



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

EFFECTOS BIOLÓGICOS Y DOSIS LETAL 50 (DL-50) DEL
VENENO DE *Crotalus durissus ruruima* EN TRES MODELOS
MÚRIDOS

Tutor:
Kiriakos, Demetrio

Presentado por:
Cazorla, Mariadella
C.I. 17 848 436
Quijada, Dallana
C.I. 17 848 813
Salazar, Dámaso
C.I. 16 930 527

Como requisito parcial para optar el título de **MEDICO CIRUJANO**

Barcelona, julio de 2009

DEDICATORIA

A Dios y la Virgen del Valle, porque la fe es lo último que se pierde.

A mi madre, que siempre me ha protegido, pero que me dejó ir cuando estaba preparada, siempre estas observando lo que hago con mi vida, pero si llego a caer estas allí para darme la mano y ayudarme a levantar, me enseñaste a dar lo mejor de mí en todo momento, me brindaste todas las herramientas para poder hacer lo que deseo, porque no hay amor como el amor de una madre. A mi padre, que me das todo lo que no pudiste tener, que me enseñaste que la bondad existe y que el ser honesto llena tu vida de satisfacción, con tus risas llenas mi vida de alegría, has sido el mejor padre que se puede ser. A ustedes que me enseñaron que mis sueños no tienen límites y que mi único límite es el cielo.

A Marianella, que fuiste mi maestra y me enseñaste a leer, que fuiste mi niñera y me cuidaste todas las tardes de mi infancia, que eras mi cómplice y siempre hiciste todos mis dibujos, que eres mi amiga y me acompañas siempre, que eres mi hermana mayor y estas en mi corazón. A Mariacella, eres la niña de mis ojos y siempre serás mi persona favorita en este mundo. A María Anthonella, porque eres como mi hermana y se te quiere como tal.

A mis abuelas Adelina y María del Pilar, que en espera de mis logros siempre me han apoyado. A mis abuelos Pedro y Ponciano, porque tengo la seguridad de que desde algún sitio pueden ver como cumplo mis metas.

A Dámaso Salazar, por brindarme todo su cariño, amistad y confianza, por creer que si podíamos lograrlo en los momentos de mayor dificultad, por comprender todas

mis irracionalidades y porque crees que yo siempre puedo lograrlo todo y que para mí no existen imposibles.

A mis tíos y tías, porque me apoyan en todo momento y celebran todos mis éxitos. A mis tíos Guilfredo, Lesbia e Ysbelis, porque cuando era niña, mis padres los trataron como a sus hijos y yo los veía de esa manera. A mis amigas, Dallana, y Cargina, siempre están presentes cuando se les necesita.

A todos aquellos que no menciono pero que dejaron una huella en mí, a ustedes también les dedico este trabajo.

Mariadella Cazorla Suárez

DEDICATORIA

A Dios todo poderoso y a la virgen del valle porque gracias a mi fé pude cumplir mis sueños, siempre me iluminaron el camino.

A mis adorados padres Luis y Duvinia a quienes debo un lugar en la creación, porque con su esfuerzo y dedicación me han educado, brindándome su apoyo sin el cual hubiese sido imposible lograr esta meta. Son ustedes mis pilares fundamentales de ayuda y comprensión en todas las etapas de mi vida, los amo.

A mi querida y amada hermana lus que aunque hoy no esté físicamente conmigo permanece en cada instante de mi vida y fue la principal compañía en cada uno de esos largos años de estudio. Todo esto lo hice por ti lus, espero que desde el cielo estés orgullosa de mi como yo lo estoy de ti, siempre estarás en mi corazón.

A mis hermanos flor y pedro a quienes admiro y quienes son mi mayor fuente de inspiración, gracias por el cariño que me brindan día a día esto también es por ustedes, los quiero.

A mis abuelas flor y Teodora quienes fueron un granito de arena importante a lo largo de toda mi carrera ya que con sus consejos, plegarias y toda su ayuda me permitieron sobrellevar las adversidades para lograr esta tan anhelada meta.

A mis amados abuelos “perucho” y en especial a mi abuelo Jesús quien siempre quiso ver esta meta lograda, aunque físicamente no estén espiritualmente los llevo conmigo.

