> (Pisces, Batrachoididae).....	33
Figura 3. Determinación de la dosis letal cincuenta (DL <sub>50</sub> ) del veneno de <i>Thalassophryne maculosa</i> (Pisces, Batrachoididae) por vip en ratones hembra C57BL/6.....	36
Figura 4. Comparación del curso temporal de toxicidad aguda experimental entre ratones fallecidos y sobrevivientes sometidos al veneno de <i>Thalassophryne maculosa</i> (Pisces, Batrachoididae) por vip en ratones hembra C57BL/6. ....	37
Figura 5. Comparación de un ratón C57BL/6 control con uno sobreviviente inyectado, por vip, con el veneno <i>Thalassophryne maculosa</i> (Pisces, Batrachoididae) mostrando signos de toxicidad aguda. ....	38
Figura 6. actividad proteolítica del veneno <i>Thalassophryne maculosa</i> sobre placa radiográfica. ....	40
Figura 7. REGRESIÓN LOGARITMICA Y EXPONENCIAL DE LA ACTIVIDAD PROTEOLÍTICA DEL VENENO <i>Thalassophryne maculosa</i> SOBRE PLACA RADIOGRÁFICA. ....	41

Figura 8. COMPARACIÓN GRÁFICA DE LA actividad proteolítica DEL VENENO DE *Thalassophryne maculosa* CON EL de varias especies de serpientes venezolanas de la familia viperidae, determinadas en la Escuela de Ciencias de la Salud, Universidad de Oriente, Núcleo de Anzoátegui.....46



## INTRODUCCIÓN

En masas de agua de ambientes dulceacuícolas y zonas marinocostas se pueden encontrar organismos acuáticos peligrosos, con amplia variedad morfológica, algunos de ellos, representando importancia local o regional debido al impacto que pueden causar en la salud de los humanos durante sus jornadas de recreación o de trabajo. La utilidad que se pueda dar a los cuerpos de agua, determina con frecuencia la probabilidad y naturaleza de la exposición humana ante dichos organismos (Machado-Allison y Rodríguez-Acosta, 1997; Lima y Ferreira, 2000; Haddad Junior, 2003; Haddad Junior y col., 2003; Gutierrez y col., 2004; Facó y col., 2005; Forrester, 2008; Loyo y col., 2008). Las costas venezolanas, por su ubicación relativa en la zona tropical, presentan gran variedad de especies de vertebrados o invertebrados, marinos o dulceacuícolas, que pueden ocasionar diferentes tipos de interacción con el hombre, potencialmente negativas, caracterizadas por dolor, envenenamiento, reacciones alérgicas, trastornos psicológicos y hasta la muerte (Machado-Allison y Rodríguez-Acosta, 1997; Bocalon y col., 2004; Gutierrez y col., 2004; Loyo y col., 2008).

Los animales marinos que causan, activa o pasivamente, lesiones debido a la presencia de glándulas de veneno, en conjunto con un mecanismo estructural para la inyección del mismo, se encuentran confinados a un reducido número de especies definidas por Halstead (1978) como peces venenosos o acantotóxicos. En este caso, el accidente humano causado por éstos se denomina ictismo y sus mecanismos fisiopatológicos, poco conocidos, representan un problema económico y social, agravado por la ausencia de tratamientos eficientes, desconocimiento relativo sobre la composición y naturaleza de sus venenos y los mecanismos de acción de sus componentes (Lima y Ferreira, 2000).

Los venenos de peces son mezclas complejas de sustancias específicas, farmacológicamente activas que pueden causar una amplia gama de signos clínicos en los humanos, los cuales pueden ser agrupados en siete categorías: locales, autofarmacológicos, antihemostáticos, neurológicos, musculares, cardíacos y de efectos renales (Junghanss y Bodio, 2003). Muchos géneros de Uranoscópidos son bentónicos y venenosos al igual que los Batracóidos, dentro de los que se encuentra el género *Thalassophryne*. Algunos de sus taxos están provistos de dos espinas dorsales rodeadas en su parte basal por tejido glandular que vacía su contenido hacia espinas huecas, para eyectar el veneno. Adicionalmente, los procesos espinosos de los opérculos también son utilizados como órganos defensivos venenosos, pudiendo infligir, con tales estructuras, punciones dolorosas.

El envenenamiento causado por *Thalassophryne maculosa* inicia con intensa inflamación, eritema, edema y dolor local persistente, en algunos casos con necrosis alrededor del área de penetración de las espinas y en algunas ocasiones acompañadas con infecciones secundarias (Sosa-Rosales y col., 2005). El dolor, con poca respuesta a fármacos antiinflamatorios y analgésicos, suele persistir hasta por a 24 horas (Lima y Ferreira, 2000); predominando posteriormente síntomas parestésicos en el miembro afectado. Los síntomas dependen de la cantidad de veneno eyectado por el pez, así como por el tamaño, el peso y la inmuno-reactividad de la víctima. En algunos casos se ha observado persistencia de la herida con alteraciones sensoriales durante meses (Sosa-Rosales y col., 2005). Gran parte de los venenos producidos por estos organismos, incluyendo el de *Thalassophryne maculosa* causan lesiones severas; aunque generalmente no letales. A pesar de ello, muchos de los componentes responsables de tales efectos no han sido estudiados ni identificados con precisión (Hodgson, 1997)

Es bien conocida la naturaleza proteica de los venenos sintetizados por los peces (Fry y col., 2009). Sin embargo, algunas investigaciones han mencionado

contradicciones relativamente significativas con respecto a su actividad biológica y a sus propiedades bioquímicas. Tales discrepancias han sido atribuidas principalmente a las condiciones fisiológicas entre los especímenes, que repercutirían sobre la constitución del veneno, y adicionalmente, a su marcada inestabilidad química (Goudey-Perrière y Perrière, 1998).

Algunos estudios, realizados en ratones, han demostrado que el veneno de *Thalassophryne maculosa* tiene efectos nefrotóxicos (Faco y col., 2003) y hemostáticos mediados por la liberación de citoquinas. Sin embargo, los datos de algunas investigaciones son contradictorios o insuficientes. Cassoli y col. (2007) indicaron que los efectos clínicos locales producidos por el veneno de *Scorpaena plumieri*, sobre humanos, estarían relacionados con la degradación de proteínas y glicosaminoglicanos de la matriz extracelular del tejido conectivo alrededor de vasos capilares; esta especie sería capaz de inducir efectos sistémicos considerables, de tipo cardiovascular y neurológicos. Por su parte, Carrijo y col. (2005) determinaron, en el veneno de esta especie, actividad proteolítica, hemolítica y hemorrágica. Ratones inyectados con dosis de veneno de esta especie desarrollaron dificultad respiratoria, pérdida de la coordinación muscular con desarrollo de parálisis, micción, hipersalivación, efectos de hipotensión y convulsiones. Para el veneno de *Thalassophryne nattereri*, Lopes-Ferreira y col. (1998) señalaron fuerte actividad hemolítica y baja actividad proteolítica, sin actividad de fosfolipasa.

Se han detectado fosfolipasas A (FLA), especialmente de tipo A<sub>2</sub> (FLA<sub>2</sub>), en el veneno de una gran diversidad de animales venenosos, responsables de efectos miotóxicos y neurotóxicos. Sin embargo, muchas de estas proteínas con actividad catalítica presentes en peces venenosos, han sido insuficientemente caracterizados desde el punto de vista bioquímico y, en algunos casos, con más atención hacia las propiedades inmunológicas (Zito Grund y col., 2006). Existen dos grandes clases, las FLA<sub>2</sub> intracelulares o citosólicas (FLA<sub>2c</sub>), de masa molecular elevada (40-85 kDa) y

las FLA<sub>2</sub> de secreción (FLA<sub>2</sub>S), de masa pequeña (14-18 kDa). Las formas extracelulares de las FLA<sub>2</sub> son extremadamente abundantes en secreciones de glándulas exocrinas como las venenosas de serpientes, abejas, escorpiones y pe. Similarmente este tipo de fosfolipasas son abundantes en áreas de inflamac (Dennis, 1994).

# CAPITULO I: EL PROBLEMA

## 1.1 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La actividad procoagulante, consistente en la formación de coágulos de fibrina que ocurre en el plasma sanguíneo, se encuentra mayoritariamente documentada en organismos venenosos terrestres, en comparación con los acuáticos, productores de veneno, de los que se carece de información al respecto (Lopes-Ferreira y col., 2002); en cambio la actividad hemolítica ha sido probada en diferentes venenos de origen acuático (Shiomi y col., 1989; Lopes-Ferreira y col., 1998)

La Dosis Letal Cincuenta ( $DL_{50}$ ) está representada por la cantidad necesaria de una droga o toxina capaz de producir la muerte en el cincuenta por ciento de una población de animales experimentales (Ross 1996). Su determinación es esencial para la estandarización de los venenos y antivenenos de origen natural (Sevcik 1987). Este índice letal se puede establecer utilizando distintos métodos, entre los cuales se pueden mencionar el de Reed y Muench (1938), Dixon y Mood (1948), Beccari (1949), Lichtfield y Wilcoxon (1949), Finney (1952), Molinengo (1979) o el de Meier y Theakston (1986).

Bajo los argumentos precedentes se realizó el estudio *in vitro* de algunas de las propiedades biológicas del veneno de *Thalassophryne maculosa*, incluida la determinación *in vivo* de su dosis letal cincuenta ( $DL_{50}$ ) y la estimación de las posibles manifestaciones clínicas inducidas como efecto tóxico del envenenamiento agudo experimental con el veneno de esta especie en ratones hembra C57BL/6. Todo esto como inicio en la recolección de datos que sirvan de línea base para el estudio de las toxinas que puedan estar presentes en dicho veneno y sus efectos sobre un modelo

animal de experimentación que pudiese ser extrapolado en humanos. Al mismo tiempo, emprender el estudio en profundidad de este veneno y sus efectos, permitiría abrir la posibilidad de la elaboración de antivenenos para neutralizar sus efectos tóxicos y con la posibilidad de su aplicación en las poblaciones afectadas tal como se ha demostrado para otras especies venenosas de origen acuático. Simultáneamente este trabajo, permite iniciar la caracterización e identificación de algunos componentes proteicos presentes en el veneno que podrían poseer aplicaciones biotecnológicas, principalmente en el campo de la farmacología.

## **1.2 JUSTIFICACIÓN**

En las costas venezolanas especialmente las del oriente del país, tanto pescadores artesanales como turistas, son víctimas frecuentes de accidentes por diversos animales marinos (Boccalon y col., 2004). Sin embargo, la carencia de estadísticas epidemiológicas no permite, al presente, conocer la verdadera magnitud de la incidencia de estos casos y por ende, su relevancia (Boccalon y col., 2004; Gutierrez y col., 2004; Loyo y col., 2008). Por otro lado, debido a la falta de información sobre la actividad biológica, particularmente la del veneno de *Thalassophryne maculosa*, surgiría la necesidad de dilucidar los posibles efectos bioactivos de sus componentes, los cuales pudieran servir de base molecular en la preparación de nuevos fármacos; y al mismo tiempo, aportar conocimientos que pudiesen servir de línea base en la elaboración de un antiveneno para ésta y otras especies del género.

## 1.3 OBJETIVOS

### 1.3.1 General

Evaluar algunos efectos biológicos *in vitro* e *in vivo* del veneno del pez *Thalassophryne maculosa* (Pisces, Batrachoididae).

### 1.3.2 Específicos

- 2 Determinar el contenido de proteínas totales presentes en el veneno de *Thalassophryne maculosa*, procedente de la costa insular de la Isla de Margarita.
- 3 Estimar la  $DL_{50}$  del veneno, en el modelo animal experimental *Mus musculus*, cepa C57BL/6, para una hora de experimentación.
- 4 Evaluar el curso temporal y los signos de toxicidad aguda experimental inducidos por la inyección intraperitoneal del veneno del pez sapo *Thalassophryne maculosa*.
- 5 Determinar la posible actividad biológica (proteolítica y de fosfolipasa) *in vitro* del veneno.
- 6 Comparar la actividad biológica *in vitro* y la  $DL_{50}$  del veneno de *T. maculosa* con los datos de actividad biológica y  $DL_{50}$  del veneno de otros animales (vertebrados e invertebrados) venenosos evaluados en el Laboratorio de Toxinología de la Sección de Farmacología del Departamento de Ciencias Fisiológicas y en el Serpentario de la Sección de Medicina Tropical del Departamento de Medicina, Escuela de Ciencias de la Salud, Universidad de Oriente, Núcleo de Anzoátegui.