A toda mi familia en especial a mi tía “budire” y a mi tío “oscalito”, por estar siempre pendientes de mi y ayudarme en todo cuanto podían, son mis segundos padres una palabra no es suficiente para expresar mi agradecimiento.

A mi apreciado cuñado Luís Rosas Mujica, quien desde que empezó a formar parte de mi familia me ayudó en cuanto pudo en cada momento de mi carrera y de mi vida. A mis grandes amigos y compañeros de tesis Mariadella y Dámaso gracias por acompañarme estos largos años y por permitirme cumplir con ustedes esta maravillosa experiencia.

Al resto de todos mis amigos, en especial a mi gran amigo “rafa”, te adoro sabes que sin ti hubiese sido imposible llegar aquí gracias por estar conmigo cuando más te necesitaba y nunca dejarme sola.

Dallana del Valle Quijada Ordaz.

DEDICATORIA

A Dios y a la Virgen del Valle, por ser fuente de luz en este camino y acompañarme en todo momento. Mi fe en ellos me ha proporcionado voluntad para continuar mis estudios.

A mi papá que me ha enseñado el significado de la honradez, humildad y perseverancia. A mi mamá, que ha sido fuente de inspiración y que es mi impulso para lograr mis metas, siempre has sido mi ejemplo a seguir y me enseñaste que con perseverancia puedo lograr lo que deseo. Gracias a ambos porque me han apoyado en momentos difíciles, siempre han estado allí para mí en los momentos más importantes, dándome confianza y consejos que me han orientado a lo largo de mi vida.

A mis hermanas, que se han sacrificado para que yo pudiera estudiar, Patricia que con su sencillez e inocencia, me ha apoyado en todo momento y me enseñaste lo que es la bondad siempre dispuesta a ayudar a quien te necesita. A Vanesa que desde el día que nació ha luchado contra todas las adversidades, a pesar de su condición de salud ha tenido fortaleza y me ha demostrado que es posible salir adelante con esfuerzo y dedicación, en los momentos de flaqueza, tú fuiste la persona que me recordó que todo, a pesar de lo difícil y duro que sea tiene solución.

A mi abuela, que desde que soy un niño me llamaste Doctorcito, tus sueños también son mis sueños.

A Mariadella Cazorla, que gracias a su paciencia, amor y comprensión, me ha apoyado en todo momento. Eres perseverante, honrada, humilde, inteligente y todo eso me has tratado de enseñar, por todo eso te quiero.

A mis amigos que siempre están presentes cuando se les necesita, los considero mi familia, les aprecio de todo corazón

A la Sra Pilar y al Sr Ignacio que en paz descansen, que han sido como mis abuelos y me han hecho sentir como en casa.

A todas aquellas personas que de alguna u otra manera han contribuido a mi formación y han puesto sus buenas intenciones y esperanzas en que yo pueda alcanzar mis metas.

Dámaso J Salazar B

AGRADECIMIENTOS

Al Centro de Investigaciones en Ciencias de la Salud (CICS) del Centro de Investigaciones Tecnológicas de Oriente (CITO), por facilitarnos sus instalaciones para la realización de los experimentos de este trabajo.

Al Serpentario de la Universidad de Oriente, Núcleo de Anzoátegui, por facilitarnos el material biológico necesario para la investigación

Al Dr. Demetrio Kiriakos, por ser la mejor persona que se puede ser, es nuestro tutor, guiándonos en todo momento durante la realización de este trabajo, nuestro amigo, nos dio comprensión y paciencia y nuestro maestro porque nos enseñó a trabajar en equipo y que el trabajo no es sólo trabajo sino que también puede ser diversión. Nos abrió las puertas de su casa, de su trabajo, de su corazón, de su vida, por todo esto muchas gracias.

Al Dr. Leonardo de Sousa, que nos acompañó durante la realización de los experimentos, que llenó de risas nuestro lugar de trabajo y que siempre estuvo dispuesto a colaborar con nosotros.

A la Lic. Norelys Tovar de Gonzáles, quien nos prestó su laboratorio y pericia, dedicando tiempo para ayudarnos a realizar el experimento de determinación de efecto procoagulante.

A Kirje Martinez y Tulio Farias, quienes de forma desinteresada, ayudaron en el traslado de los modelos múridos

A todos aquellos que de alguna forma colaboraron en la elaboración de este proyecto, muchas gracias.