## CAPITULO II: MARCO METODOLÓGICO

### 2.1 Obtención y purificación parcial del veneno

Ejemplares del pez sapo *Thalassohryne maculosa* (figura 1) fueron capturados en aguas someras del Parque Nacional La Restinga, estado Nueva Esparta, Venezuela. El veneno se obtuvo por ordeño manual de las espinas dorsales y operculares. El veneno eyectado fue recogido con ayuda de una micropipeta y transferido a tubos Eppendorf de 1,5 ml; posteriormente centrifugado a 14 000 g (Labnet para tubos Eppendorf<sup>®</sup>, modelo Z180M) por 20 minutos para separar restos celulares de la fase soluble que contiene las proteínas con posible actividad farmacológica. Se realizaron diluciones del veneno, en agua bidestilada 1/5, 1/10 o 1/20 como paso previo a la cuantificación de las proteínas contenidas en el veneno.

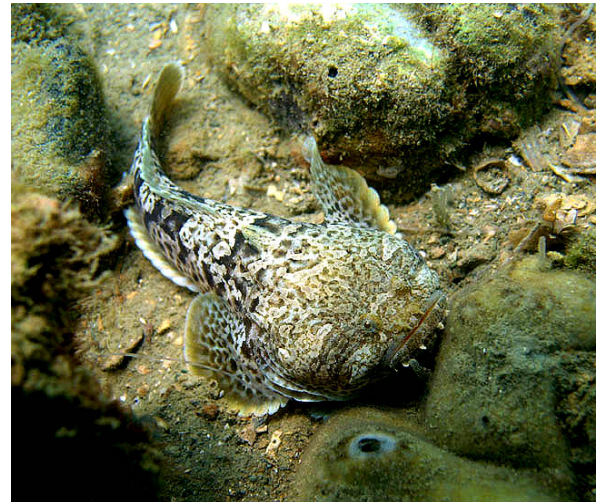
### 2.2 Cuantificación de la cantidad de proteínas del veneno

Se determinó la concentración de proteínas en la fracción soluble (obtenida en el proceso de centrifugación) mediante lectura de absorbancia en espectrofotómetro (Jenway<sup>®</sup>, modelo 6405 UV/vis) a una longitud de onda de 280 nm, asumiendo que 1 unidad de absorbancia (a esta longitud) representa una concentración de 1 mg.ml<sup>-1</sup> (Possani y col. 1980; De Sousa y col., 2009). Alícuotas de 1 ml del veneno, se almacenaron a -20 °C hasta el momento de su uso para evaluar su actividad biológica *in vitro* e *in vivo* en el modelo múrdo. Adicionalmente, se realizó un espectro de absorción del veneno a fin de evidenciar la posible presencia de otras sustancias no proteicas.



### 2.3 Determinación de la DL<sub>50</sub> y evaluación de los signos de toxicidad aguda

),



**Figura 1. fotografías de un ejemplar de pez sapo cano *Thalassophryne maculosa* (Pisces, Batrachoididae) en su habitat natural.**

Fotografías cortesía del Profesor Juan Bolaños Curvelo, Laboratorio del Grupo de Investigación en Carcinología, Escuela de Ciencias Aplicadas al Mar, Universidad de Oriente, Núcleo de Nueva Esparta.

Los lineamientos de investigación en Toxinología, utilizando animales de experimentación, según el Código Ético de la *International Society on Toxinology* (IST refrendado por sus miembros en ocasión del 6<sup>th</sup> *European Symposium on*

*Animal, Plant and Microbial Toxins* (Basle, Suiza, Agosto de 1984) estableció: (1) Disminuir al mínimo el período de sufrimiento de los animales de experimentación y no someterlos a procedimientos dolorosos extremos. (2) Utilizar el menor número posible. (3) Sólo se requerirán para investigar los mecanismos de acción de las toxinas de origen natural. (4) El uso de la  $DL_{50}$  sólo procederá, con fines científicos, para la estandarización de los venenos y de los antivenenos de origen natural. (5) En lo posible, para establecer este índice letal se debe utilizar alrededor de 12 animales, acompañando los resultados del tiempo de supervivencia y los exámenes patológicos de los ejemplares sometidos a este procedimiento. En tal sentido, el método de Dixon y Mood (1948) es uno de los más apropiados (Sevcik, 1987; De Sousa y col., 2009).

Se estableció la Dosis Letal Cincuenta ( $DL_{50}$ ), para 60 minutos de experimentación, del veneno de *Thalassophryne maculosa* por el método secuencial de Dixon y Mood (1948), modificado por Sevcik (1987) en ratones hembra, homocigotos, cepa C57BL/6 (Bioterio del IVIC) (De Sousa y col., 2009). El veneno, parcialmente purificado, fue inyectado con una microjeringa Hamilton<sup>®</sup> de 50  $\mu$ l de capacidad, por vía intraperitoneal (vip). Las dosis administradas se calcularon según el peso de cada animal experimental.

Para la administración del veneno se siguió el esquema de trabajo propuesto por De Sousa y col. (2009) y, adicionalmente, se tomaron como referencia las dosis letales calculadas para otros grupos zoológicos utilizados en la elaboración del mapa de toxicidad del veneno de vertebrados e invertebrados venenosos evaluados en el Laboratorio de Toxinología de la Sección de Farmacología del Departamento de Ciencias Fisiológicas y del Serpentario de la Sección de Medicina Tropical del Departamento de Medicina, Escuela de Ciencias de la Salud, Universidad de Oriente, Núcleo de Anzoátegui.

Tomando en cuenta la información precedente, en el primer ratón C57BL/6, por vip, se utilizó una dosis inicial de:  $X_1 = \text{Anti-log } 1,65 = 44,67 \mu\text{g.g}^{-1}$  de ratón, donde el *Anti-log* es el antilogaritmo. Si este primer animal responde con la muerte, el segundo ratón recibió una dosis  $X_2 = \text{Anti-log Dosis}(X_1) - d$ , donde  $d$  es un factor constante cuyo valor, en este caso, fue 0,05. Si el primer animal sobrevive, entonces, el segundo recibió una dosis  $X_2 = \text{Anti-log Dosis}(X_1) + d$ . El procedimiento continuó y la dosis del siguiente animal será:  $X_n = \text{Anti-log } X_m - d$ , si el animal  $m$  muere con la dosis  $X_m$ ; o bien:  $X_n = \text{Anti-log } X_m + d$ , si el ratón  $m$  sobrevive con la dosis  $X_m$ . El muestreo se detuvo al obtener una secuencia de: † 0 † 0 † 0 † 0 † ⊗, ó 0 † 0 † 0 † 0 † 0 ⊗; donde † indica muerte, 0 supervivencia y ⊗ la dosis que será administrada al siguiente animal (punto final).

Para establecer la  $DL_{50}$  se calculó la mediana de las dosis a partir del primer punto de inflexión que incluye además el valor de la dosis que recibiría el siguiente animal (punto final: ⊗). Los signos clínicos expresados como efecto de toxicidad aguda experimental inducida por la inyección intraperitoneal del veneno fueron observados meticulosamente durante los 60 minutos de experimentación y tabulados cronológicamente. La población de ratones que sobrevivió, al finalizar el tiempo establecido de observación, fue sacrificada mediante dislocación cervical. Se utilizaron animales testigo a los cuales se administró solución salina fisiológica en volúmenes similares a los del grupo experimental. Todos los animales se mantuvieron con alimentación e hidratación *ad libitum*.

#### **2.4 Determinación de la actividad proteolítica**

Un volumen de 100  $\mu\text{l}$  del veneno crudo, en conjunto con diluciones seriadas del mismo, fueron centrifugadas a 2 500 rpm por 1 min. A partir de cada dilución, se obtuvo un volumen de 20  $\mu\text{l}$  que fue colocado sobre una placa radiográfica humedecida con agua destilada. La placa radiográfica, portadora de las muestras, se

incubó a 37°C por 4 horas. Posteriormente se lavó con agua destilada para eliminar el veneno; se secó a temperatura ambiente y finalmente se evidenció la digestión de gelatina (Huang y Pérez, 1980).

Con un scanner HP ScanJet ADF se obtuvo una imagen, en formato JPG del gel radiográfico, que fue procesado con el programa Imaje J 1.28x de National Institutes of Health, para generar imágenes sometidas a filtros de color azul, rojo o verde; eligiéndose finalmente la generada por el filtro verde. La copia originada se almacenó en formato texto que contenía la localización de los diferentes píxeles de la imagen y su intensidad en escala de grises (8 bits de resolución) y luego se analizó en Mathcad versión 14.0 para componer en definitiva una imagen en falsos colores de 8 bits de resolución (256 colores).

## **2.5 Actividad de fosfolipasa**

Una emulsión de 1,5 ml fue preparada con 4 volúmenes de yema de huevo y 5 de buffer Tris HCl 0,05 M pH 7,5 CaCl<sub>2</sub> 10 mM. La emulsión fue incubada con diferentes concentraciones del veneno crudo (1, 2, 4 y 8 mg.mL<sup>-1</sup>) por 25 minutos a 37 °C y luego se cuantificó el tiempo de coagulación de la emulsión a 100°C. La actividad de fosfolipasa se expresó por el retardo en el tiempo de coagulación de la emulsión con respecto al tiempo de coagulación del control (Huatuco y col., 2004).

## **2.6 Análisis estadísticos**

El programa Excel V-5.1 (Microsoft Corporation<sup>®</sup>, 2002) se utilizó para elaborar las gráficas de las DL<sub>50</sub>. Todos los resultados experimentales se procesaron por métodos estadísticos no paramétricos: (a) se calcularon las medianas de los datos válidos a partir del punto de inflexión, según Hodges y Lehmann y sus límites de

confianza (entre paréntesis) al 95% de certeza para determinar la  $DL_{50}$  y para el tiempo de aparición de los signos de toxicidad aguda experimental y (b) las diferencias entre medianas fueron probadas por el análisis de variancia de Kruskal-Wallis, con un nivel de significación  $p < 0,05$  (De Sousa y col., 2009). Para el procesamiento de los datos por métodos estadísticos no paramétricos se utilizó el programa V-8.2 desarrollado por el Dr. Carlos Sevcik, Laboratorio de Neurofarmacología Celular, Centro de Biofísica y Bioquímica, Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC), estado Miranda, Venezuela. Finalmente, evaluó el índice de variabilidad de la  $DL_{50}$  mediante la siguiente fórmula: Índice de Variabilidad =  $(\text{Límite superior} - \text{Límite inferior}) / \text{Mediana de la } DL_{50} \times 100$ .

## **CAPITULO III: ANALISIS Y PRESENTACION DE RESULTADOS**

### **3.1 Cuantificación de la cantidad de proteínas del veneno de *Thalassophryne maculosa*, determinación de la DL<sub>50</sub> y evaluación de los signos de toxicidad aguda**

Se capturó un total de 20 ejemplares (sexo indeterminado) de *Thalassophryne maculosa* (Pisces, Batrachoididae) en aguas someras del Parque Nacional Laguna de La Restinga, estado Nueva Esparta. Después de un período de aclimatación de quince días a las condiciones del Laboratorio del Grupo de Investigación en Carcinología, Escuela de Ciencias Aplicadas al Mar, Universidad de Oriente, Núcleo de Nueva Esparta, se procedió al ordeño manual del veneno eyectado a través de las espinas dorsales y operculares de los peces. Posteriormente el veneno fue trasladado, bajo cadena de frío, al Laboratorio de Toxinología del Departamento de Ciencias Fisiológicas, Escuela de Ciencias de la Salud, Universidad de Oriente, Núcleo de Anzoátegui, donde se realizaron los ensayos experimentales.

Los 20 ejemplares eyectaron por ordeño manual 79,41 mg de proteínas en el veneno; en promedio cada uno produjo 3,97 mg. La figura 2 presenta el barrido o espectros de absorbancia realizado a una muestra de veneno de *Thalassophryne maculosa*. Los mayores niveles de absorbancia se ubicaron entre 190 y 280 nm; con una lectura máxima de 2,6 a 220 nm, indicando la naturaleza proteica del veneno.

A partir de una solución madre de veneno, conteniendo una concentración de proteínas igual 28,36 mg.mL<sup>-1</sup>, se procedió a determinar la DL<sub>50</sub> de este veneno y el

curso temporal de toxicidad aguda experimental para una hora de experimentación, por vía intraperitoneal, en ratones hembra C57BL/6.

En la tabla 1 se presenta los datos necesarios para el cálculo de las  $DL_{50}$  del veneno de *Thalassophryne maculosa*, en ratones hembra, C57BL/6, observados durante 60 minutos. El total de rator <sup>12</sup> /6 para evaluar el veneno de *Thalassophryne maculosa* fue  $n = 17$  [cor... .. siguiente animal (punto final)]. El punto de inflexión (fenómeno no muerte-muerte) se ubicó en R5. La corrida para calcular la  $DL_{50}$  fue desde R5 hasta R16 + R17 (punto final) [ $n = 13$ ]; y para evaluar los signos de toxicidad aguda experimental desde R5 hasta R16 [ $n = 12$ ]. Se utilizó un ratón control, el cual no desarrolló ninguna manifestación clínica de toxicidad posterior a la inyección de 20  $\mu$ l de solución salina al 0,9% (m/v). La cantidad total de veneno consumido en la experiencia fue de 20 768,68  $\mu$ g (20,8 mg) (tabla 1). La frecuencia de muerte en la corrida valida causada por la administración del veneno de *Thalassophryne maculosa* se presenta en la tabla 2. La mayor regularidad de muerte se observó cuando se administraron las dosis E (70,80  $\mu$ g.g<sup>-1</sup> de ratón) ( $n = 3$ ; 50,0%) y F (79,43  $\mu$ g.g<sup>-1</sup> de ratón) ( $n = 3$ ; 50,0%). Cuando se utilizó la D (63,10  $\mu$ g.g<sup>-1</sup> de ratón) no ocurrió *exitus letalis*.

La  $DL_{50}$ , para 60 minutos de observación, del veneno de *Thalassophryne maculosa*, administrado por vía intraperitoneal, en ratones C57BL/6 se presentan en la figura 3. La  $DL_{50}$  se calculó por el método no paramétrico de Hodges y Lehmann; y el resultado se presenta como la mediana y sus límites al 95% de confianza. La  $DL_{50}$  fue de 70,80 (66,95-75,12) mg.kg<sup>-1</sup>; el índice de variabilidad fue de 7,02%.

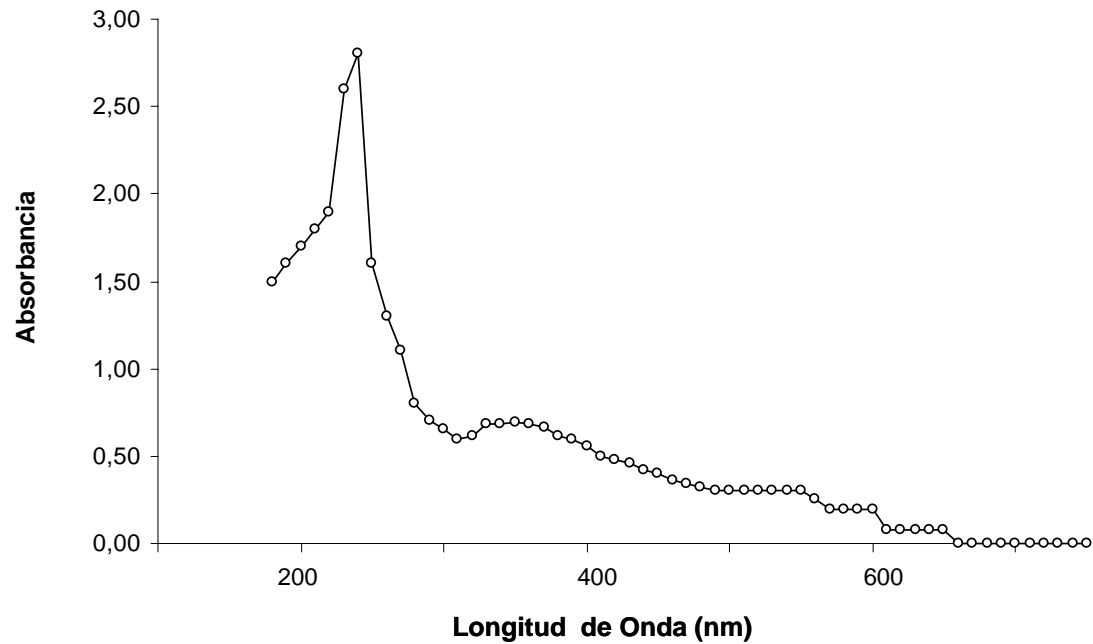
Los ratones, correspondientes a la corrida válida, presentaron hiperactividad caracterizada por movimientos bruscos y erráticos acompañados por hiperextensión de la región dorsal del animal; inmediatamente iniciaron hipoactividad y disnea caracterizada por taquipnea que evolucionó a respiración abdominal forzada y

finalmente bradipnea/apnea. En todos los ratones se observó distensión abdominal, acompañada en algunos de ellos con defecación.

El tiempo de aparición de los signos inducidos por efecto de toxicidad aguda del veneno de *Thalassophryne maculosa* fue gradual en los animales de la corrida válida (figura 4). Los signos inmediatos de toxicidad aguda, en los primeros cuatro minutos, fueron hiperactividad, seguida de taquipnea. Posterior a éstos, en el espectro medio de toxicidad moderadamente grave, entre los 10 y 20 minutos, se instalaron hipoactividad y distensión abdominal (en algunos animales se observó evacuación pastosa). Tardíamente como expresión de toxicidad grave, después de los 20 minutos, los ratones presentaron disnea caracterizada por periodos de bradipnea alternada con apnea, con cianosis peribucal, hasta finalmente la sobrevivencia o la muerte de los animales. Aunque no significativos ( $p > 0,05$ ), la bradipnea/apnea ocurrió relativamente más temprano en los ratones que murieron.

Efectos de toxicidad aguda se presentan en la figura 5: facies tóxica e hipoactividad. Los signos antes de morir fueron los periodos de bradipnea/apnea con cianosis peribucal. Todos los ratones, antes del *exitus letalis*, presentaron apnea prolongada.





**Figura 2. Barrido de absorbancia realizado a una muestra de veneno de *Thalassophryne maculosa* (Pisces, Batrachoididae).**

Los mayores niveles de absorbancia se ubicaron entre 190 y 280 nm; con una lectura máxima de 2,6 a 220 nm, indicando la naturaleza proteica del veneno de *Thalassophryne maculosa*.

**Tabla 1. Datos para el cálculo de la DL<sub>50</sub> del veneno de *Thalassophryne maculosa* en ratones C57BL/6, administrado por vía intraperitoneal, para una hora de observación.**

RATÓN (n)	PESO (g)	DOSIS (Anti-Log)	DOSIS (µg.gr <sup>-1</sup> )	DOSIS TOTAL (µg)	VOLUMEN (µl)	MUERTE (minutos)	
CORRIDA NO VÁLIDA							
1	17,20	A	1,6	44,67	768,30	27,1	0
2	19,56	B	1,7	50,12	980,32	34,6	0
3	21,20	C	1,7	56,23	1.192,16	42,0	0
4	20,20	D	1,8	63,10	1.274,62	66,9	0
				Sub-total	4.215,40		
CORRIDA VÁLIDA							
5	18,47	E	1,	70,79	1.307,58	46,1	†: 58
6	19,20	D	1,	63,10	1.211,52	42,7	0
7	20,40	E	1,	70,79	1.444,12	50,9	†: 56
8	20,00	D	1,	63,10	1.262,00	44,5	0
9	19,90	E	1,	70,79	1.408,72	49,7	0
10	18,40	F	1,	79,43	1.461,56	51,5	†: 52
11	20,90	E	1,	70,79	1.479,51	52,2	0
12	18,40	F	1,	79,43	1.461,56	51,5	†: 58
13	18,60	E	1,	70,79	1.313,16	46,3	†: 59
14	20,50	D	1,	63,10	1.291,02	45,5	0
15	19,70	E	1,	70,79	1.395,27	49,2	0
16	18,90	F	1,	79,43	1.497,26	52,8	†: 56
				Sub-total	16.553,28		
				Total	20.768,68		
SIGUIENTE ANIMAL							
17		E	1, 85	70,79			⊗

Ratones válidos: R<sub>5</sub>→R<sub>16</sub> + R<sub>17</sub>

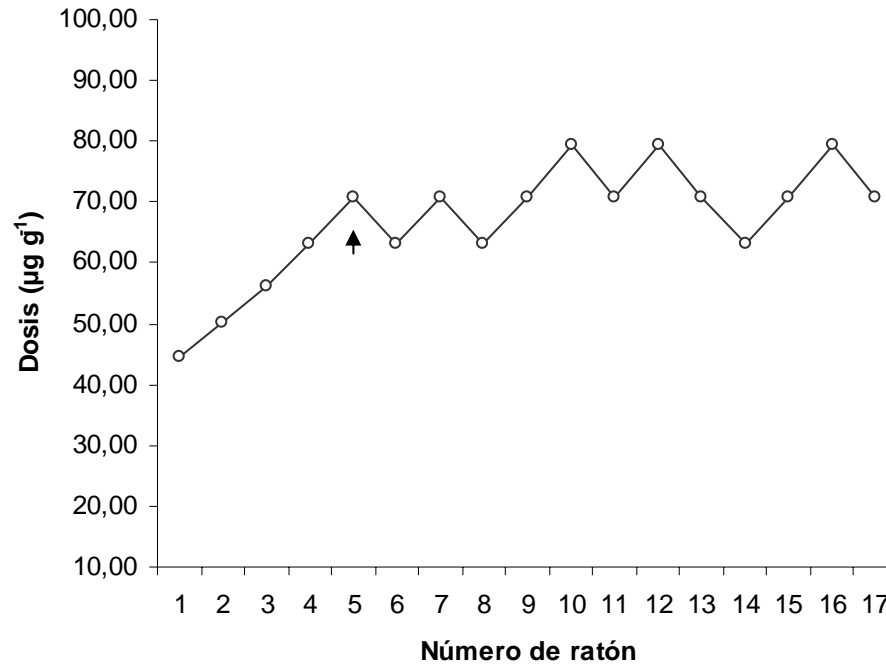
†: Ratón con *exitus letales*; 0: Supervivencia; ⊗: Punto

**Tabla 2. frecuencia de muerte y Secuencia de dosis administradas, por vía intraperitoneal, del veneno de *Thalassophryne maculosa* en el modelo múrdo C57BL/6.**

RATÓN	Anti-log Dosis ( $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ de ratón)					
	DOSIS A	DOSIS B	DOSIS C	DOSIS D	DOSIS E	DOSIS F
	1,65 (44,67)	1,70 (50,12)	1,75 (56,23 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ )	1,80 (63,10 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ )	1,85 (70,80)	1,90 (79,43 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ )
CORRIDA NO VÁLIDA						
1	0					
2		0				
3			0			
4				0		
CORRIDA VÁLIDA						
5					†: 58	
6				0		
7					†: 56	
8				0		
9					0	
10						†: 52
11					0	
12						†: 58
13					†: 59	
14				0		
15					0	
16						†: 56
SIGUIENTE ANIMAL						
10					⊗	
FRECUENCIA						
DE MUERTE [†]				0	3	3
CORRIDA VÁLIDA				(0,0 %)	(50,0 %)	(50,0 %)
n = 6 (100%)						

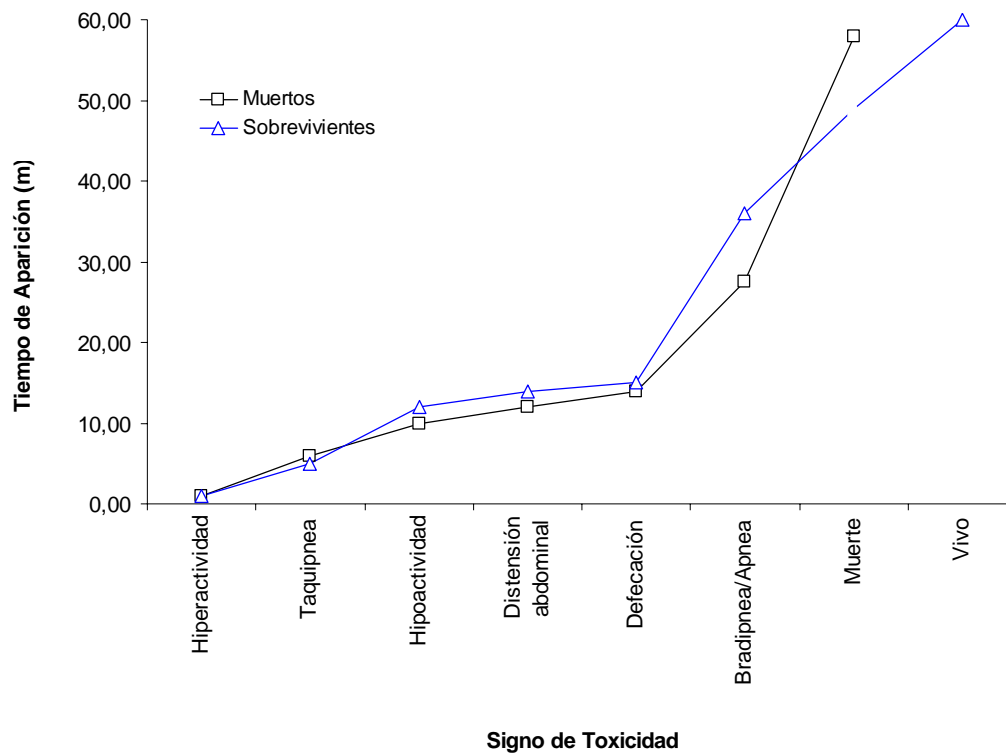
Ratones válidos: R<sub>5</sub>→R<sub>16</sub> + R<sub>17</sub>

†: Ratón con *exitus letales*; 0: Sobrevivencia; ⊗: Punto

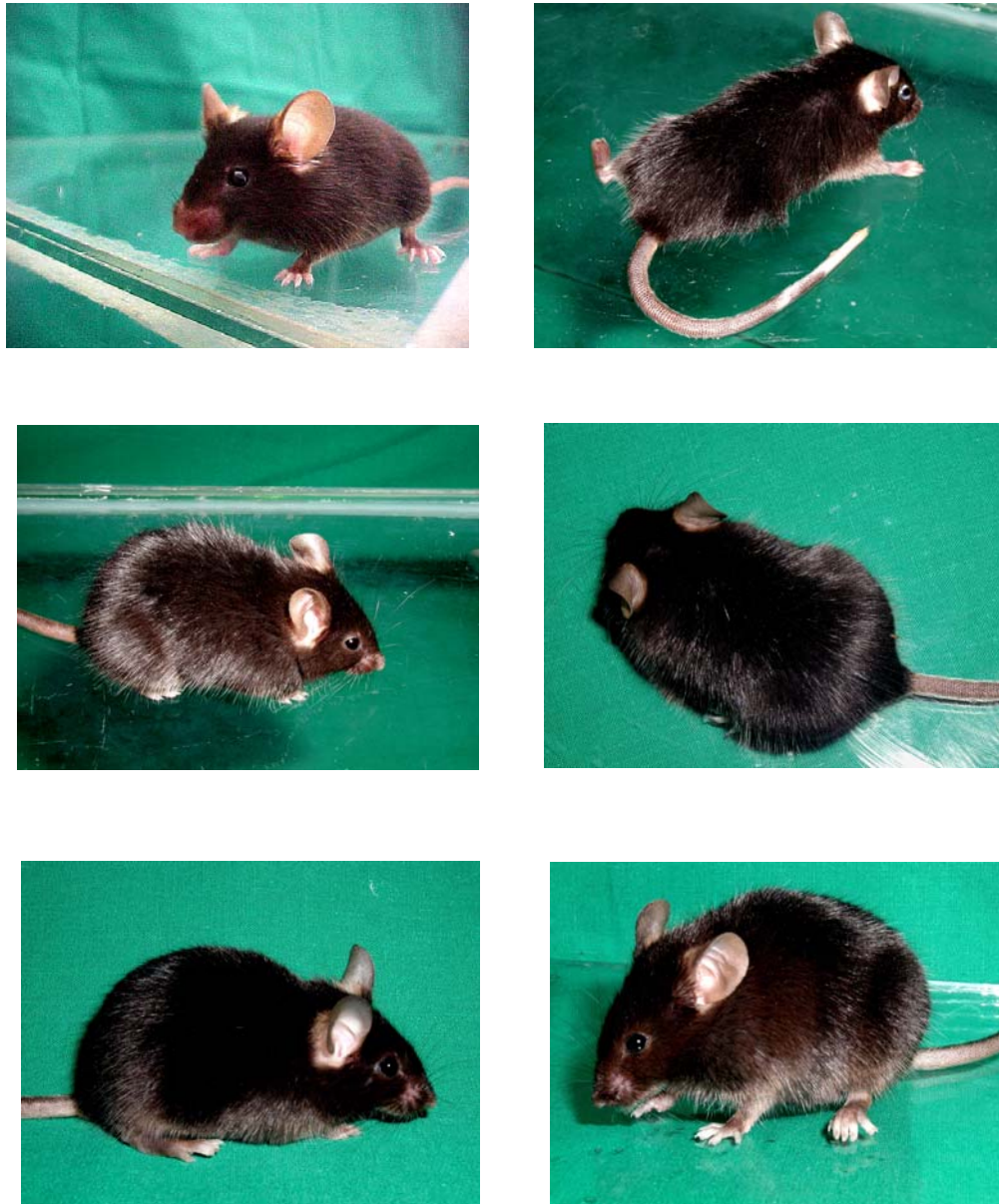


**Figura 3. Determinación de la dosis letal cincuenta ( $DL_{50}$ ) del veneno de *Thalassophryne maculosa* (Pisces, Batrachoididae) por vip en ratones hembra C57BL/6.**

La flecha indica el punto de inflexión e inicio de los datos válidos para el cálculo de la  $DL_{50}$ . El resultado se presenta como la mediana y sus límites para un 95% de confianza (entre paréntesis):  $DL_{50}$ , vip, 60 minutos = 70,80 (66,95 – 75,12)  $\mu\text{g g}^{-1}$  de ratón. Índice de Variabilidad = 7,02%.



**Figura 4. Comparación del curso temporal de toxicidad aguda experimental entre ratones fallecidos y sobrevivientes sometidos al veneno de *Thalassophryne maculosa* (Pisces, Batrachoididae) por vip en ratones hembra C57BL/6.**



**Figura 5. Comparación de un ratón C57BL/6 control con uno sobreviviente inyectado, por vip, con el veneno *Thalassophryne maculosa* (Pisces, Batrachoididae) mostrando signos de toxicidad aguda.**

(a) Ratón testigo (sano). (b), (c) y (d) Postura de hipoactividad mostrando debilidad muscular del tren posterior. En (c), (d) y (f) Distensión abdominal. (f) Facies tóxica y distensión abdominal.

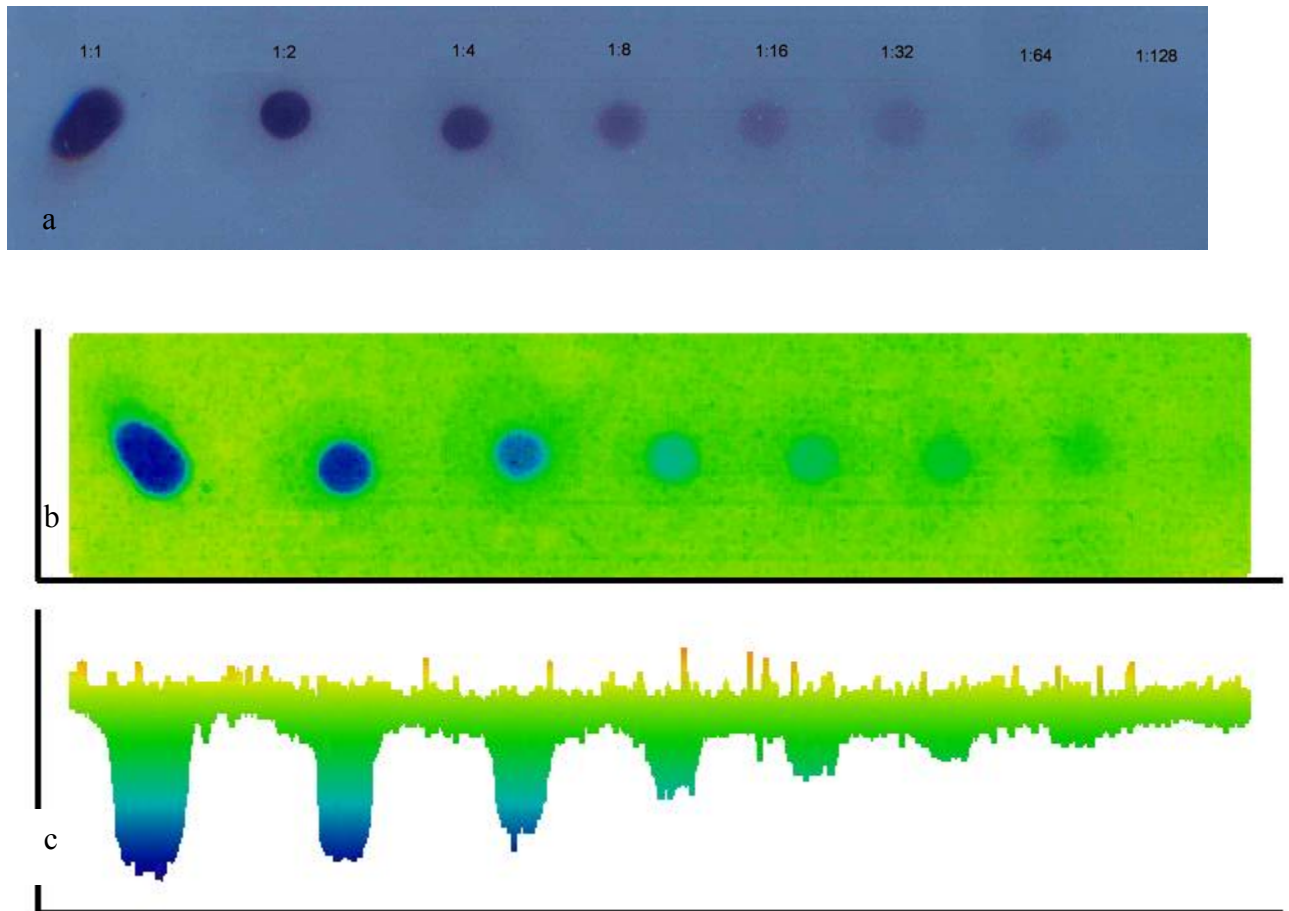
### 3.2 Actividad biológica (fosfolipasa y proteolítica) del veneno de *Thalassophryne maculosa*

Cuando se estudió la actividad fosfolipasa, solo se detectó retardo en el tiempo de coagulación con la mayor concentración del veneno crudo (8mg/mL) con respecto al control (tabla 3).

**Tabla 3. Tiempos de coagulación de las muestras sometidas a diferentes concentraciones del veneno de *Thalassophryne maculosa* para la determinación de actividad fosfolipasa.**

Tratamiento	Control	1,0 mg.mL <sup>-1</sup>	2,0 mg.mL <sup>-1</sup>	4,0 mg.mL <sup>-1</sup>	8,0 mg.mL <sup>-1</sup>
Tiempo de Coagulación	15 s	15 s	15 s	15 s	48 s

La actividad proteolítica del veneno de *Thalassophryne maculosa* (Pisces, Batrachoididae) se estudió con diluciones sucesivas, colocadas sobre gel radiográfico para evidenciar la digestión de la gelatina (figura 6). El proceso digestivo ocurrió hasta una dilución 1/64 (figura 6a). La imagen en falsos colores de 8 bits de resolución generada con Mathcad versión 14.0 se presenta en la figura 5b y 5c; indicando actividad hasta 1/64 (figura 6b), disminuyendo la potencia proteolítica con la progresión de la diluciones (figura 6c); demostrado mediante análisis de regresión logarítmica o exponencial, con alto grado de correlación [ $R^2 = 0,97$  (logarítmica) y  $R^2 = 0,98$  (exponencial)] (figura 7).

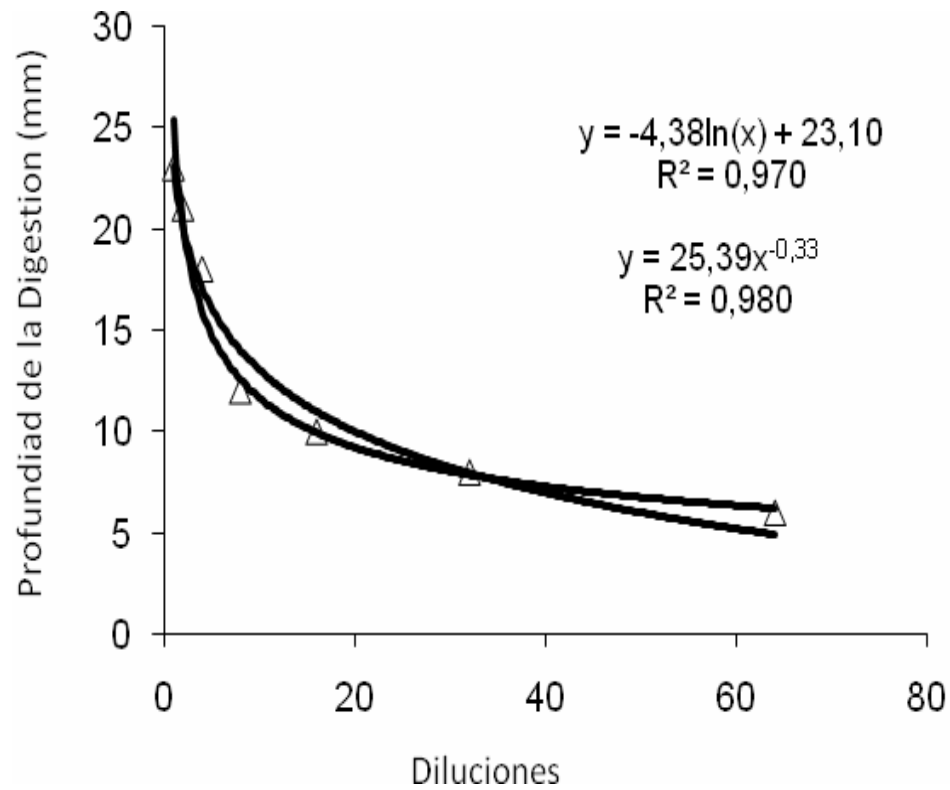


**Figura 6. actividad proteolítica del veneno *Thalassophryne maculosa* sobre placa radiográfica.**

(a) Imagen del gel radiográfico obtenido con un scanner HP ScanJet ADF. (b) y (c) Imagen en falsos colores de 8 bits de resolución generada con Mathcad versión 14.0 (a, vista inferior), (c, vista lateral)

La imagen obtenida del gel radiográfico (figura 6a) se procesó con el programa Imaje J 1.28x (National Institute of Health). Con este programa se generaron imágenes con filtros de color azul, rojo o verde; eligiendo la generada por el filtro verde. Ésta se almacenó en formato texto y luego ser analizó mediante Mathcad versión 14.0 para componer una imagen en falsos colores de 8 bits de resolución (figura 6b, vista inferior; figura 6c, vista lateral).





**Figura 7. REGRESIÓN LOGARITMICA Y EXPONENCIAL DE LA ACTIVIDAD PROTEOLÍTICA DEL VENENO *Thalassophryne maculosa* SOBRE PLACA RADIOGRÁFICA.**

### **3.3 Comparación de la actividad biológica *in vivo* e *in vitro* del veneno de *Thalassophryne maculosa* con el veneno de otros animales vertebrados e invertebrados**

A fin de comparar, en las tablas 4 y 5 se presenta un resumen de trabajos previos donde se determinó la dosis letal  $DL_{50}$  del veneno de diferentes especies de serpientes y escorpiones. Para cada especie, la  $DL_{50}$  se estableció, por vía intraperitoneal, por el método de Dixon y Mood (1948) modificado (Sevcik, 1987). Los valores se fijaron para 60 minutos de observación, en ratones hembra de la cepa C57BL/6, y fueron obtenidos en las secciones de Medicina Tropical (Departamento de Medicina Interna) y de Farmacología (Departamento de Ciencias Fisiológicas) de la Escuela de Ciencias de la Salud, Universidad de Oriente, Núcleo de Anzoátegui.

La comparación del índice letal del veneno de *T. maculosa* con el de otros vertebrados (tabla 4) o invertebrados (tabla 5) demuestra una baja potencia letal del veneno del pez sapo cano con respecto a la  $DL_{50}$  del grupo de las serpientes o de los artrópodos, con excepción del escorpión *Rhopalurus laticauda*.

El veneno de *T. maculosa* posee leve actividad proteolítica; ligeramente más potente que la exhibida por los venenos de *Crotalus durissus ruruima* y *Crotalus durissus pifanorum*, a pesar de estas últimas presentar la mayor potencia letal (tabla 6, figura 8).

**Tabla 4. COMPARACIÓN DE LA DL<sub>50</sub> DEL VENENO DE *Thalassophryne maculosa* CON EL VENENO de varias especies de vertebrados venezolanos, determinadas, en la Escuela de Ciencias de la Salud, Universidad de Oriente, Núcleo de Anzoátegui, por el método de Dixon y Mood (1948).**

ESPECIE	DL <sub>50</sub> (mg.kg <sup>-1</sup> ) <sup>1)</sup>	LÍMITES DE CONFIANZA ( 95%)	REFERENCIA
<i>Thalassophryne maculosa</i>	<b>70,80</b>	<b>66,95-75,12</b>	<b>Este trabajo</b>
<i>Porthidium lansbergii rozei</i>	29,90		Alemán, Cotúa y Farias, 2009
<i>Lachesis muta muta</i>	22,39	21,17-22,53	Sánchez y Suárez, 2008
<i>Porthidium lansbergii hutmanni</i>	18,87		Alemán, Cotúa y Farias, 2009
	18,86 (a)	18,86-19,95	
<i>Bothrops colombiensis</i>	14,99 (b)	14,99-15,85	Ruiz Chópite y Ruiz Chópite, 2009
	12,59 (c)	11,91-12,59	
<i>Bothriechis schlegelii</i>	16,96	14,99-16,82	Bónoli, Chihane y Ferreira, 2009
<i>Bothrops colombiensis</i>	16,82	15,85-17,78	Astudillo y Bejarano, 2008
<i>Bothrops venezuelensis</i>	15,84	14,98-16,81	Blanco y Rojas, 2005
<i>Crotalus durissus vegrandis</i>	12,58	11,90-13,35	Valerio, 2007
<i>Crotalus durissus cumanensis</i>	10,60	10,00-11,20	Baldi y Chalhoub, 2007
<i>Crotalus durissus pifanorum</i>	8,43	7,94-8,43	Acosta, Cayamo y Graziani, 2008
<i>Crotalus durissus ruruima</i>	3,16	2,84-3,40	Cazorla, Quijada y Salazar, 2009
			Arrijoja y Maneiro, 2009

*Bothrops colombiensis* capturados en: (a) Barlovento, Miranda; (b) San Felipe, Yaracuy; (c) Santa Bárbara, Barinas

**Tabla 5. COMPARACIÓN DE LA DL<sub>50</sub> DEL VENENO DE *Thalassophryne maculosa* CON EL VENENO de varias especies de escorpiones venezolanos de la familia *buthidae* determinadas, en la Escuela de Ciencias de la Salud, Universidad de Oriente, Núcleo de Anzoátegui, por el método de Dixon y Mood (1948).**

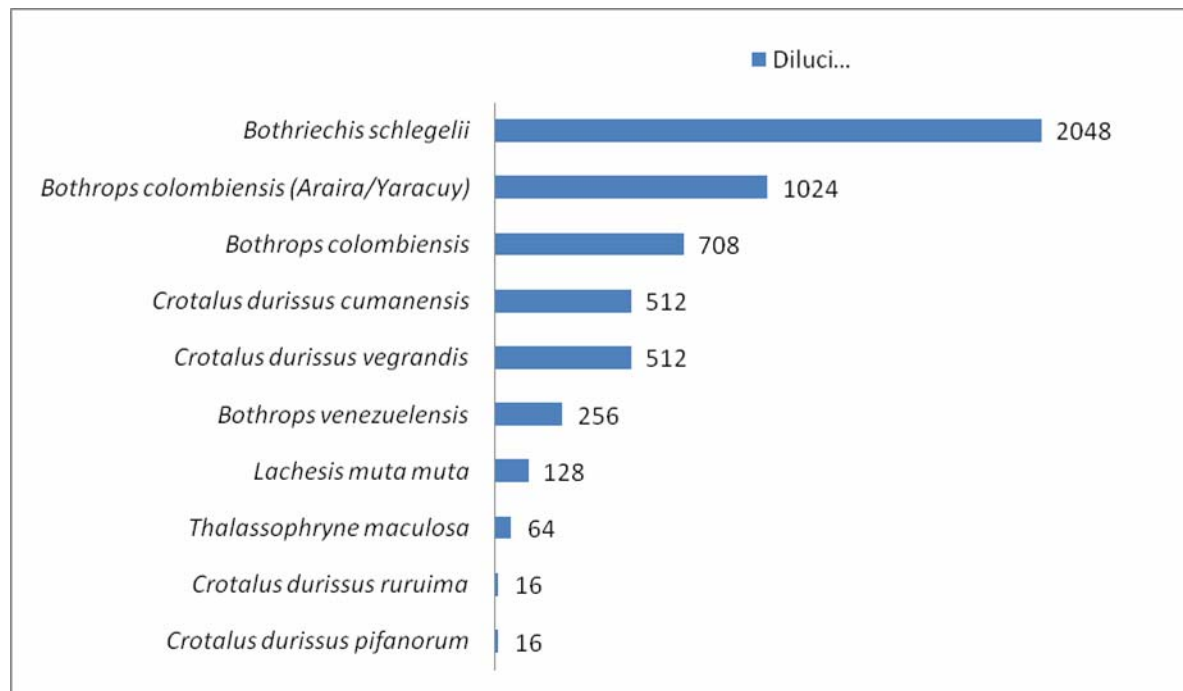
<i>ESPECIE</i>	DL <sub>50</sub> (mg.kg <sup>-1</sup> ) <sup>1)</sup>	LÍMITES DE CONFIANZA ( 95%)	REFERENCIA
<i>Rhopalurus laticauda</i>	106,01 (a)	100,00-112,95	Boadas y Marcano, 2004
<b><i>Thalassophryne maculosa</i></b>	<b>70,80</b>	<b>66,95-75,12</b>	<b>Este trabajo</b>
<i>Tityus zulianus</i>	14,13 (b)	13,36-14,22	Cova, 2008
<i>Tityus tenuicauda</i>	12,59 (c)	11,91-13,36	Cornejo, 2008
<i>Tityus gonzalespongai</i>	11,91 (d)	11,22-12,59	De Sousa y col., 2009
<i>Tityus discrepans</i>	11,22 (e)	10,61-11,91	Cova, 2008
<i>Tityus quirogae</i>	14,99 (f)	14,13-14,99	De Sousa, 2006
	12,59 (g)	11,91-13,36	De Sousa, 2006
	10,61 (h)	10,00-11,22	De Sousa, 2006
	10,00 (i)	9,46-10,60	Marcano y Mundaray, 2000
<i>Tityus nororientalis</i>	9,46 (j)	8,91-9,46	De Sousa Insana y Pino, 2009
			Chadee, 2010
<i>Tityus nororientalis</i>	9,46 (k)	9,46-10,00	Turkali, 2004
	8,43 (l)	7,94-8,91	Cova, 2008
	8,43 (m)	7,94-8,91	Marín y Rodríguez, 2000

Escorpiones capturados en: (a) municipio Bolívar, noreste de Anzoátegui; (b) Santa Cruz de Mora, Mérida; (c) Las Melenas, municipio Mariño, Sucre; (d) La Piedra de Mundo Nuevo, municipio Freites, Anzoátegui; (e) San Antonio de Los Altos, municipio Los Salias, Miranda; (f) Sima Los Escorpiones, El Toyano, municipio Sotillo, Anzoátegui; (g) El Toyano, municipio Sotillo, Anzoátegui; (h) La Guanota, municipio Caripe, Monagas; (i) La Guanota, municipio Caripe, Monagas; (j) Catuaro, municipio Ribero, Sucre; (k) El Toyano, municipio Sotillo, Anzoátegui; (l) Las Melenas, municipio Mariño, Sucre; (m) Sabana de Piedra, municipio Caripe, Monagas.

**Tabla 6. COMPARACIÓN DE LA actividad proteolítica sobre placa radiográfica DEL VENENO DE *Thalassophryne maculosa* CON EL VENENO de varias especies de serpientes venezolanas, determinadas en la Escuela de Ciencias de la Salud, Universidad de Oriente, Núcleo de Anzoátegui, por el método de huang y perez (1980).**

ESPECIE	DILUCIÓN	REFERENCIA
<i>Bothriechis schlegelii</i>	1/2 048	Bónoli, Chihane y Ferreira, 2009
<i>Bothrops colombiensis</i> (a), (b)	1/1 024	Ruiz Chópite y Ruiz Chópite, 2009
<i>Bothrops colombiensis</i>	1/708	Astudillo y Bejarano, 2008
<i>Crotalus durissus</i> <i>cumanensis</i>	1/512	Baldi y Chalhoub, 2007
<i>Crotalus durissus vegrandis</i>	1/512	Valerio, 2007
<i>Bothrops venezuelensis</i>	1/256	Blanco y Rojas, 2005
<i>Lachesis muta muta</i>	1/128	Sánchez y Suárez, 2008
<b><i>Thalassophryne maculosa</i></b>	<b>1/64</b>	<b>Este trabajo</b>
<i>Crotalus durissus ruruima</i>	1/16	Cazorla, Quijada y Salazar, 2009
<i>Crotalus durissus pifanorum</i>	1/16	Acosta, Cayamo y Graziani, 2008

*Bothrops colombiensis* capturados en: (a) Barlovento, Miranda; (b) San Felipe, Yaracuy.



**Figura 8. COMPARACIÓN GRÁFICA DE LA actividad proteolítica DEL VENENO DE *Thalassophryne maculosa* CON EL de varias especies de serpientes venezolanas de la familia viperidae, determinadas en la Escuela de Ciencias de la Salud, Universidad de Oriente, Núcleo de Anzoátegui.**

La actividad proteolítica de los venenos se evidenció con base en la digestión de gelatina de la placa radiográfica por el método de Huang y Pérez (1980), luego de 4 horas de incubación, en cámara húmeda, a 37°C.

### 3.4 Discusión

El envenenamiento causado por el pez sapo cano *Thalassophryne maculosa*, produce manifestaciones clínicas fundamentalmente inflamatorias, desarrollando ocasionalmente necrosis en el sitio de penetración del veneno (Sosa-Rosales y cols., 2005); siendo dichas manifestaciones directamente proporcionales a las propiedades intrínsecas tanto del pez como de la víctima.

El modelo de ratones utilizados en el presente trabajo, fueron de sexo hembra, homocigotos, cepa C57BL/6 a los cuales se administró el veneno de *Thalassophryne maculosa*, vía intraperitoneal, para su estudio. Se escogió dicha cepa de ratones dado que posee mayor sensibilidad a la acción del veneno de vertebrados e invertebrados. El resultado obtenido en este trabajo es compatible con los obtenidos en otras investigaciones sobre envenenamiento agudo experimental con el veneno de otros grupos zoológicos (escorpiones y serpientes) (Sánquiz y González, 2008; Da Cámara y col., 2008; Hurtado y col., 2008; Arrijoja y Maneiro, 2009).

Es evidente el efecto necrótico causado por el veneno de *Thalassophryne maculosa*, independientemente que la víctima reciba asistencia médica o no, lo que permite pensar sobre la posible presencia de actividad fosfolipásica en el mismo; sin embargo, tal actividad no ha sido reportada en trabajos previos realizados con el veneno de esta especie (Sosa Rosales y col., 2005) y con el de *Thalassophryne nattereri* (Lopes-Ferreira y col. 1998). Estas divergencias pueden fundamentarse en el posible tratamiento de las muestras, ya que además de la termolabilidad de las proteínas presentes en venenos de vertebrados marinos, éstas presentan elevada susceptibilidad a factores físicos que deben cuidarse desde el momento de extracción del veneno. Por otro lado, es posible que ocurra un fenómeno similar al observado en el veneno de serpientes, en los que las fosfolipasas responsables de las necrosis no

necesariamente poseen alta actividad enzimática. Como ejemplos de esto se puede mencionar el caso del veneno de *Bothrops alternatus* que posee una fosfolipasa ácida con actividad muy baja (Nisembon y col., 1986) o el de las fosfolipasas A<sub>2</sub> lisina-49 que se encuentran en gran cantidad en muchas especies de *Bothrops*, que no poseen actividad tipo fosfolipásica (Gutiérrez y Lomonte, 1995).

La actividad proteolítica observada en el veneno analizado, también se ha evidenciado en otros peces como *Notesthes robusta* (Hahn y O'Connor, 2000), *Scorpaena plumieri* (Carrizo y col., 2005), *Pterios volitans* (Balasubashini y col., 2006) y en las rayas *Potamotrygon* cf. *scobina* y *Potamotrygon* gr. *orbignyi*. En todos estos vertebrados marinos tal actividad ha sido relativamente leve; sin embargo, se ha demostrado que la interacción del veneno con el mucus epidérmico, incrementa significativamente la actividad necrosante, lo que pudiera indicar que las proteínas presentes en el mucus, potencian el efecto tóxico del veneno (Magalhaes y col., 2006)

Al comparar la DL<sub>50</sub> del veneno de *Thalassophryne maculosa* (70,80 mg/kg<sup>-1</sup> de ratón) con las serpientes del género *Crotalus*, se evidenció que el veneno del pez fue 22,41; 8,40; 6,68 y 5,63 veces menos potente que el de *Crotalus durissus ruruima*, *Crotalus durissus pifanorum*, *Crotalus durissus cumanensis* y *Crotalus durissus vegrandis*, respectivamente. De igual forma, se pudo observar que su potencial toxigénico es 4 veces menor que los venenos del género *Bothrops* presentados en la tabla 4. Sin embargo, los signos de toxicidad presentados por los ratones luego de ser inyectados con el veneno del pez, son similares a los observados en los vipéridos botrópicos, los cuales muestran hipoactividad, distensión abdominal, en comparación con las manifestaciones neurológicas (mioclonias, convulsiones tónico-clónicas, parálisis en extensión del tren posterior, fasciculaciones musculares, contractura de la cola, giros sobre su eje y atonías) inducidas por el veneno de crotálicos en el modelo C57BL/6 (Blanco y Rojas, 2005; Baldi y Chalhoub, 2007; Valerio, 2007; Acosta, Cayamo y Graziani, 2008; Astudillo y Bejarano, 2008; Sánchez y Suárez, 2008;



Alemán, Cotúa y Farias, 2009; Arrijoja y Maneiro, 2009; Bónoli, Chihane y Ferreira, 2009; Cazorla, Quijada y Salazar, 2009). La toxicidad del veneno de *Thalassophryne maculosa*, no induce signos de activación autonómica parasimpática y simpática como la observada con el veneno de escorpiones del género *Tityus* (Marcano y Mundaray, 2000; Marín y Rodríguez, 2000; Turkali, 2004; De Sousa, 2006; Cornejo, 2008; Cova, 2008; De Sousa-Insana y Pino, 2009; De Sousa y col., 2009; Chadee, 2010). Estos comportamientos, permiten incluir al envenenamiento por el pez sapo como mecanismo de acción local, según la clasificación propuesta por Junghanss y Bodio (2006). Con el veneno de *Thalassophryne maculosa* no se evidenció, en ninguno de los animales experimentales, el desarrollo de marcha atáxica, convulsiones, fasciculaciones/temblores musculares o parálisis espástica.

Los antecedentes descritos, podrían representar una razón que pudiera explicar el desconocimiento de casos de muertes por accidentes con el pez sapo, sin embargo su potencia es suficiente para causar molestias localizadas, considerables sobre la víctima, pudiendo esta última incurrir en inasistencias laborales. Para finalizar, nuestros resultados dejarían en evidencia la potencialidad toxigénica del veneno de *Thalassophryne maculosa*; y simultáneamente, basados en la revisión bibliográfica realizada, es posible que tal actividad biológica, guarde relación con la interacción entre los componentes proteicos del veneno o con la constitución del mismo. Esta última, abre la posibilidad de profundizar estudios que permitan identificar las moléculas bioactivas que pudieran servir de prototipo en la elaboración de nuevos fármacos.

## CAPITULO IV: CONCLUSIONES

### 4.1 CONCLUSIONES

Cada ejemplar de *Thalassophryne maculosa* eyectó, en promedio, 3,27 mg.

La lectura máxima en los niveles de absorbancia a 220 nm indica la naturaleza proteica del veneno.

La  $DL_{50}$  del veneno de *Thalassophryne maculosa* según el método de Dixon y Mood para 60 minutos de observación fue 70,80(66,95-75,12)  $mg.kg^{-1}$ .

Se observaron un total de 8 manifestaciones clínicas inducidas por el veneno de *Thalassophryne maculosa* en ratones C57BL/6; con aparición gradual en el curso temporal de toxicidad aguda. Los signos inmediatos de toxicidad aguda fueron hiperactividad seguida de taquipnea, entre 10 y 20 minutos se evidenció hipoactividad, distensión abdominal y en algunos animales evacuación pastosa; posteriormente se instalaron signos de toxicidad grave caracterizados por bradipnea alternada con apnea, cianosis peribucal y facies tóxica hasta finalmente la sobrevivencia o muerte de los animales.

No se observaron diferencias significativas al comparar el tiempo de aparición de los signos de toxicidad grave entre los ratones que murieron y los que sobrevivieron.

La actividad proteolítica expresada en la placa radiológica se evidenció hasta una dilución de 1:64.

El veneno de *Thalassorhynchus maculosa* presentó actividad fosfolipasa leve

El veneno de *Thalassorhynchus maculosa* resultó débilmente tóxico comparación con otras especies de vertebrados e invertebrados; con excepción índice letal calculado para *R. laticauda*.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1
- 2 Acosta L., Cayamo Y., Graziani D. 2008. Efectos biológicos y DL<sub>50</sub> del veneno de *Crotalus durissus pifanorum*. Estudio comparativo entre ejemplares juveniles y adultos en el modelo mürido C57BL/6. Trabajo de Grado para optar al título de Médico-Cirujano, Departamento de Medicina Interna, Escuela de Ciencias de la Salud, Universidad de Oriente, Núcleo de Anzoátegui.
- 3 Arrijoja A., Maneiro F. 2009. Variabilidad genérica de la susceptibilidad al veneno de cuatro subespecies de cascabeles venezolanas en ratones C57BL/6. Trabajo de Grado para optar al título de Médico-Cirujano, Departamento de Medicina Interna, Escuela de Ciencias de la Salud, Universidad de Oriente, Núcleo de Anzoátegui.
- 4 Astudillo Y., Bejarano M. 2008. Efectos biológicos y Dosis Letal Cincuenta (DL<sub>50</sub>) del veneno de *Bothrops colombiensis* (Serpentes, Viperidae). Estudio comparativo entre ejemplares juveniles y adultos. Trabajo de Grado para optar al título de Médico-Cirujano, Departamento de Medicina Interna, Escuela de Ciencias de la Salud, Universidad de Oriente, Núcleo de Anzoátegui.
- 5 Balasubashini M., Karthigayan S, Somasundaram ST. Balasubramanian T, Viswanathan P, Menon VP. 2006. In Vivo and In Vitro Characterization of the Biochemical and Pathological Changes Induced By Lionfish *Pterios volitans* Venom in Mice. *Toxicology Mechanisms and Methods*, 16(9): 525-531
- 6 Baldi P., Chalhoub Y. 2007. Efectos biológicos y DL<sub>50</sub> del veneno de *Crotalus durissus cumanensis*. Estudio comparativo entre ejemplares juveniles y adultos. Trabajo de Grado para optar al título de Médico-Cirujano, Departamento de

Medicina Interna, Escuela de Ciencias de la Salud, Universidad de Oriente, Núcleo de Anzoátegui.

- 7 Beccari E. 1949. A method for reducing the number of pharmacological assays. *Nature*, 163: 534.
- 8 Blanco M., Rojas A. 2005. Efectos biológicos del veneno de *Bothrops venezuelensis* (Serpiente Tigra Mariposa), juveniles y adultas. Trabajo de Grado para optar al título de Bachiller en Ciencias, Cátedra de Metodología de la Investigación, U. E. Nuestra Señora de Lourdes II, Puerto La Cruz.
- 9 Boadas J., Marcano J. 2004. Cuantificación del volumen, cantidad de proteínas y evaluación de la toxicidad del veneno de *Rhopalurus laticauda* (Scorpiones: Buthidae). Trabajo de Grado para optar al título de Médico-Cirujano, Departamento de Ciencias Fisiológicas, Escuela de Medicina, Universidad de Oriente, Núcleo de Anzoátegui. <sup>33</sup>
- 10 Boccalon Y., Gamero D., Romero D. 2004. Antecedentes de envenenamientos por especies marinas en los pescadores de las costas del estado Anzoátegui, y playas aledañas de Sucre, julio-diciembre de 2003. Trabajo de Grado, Escuela de Medicina, Universidad de Oriente, Núcleo de Anzoátegui, Barcelona.
- 11 Bónoli A., Chihane C., Ferreira J. 2009. Efectos biológicos (proteolítico y procoagulante) *in vitro* y  $DL_{50}$  sobre el modelo múrido C57BL/6 del veneno de *Bothriechis schlegelii* (Serpentes, Viperidae). Trabajo de Grado para optar al título de Farmacéutico, Facultad de Farmacia, Universidad Santa María, Núcleo Oriente.

- 12 Carrijo L., Andrich F., De Lima M., Cordeiro M., Richardson M., Figueredo S. 2005. Biological properties of the venom from the scorpionfish (*Scorpaena plumieri*) and purification of a gelatinolytic protease. *Toxicon*, 45: 843-850.
- 13 Cassoli J., Andrich F., Ferraz K., De Lima M., Block C., Cordeiro M., Richardson M., Figueredo S. 2007. Purification and partial characterization of a hyaluronidase (SpH) from the venom of the scorpionfish *Scorpaena plumieri*. *Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases*, 13: 269.
- 14 Cazorla M., Quijada D., Salazar D. 2009. Efectos biológicos y dosis letal 50 (DL<sub>50</sub>) del veneno de *Crotalus durissus ruruima* en tres modelos múridos. Trabajo de Grado para optar al título de Médico-Cirujano, Departamento de Medicina Interna, Escuela de Ciencias de la Salud, Universidad de Oriente, Núcleo de Anzoátegui.
- 15 Chadee, R. 2010. Evaluación de la actividad biológica del veneno de ejemplares machos y hembras de *Tityus nororientalis* (Scorpiones, Buthidae) en el modelo múrido C57BL/6. Trabajo de Grado para optar al título de Licenciada en Bioanálisis. Departamento de Bioanálisis, Escuela de Ciencias, Universidad de Oriente, Núcleo de Sucre.
- 16 Cornejo P. Registro de *Tityus tenuicauda* Prendini, 2001 (Scorpiones, Buthidae) para Venezuela. Aspectos farmacológicos de su veneno. 2008. Trabajo de Grado para optar al título de *Magister Scientiarum*, Postgrado en Biología Aplicada, Escuela de Ciencias, Universidad de Oriente, Núcleo de Sucre.
- 17 Cova Y. 2008. Evaluación de la actividad biológica del veneno de tres especies venezolanas de importancia médica del género *Tityus* (Scorpiones, Buthidae).

Trabajo de Grado para optar al título de Licenciada en Bioanálisis. Departamento de Bioanálisis, Escuela de Ciencias, Universidad de Oriente, Núcleo de Sucre.

- 18 De Sousa L. 2006. Especie nueva de *Tityus* (Scorpiones, Buthidae) de la Serranía del Turimiquire, Nororiente de Venezuela. Caracterización morfológica, geográfica y toxinológica. Trabajo de Ascenso a Profesor Asociado, Departamento de Ciencias Fisiológicas, Escuela de Medicina, Universidad de Oriente, Núcleo de Anzoátegui.
- 19 Da Cámara, N.; Rivas, R. y Rojas, P. 2008. Evaluación de la actividad biológica y dosis letal cincuenta (DL<sub>50</sub>) del veneno de *Tityus nororientalis* (Scorpiones, Buthidae) en ratones NMRI. Trabajo de Pregrado, Departamento de Ciencias Fisiológicas, Universidad de Oriente, Barcelona.
- 20 De Sousa L., Parrilla-Álvarez P., Pérez Di Gaeta P., Romero L., Quiroga M. 2009. Evaluación de la actividad biológica del veneno de *Tityus gonzalespongai* (Scorpiones, Buthidae) en el modelo C57BL/6. *Saber*, 21: 50-62.
- 21 De Sousa-Insana L., Pino O. 2009. Estudio comparativo de la actividad biológica del veneno de ejemplares hembras y machos de *Tityus nororientalis* (Scorpiones, Buthidae) en el modelo múmero C57BL/6. Trabajo de Grado para optar al título de Bachiller en Ciencias, U. E. de Apoyo Integral Juan Jacobo Rousseau, Guaraguao, Puerto La Cruz.
- 22 Dennis EA. 1994. Diversity of group types, regulation, and function of phospholipase A<sub>2</sub>. *J. Biol. Chem.*, 269: 13057-61.
- 23 Dixon WJ., Mood AM. 1948. A method for obtaining and analyzing sensitivity data. *J. Am. Statist. Ass.*, 43: 109-126.

- 24 Facó PE., Havt A., Barbosa PS., Nobre AC., Bezerra GP., Menezes DB., Fonteles MC., Lopes-Ferreira M., Monteiro HS. 2003. Effects of *Thalassophryne nattereri* fish venom in isolated perfused rat kidney *Toxicon*, 42: (5) 509-514.
- 25 Facó PE., Pinheiro-Bezerra G., Ferreira-Barbosa PS., Costa Martins AM., Guimarães JA., Lopes-Ferreira M., Monteiro HSA. 2005. Epidemiologia dos acidentes por *Thalassophryne nattereri* (niquim) no Estado do Ceará (1992-2002). *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 38(6): 479-482.
- 26 Finney DJ. 1952. Probit Analysis. In: *Statistical Methods in Biological Assays* (Finney DJ. Ed.). London, Charles Griffin & p. 513-553.
- 27 Forrester MB. 2008. Pattern of lionfish envenomations reported to Texas poison control centers, 1998–2006. *Toxicological and Environmental Chemistry*, 90(2): 385–391.
- 28 Fry B., Roelants K., Champagne D., Scheib H., Tyndall J, King G., Nevalainen T., Norman J., Lewis R, Norton R, Renjifo C., Rodríguez de la Vega R. 2009. The Toxicogenomic Multiverse: Convergent recruitment of proteins into animal venoms. *Annual Review of Genomics and Human Genetics*, 10: 483-511
- 29 Glantz S. 2002. *Primer of Biostatistics*, quinta edición, Mc Graw- Hill.
- 30 Goudey-Perrière F., Perrière C. 1998. Pharmacological properties of fish venoms. *C. R. Seances Soc Biol Fil.*, 192: 503-48.
- 31 Gutierrez J., Benítez-Guerra I., Benítez-Guerra G. 2004. Envenenamiento por rayas de agua dulce. *Revista de la Facultad de Medicina*, 27: 131-134.



- 32 Gutiérrez, J.M. & B. Lomonte. 1995. Phospholipase A<sub>2</sub> myotoxins from *Bothrops* snake venoms. *Toxicon* 33: 1405-1424.
- 33 Haddad Junior V. 2003. Animais aquáticos de importância médica no Brasil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 36(5): 591-597.
- 34 Haddad Junior V., Pardal P., Cardoso JL., Martins I. 2003. The venomous toadfish *Thalassophryne nattereri* (Niquim or Miquim): Report of 43 injuries provoked in fishermen os Salinópolis (Pará State) and Aracaju (Sergipe State), Brazil. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 45(4): 221-223.
- 35 Halstead BW. 1978. Poisonous and venomous marine animals of the world (Revised Edition). Darwin Press, New Jersey. XLVI. 1043 pp.
- 36 Hanh S.T., O'Connor J.M. 2000. An investigation of the biological activity of bullrout *Notesthes robusta* venom. *Toxicon* 38: 79-89.**
- 37 Hodgson W. 1997. Pharmacological action of Australian animal venoms. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, 24: 10-17
- 38 Huang SY., Pérez JC. 1980. Comparative study on hemorrhagic and proteolytic activities of snake venoms. *Toxicon*, 18: 421-426.
- 39 Huatuco S., Escobar E., Yarlequé 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.

- 40 Hurtado, A.; Montaña, L. y Rodríguez, F. 2008. Comparación de la actividad biológica y dosis letal cincuenta del veneno de *Tityus nororientalis* (Scorpiones, Buthidae) en ratones albinos de las cepas NMRI y BALBc. Trabajo de Pregrado, Departamento de Ciencias Fisiológicas, Universidad de Oriente, Barcelona.
- 41 Junghanss T., Bodio M. 2006. Medically important venomous animals: Biology, prevention, first aid, and clinical management. *Clinical Infectious Diseases*, 43:1309-1317
- 42 Lichtfield JT., Wilcoxon F. 1949. A simple method for evaluating dose-effect experiments. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 96: 99-113.
- 43 Lima LA., Ferreira M. 2000. Estudos clínico e experimental sobre o envenenamento causado pelo peixe *Thalassophryne nattereri* (niquim). Investigación clínica, laboratorial e terapéutica clínica. *Anais Brasileiros de Dermatologia*, 75(4): 435-443.
- 44 Lopes-Ferreira M., Moura-da-Silva AM, Piran-Soares AA, Angulo Y., Lomonte B, Gutiérrez JM., Farsky S. 2002. Hemostatic effects induced by *Thalassophryne nattereri* fish venom: a model of endothelium-mediated blood flow impairment. *Toxicon*, 40(8): 1141-1147
- 45 Loyo J., Lugo L., Cazorla D., Acosta ME. 2008. Envenenamiento por pez escorpión (*Scorpaena plumieri*) en una comunidad pesquera y turística de la Península de Paraguaná, estado Falcón, Venezuela: Aspectos clínicos, epidemiológicos y tratamiento. *Investigación Clínica*, 49(3): 299-307.

- 46 Machado-Allison A., Rodríguez-Acosta A. 1997. Animales venenosos y ponzoñosos de Venezuela. Caracas: Editora LITOPAR, CDCH, Universidad Central de Venezuela; p 45-111.
- 47 Marcano M., Mundaray J. 2000. Toxicidad aguda y evaluación de la Dosis Letal Cincuenta ( $DL_{50}$ ) en ratones C57/B6 inducida por el veneno de una nueva especie del género *Tityus* (*Tityus* n. sp. 1.) del estado Monagas. Trabajo de Grado para optar al título de Médico-Cirujano, Departamento de Ciencias Fisiológicas, Escuela de Medicina, Universidad de Oriente, Núcleo de Anzoátegui.
- 48 Magalhaes KW, Lima C, Piran-Soares AA, Marques E, Hiruma-Lima C, Lopes-Ferreira M. 2006. Biological and biochemical properties of the Brazilian Potamotrygon stingrays: *Potamotrygon* cf. *Scobina* and *Potamotrygon* gr. *orbignyi*. *Toxicon* 47: 575-583
- 49 Marín D., y Rodríguez A. 2000. Toxicidad aguda y evaluación de la Dosis Letal Cincuenta ( $DL_{50}$ ) en el modelo murino C57/B6 inducida por el veneno de *Tityus* sp. de Sabana de Piedra, estado Monagas. Trabajo de Grado para optar al título de Médico-Cirujano, Departamento de Ciencias Fisiológicas, Escuela de Medicina, Universidad de Oriente, Núcleo de Anzoátegui.
- 50 Meier J., Theakston R. 1986. Aproximate  $LD_{50}$  determinations of snake venoms using eight to ten experimental animals. *Toxicon*. 24: 395-401.
- 51 Molinengo L. 1979. The curve doses vs survival time in the evaluation of acute toxicity. *J. Pharm. Pharmacol.*, 31: 343-344.

- 52 Nisenbom, H.E., C. Seki & J.C. Vidal. 1986. Phospholipase A<sub>2</sub> from *Bothrops alternatus* (Víbora de la Cruz). Venom purification and some characteristic properties. *Toxicon* 24: 259-272.
- 53 Possani LD., Fletcher Jr P., Alagón AB., Alagón AC., Juliá J. 1980. Purification and characterization of a mammalian toxin from venom of the Mexican scorpion *Centruroides limpidus tecomanus* Hoffmann. *Toxicon*, 18: 175-183.
- 54 Reed LJ., Muench H. 1938. A simple method of estimating percent end points. *Am. J. Hyg.*, 27: 493-497.
- 55 Ross ME. 1996. Pharmacodynamics. Mechanisms of drug action and the relationship between drug concentration and effect. In: Hardman JG., Limbird LE., Molinoff PB., Ruddon RW., Goodman-Gilman A. (Ed). *Goodman and Gilman, the pharmacological basis of therapeutics*. Ninth Edition. New York: McGraw-Hill, p. 29-41.
- 56 Ruiz-Chópita C., Ruiz-Chópita C. 2009. Variabilidad geográfica e intraespecífica de la toxicidad del veneno de *Bothrops colombiensis* (Serpentes, Viperidae) en Venezuela. Trabajo de Grado para optar al título de Médico-Cirujano, Departamento de Medicina Interna, Escuela de Ciencias de la Salud, Universidad de Oriente, Núcleo de Anzoátegui.
- 57 Sánchez R., Suárez G. 2008. Efectos biológicos y Dosis Letal 50 de la especie *Lachesis muta muta* (Serpentes, Viperidae). Trabajo de Grado para optar al título de Médico Cirujano, Departamento de Medicina Interna, Escuela de Ciencias de la Salud, Universidad de Oriente, Núcleo de Anzoátegui.
- 58 Sanquíz, M. y González, Z. 2008. Evaluación de la actividad biológica del veneno de *Tityus nororientalis* en ratones de la cepa BALB/c. Trabajo de Grado para

optar al Título de Bachiller en Ciencias, Cátedra de Metodología de la Investigación, Colegio Nuestra Señora de Lourdes, Puerto La Cruz.

59 Sevcik C. 1987. LD<sub>50</sub> determination: objections to the method of Beccari as modified by Molinengo. *Toxicon*, 25: 779-783.

60 Shiomi K., Hosaka M., Fujita S., Yamanaka H., Kikuchi T. 1989. Venoms from six species of marine fish: lethal and hemolytic activities and their neutralization by commercial stonefish antivenom. *Marine Biology*, 103: 285-289.

61 Sosa-Rosales JI., D'Suze G., Salazar V., Fox J., Sevcik C. 2005. Purification of a myotoxin from the toadfish *Thalassophryne maculosa* (Günther) venom. *Toxicon*, 45: 147-153.

62 Turkali I. 2004. Evaluación de la actividad biológica del veneno de *Tityus nororientalis* (Scorpiones, Buthidae) de Alto Llano, municipio Sotillo, estado Anzoátegui. Trabajo de Grado para optar al título de Médico-Cirujano, Departamento de Ciencias Fisiológicas, Escuela de Medicina, Universidad de Oriente, Núcleo de Anzoátegui.

63 Valerio M. 2007. Comparación de los efectos biológicos del veneno de ejemplares juveniles y adultos de *Crotalus durissus vegrandis* Klauber, 1941 (Serpentes, Viperidae). Trabajo de Grado para optar al título de Licenciado en Biología, Departamento de Biología, Escuela de Ciencias, Universidad de Oriente, Núcleo de Sucre.

64 Zito-Grund L., Oliveira Souza V., Faquim-Mauro E., Lima C., Lopes-Ferreira M. 2006. Experimental immunization with *Thalassophryne nattereri* fish venom: Striking IL-5 production and impaired of B220<sup>+</sup> cells. *Toxicon*, 48(5): 499-508.

## HOJA DE METADATOS PARA TESIS Y TRABAJOS DE ASCENSO

<b>Título</b>	<b>ACTIVIDAD BIOLÓGICA <i>IN VITRO</i> Y DOSIS LETAL CINCUENTA DEL VENENO DE <i>Thalassophryne maculosa</i> (PISCES, BATRACHOIDIDAE)</b>
<b>Subtítulo</b>	

Autor(es)

Apellidos y Nombres	Código CVLAC / e-mail	
Alcalá Cermeño, Osmary Nathalee	<b>CVLAC</b>	18.593.185
	<b>e-mail</b>	<a href="mailto:osmaryalcerm@hotmail.com">osmaryalcerm@hotmail.com</a>
	<b>e-mail</b>	
Mendoza, Giannina Desiree	<b>CVLAC</b>	16.344.720
	<b>e-mail</b>	<a href="mailto:giannimendoza@hotmail.com">giannimendoza@hotmail.com</a>
	<b>e-mail</b>	
Navarro Gómez, Nohelys del Jesús	<b>CVLAC</b>	17.410.292
	<b>e-mail</b>	<a href="mailto:noheng@hotmail.com">noheng@hotmail.com</a>
	<b>e-mail</b>	

Palabras o frases claves:

Pez sapo cano, <i>Thalassophryne maculosa</i> , Písces, Batrachoididae, veneno, toxicidad aguda, letalidad, actividad proteolítica, fosfolipasa, ratón C57BL/6

## HOJA DE METADATOS PARA TESIS Y TRABAJOS DE ASCENSO

Líneas y sublíneas de investigación:

Área	Subárea
Escuela de Ciencias de la Salud	Medicina
	Toxinología
	Bioquímica
	Farmacología

Resumen (abstract):

El envenenamiento causado por el pez *Thalassopyrne maculosa*, produce manifestaciones clínicas fundamentalmente inflamatorias, conllevando en ciertas ocasiones a lesiones muy severas e incapacitantes, aunque generalmente no letales. A pesar de ello, muchos de los componentes responsables de tales efectos no han sido estudiados ni identificados con precisión. Por lo tanto, se hace necesario el estudio de algunos efectos biológicos *in vitro* e *in vivo* del veneno del “pez sapo cano” *Thalassopyrne maculosa* (Pisces, Batrachoididae). Se determinó la concentración de proteínas en la fracción soluble mediante espectrofotometría. La actividad biológica de los venenos fue ensayada luego de su inyección intraperitoneal en ratones hembra, homocigotos, cepa C57BL/6. La letalidad fue cuantificada a través de la dosis letal cincuenta ( $DL_{50}$ ), determinada según el método de Dixon y Mood, para 60 minutos de experimentación; calculada como el valor de la mediana obtenida el método no paramétrico de Hodges y Lehmann. El efecto clínico de los venenos se evaluó observando el curso temporal de toxicidad aguda experimental. La actividad proteolítica del veneno se estudió con diluciones sucesivas, colocadas sobre gel radiográfico para evidenciar la digestión de la gelatina. La actividad fosfolipasa se precisó mediante la emulsión de volúmenes determinados de yema de huevo y buffer Tris incubándose con diferentes concentraciones del veneno para cuantificar el tiempo de coagulación. Se obtuvo una cantidad total de proteínas de 79,41 mg mediante ordeño manual de 20 ejemplares. El índice de letalidad (en  $mg\ kg^{-1}$ ) del veneno de *T. maculosa* fue de 70,80 (66,95-75,12)  $mg.kg^{-1}$ ; el índice de variabilidad fue de 7,02%. El tiempo de aparición de las manifestaciones clínicas inducidas por el veneno fue gradual presentando de forma inmediata hiperactividad y taquipnea, seguida de hipoactividad y distensión abdominal para suceder, alrededor de los 30 minutos del curso temporal de toxicidad, periodos de bradipnea/apnea a la cual sobreviene la muerte o en algunos casos la sobrevida de los ratones. La actividad proteolítica evidenció digestión de gelatina hasta una dilución 1:64 y la actividad de fosfolipasa, fue comprobada por prolongación en el tiempo de coagulación de una emulsión de yema de huevo, solo a la mayor concentración de veneno utilizada (8,0  $mg.mL^{-1}$ ). Al comparar el índice de letalidad del veneno de *T. maculosa* con diferentes especies de escorpiones y serpientes se evidencia baja potencia letal del veneno de *T. maculosa*, con marcada diferencia con relación a la letalidad del grupo del veneno de las víboras y artrópodos, superado únicamente por la  $DL_{50}$  del veneno del escorpión *R. laticauda*. La actividad proteolítica exhibida por este veneno es baja en comparación con la mayoría de los vipéridos; solo poco mayor que la ostentada por *Crotalus durissus ruruima* o la de *Crotalus durissus pifanorum*. Los resultados aquí expuestos; permitirían iniciar la caracterización e identificación de algunos componentes proteicos presentes en este veneno que podrían poseer aplicaciones biotecnológicas, principalmente en el campo de la farmacología.

## HOJA DE METADATOS PARA TESIS Y TRABAJOS DE ASCENSO

## Contribuidores:

Apellidos y Nombres	ROL / Código CVLAC / e-mail				
Demetrio Kiriakos	ROL	C <input type="checkbox"/>	A <input type="checkbox"/>	T <input type="checkbox"/>	J <input checked="" type="checkbox"/>
		A <input type="checkbox"/>	S <input type="checkbox"/>	U <input type="checkbox"/>	U <input type="checkbox"/>
	CVLAC	5.698.723			
	e-mail	<a href="mailto:kiriakossch@cantv.net">kiriakossch@cantv.net</a>			
	e-mail				
Stefano Bónoli	ROL	C <input type="checkbox"/>	A <input type="checkbox"/>	T <input type="checkbox"/>	J <input checked="" type="checkbox"/>
		A <input type="checkbox"/>	S <input type="checkbox"/>	U <input type="checkbox"/>	U <input type="checkbox"/>
	CVLAC	11.727.468			
	e-mail	<a href="mailto:sbonoli@cantv.net">sbonoli@cantv.net</a>			
	e-mail				
Aleikar Vásquez-Suárez	ROL	C <input type="checkbox"/>	A <input checked="" type="checkbox"/>	T <input type="checkbox"/>	J <input type="checkbox"/>
		A <input type="checkbox"/>	S <input type="checkbox"/>	U <input type="checkbox"/>	U <input type="checkbox"/>
	CVLAC	12.672.563			
	e-mail	<a href="mailto:valeikar@yahoo.es">valeikar@yahoo.es</a>			
	e-mail				
Leonardo De Sousa	ROL	C <input type="checkbox"/>	A <input checked="" type="checkbox"/>	T <input type="checkbox"/>	J <input type="checkbox"/>
		A <input type="checkbox"/>	S <input type="checkbox"/>	U <input type="checkbox"/>	U <input type="checkbox"/>
	CVLAC	14.214.493			
	e-mail	<a href="mailto:leonardodesousa@yahoo.com">leonardodesousa@yahoo.com</a>			
	e-mail				

## Fecha de discusión y aprobación:

Año	Mes	Día
2010	05	21

Lenguaje: spa



**HOJA DE METADATOS PARA TESIS Y TRABAJOS DE ASCENSO****Archivo(s):**

<b>Nombre de archivo</b>	<b>Tipo MIME</b>
<b>TESIS.Thalassophryne.maculosa.doc</b>	<b>Aplication/Word</b>

**Caracteres en los nombres de los archivos:** A B C D E F G H I J K L M N O P Q R S T U  
V W X Y Z. a b c d e f g h i j k l m n o p q r s t u v w x y z. 0 1 2 3 4 5 6 7 8 9.

**Alcance:**

**Espacial:** Escuela de Ciencias de la Salud

**Temporal:** \_\_\_\_\_

**Título o Grado asociado con el trabajo:**

Médico Cirujano

**Nivel Asociado con el Trabajo:**

Pre Grado

**Área de Estudio:**

Secciones de Bioquímica y de Farmacología, Departamento de Ciencias Fisiológicas

**Institución(es) que garantiza(n) el Título o grado:**

Universidad de Oriente, Núcleo de Anzoátegui

## HOJA DE METADATOS PARA TESIS Y TRABAJOS DE ASCENSO

### Derechos:

De acuerdo al Artículo 44 del Reglamento de Trabajos de Grado: “Los Trabajos de Grado son de exclusiva propiedad de la Universidad y solo podrán ser utilizados a otros fines con el consentimiento del Núcleo respectivo, quien lo participará al Consejo Universitario”

---



---



---



---

Alcalá Cermeño, Osmary Nathalee

Mendoza, Giannina Desiree

Navarro Gómez, Nohelys del Jesús

**AUTOR**

**AUTOR**

**AUTOR**

---

Vásquez-Suárez, Aleikar

De Sousa, Leonardo

Kiriakos, Demetrio

Bónoli, Stefano

**TUTOR**

**TUTOR**

**JURADO**

**JURADO**

---

Profa. Rosibel Villegas

**Coordinadora de la Comisión de Trabajos de Grado**

**POR LA SUBCOMISIÓN DE TESIS**