ÍNDICE

DEDICATORIA	ii
AGRADECIMIENTOS	viii
ÍNDICE	x
LISTA DE TABLAS	xii
LISTA DE GRÁFICOS	xiv
LISTA DE FIGURAS	xv
RESUMEN.....	xvi
INTRODUCCIÓN	17
CAPITULO I: EL PROBLEMA.....	22
1.1 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	22
1.2 OBJETIVOS	24
1.2.1 Objetivo General:.....	24
1.2.2 Objetivos Específicos:.....	24
1.3 JUSTIFICACIÓN	25
CAPITULO II: MARCO TEÓRICO	26
2.1 Serpientes de la Familia Viperidae	26
2.2 Neurotoxinas	27
CAPITULO III: MARCO METODOLÓGICO	29
3.1 Tipo de Investigación.....	29
3.2 Variables	29
3.3 Materiales.....	29
3.4 Extracción del veneno.....	30
3.5 Determinación de la dosis letal 50 (DL ₅₀).....	31
3.6 Determinación de la actividad proteolítica del veneno en ensayos <i>in vitro</i>	32
3.7 Determinación del efecto procoagulante.....	33

3.8 Procesamiento de los Datos.	34
CAPITULO IV: ANALISIS Y PRESENTACION DE RESULTADOS	35
4.1 PRESENTACION DE RESULTADOS	35
4.2 DISCUSIÓN	56
CAPITULO V: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	62
5.1. CONCLUSIONES	62
5.2 RECOMENDACIONES	63
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS:.....	64
ANEXOS	68

LISTA DE TABLAS

		Pág
Tabla nº 1	Datos para el cálculo de La Dosis Letal (DL ₅₀) del veneno de <i>Crotalus durissus ruruima</i> en ratones BALB`c (♀), administrado por VIP para 60 minutos de observación.	15
Tabla nº 2	Frecuencia de muerte inducida por el veneno de <i>Crotalus durissus ruruima</i> en el modelo múrido BAL`C (♀) según la dosis administrada por VIP.	17
Tabla nº 3	Datos para el cálculo de La Dosis Letal (DL ₅₀) del veneno de <i>Crotalus durissus ruruima</i> en ratones NMRI (♀), administrado por VIP para 60 minutos de observación.	19
Tabla nº 4	Frecuencia de muerte inducida por el veneno de <i>Crotalus durissus ruruima</i> en el modelo múrido NMRI (♀) según la dosis administrada por VIP.	21
Tabla nº 5	Datos para el cálculo de La Dosis Letal (DL ₅₀) del veneno de <i>Crotalus durissus ruruima</i> en ratones C57bl/6 (♀), administrado por VIP para 60 minutos de observación	23

Tabla nº 6	Frecuencia de muerte inducida por el veneno de <i>Crotalus durissus ruruima</i> en el modelo mrido C57bl/6 (♀) según la dosis administrada por VIP.	25
Tabla nº7	Comparación de la sensibilidad hacia el veneno de <i>Crotalus durissus ruruima</i> en ratones C57bl/6, BALB'c y NMRI (♀), administrado por VIP para 60 minutos de observación	27
Tabla nº 8	Manifestaciones clínicas de toxicidad observadas en ratones C57bl/6, NMRI y BALB'c (♀) en 60 minutos de observación inducidos por la administración VIP del veneno de <i>Crotalus durissus ruruima</i>	28
Tabla nº 9	Efecto procoagulante a diferentes diluciones del veneno de <i>Crotaluss durissus ruruima</i>	29

LISTA DE GRÁFICOS

	Pág
Gráfico n° 1. Gráfica 1 Dosis Letal (DL ₅₀) del veneno de <i>Crotalus durissus ruruima</i> en ratones BALB’c (♀), administrado por VIP para 60 minutos de observación.	16
Gráfico n° 2. Dosis Letal (DL ₅₀) del veneno de <i>Crotalus durissus ruruima</i> en ratones NMRI (♀), administrado por VIP para 60 minutos de observación.	20
Gráfico n° 3. Dosis Letal (DL ₅₀) del veneno de <i>Crotalus durissus ruruima</i> en ratones C57bl/6(♀), administrado por VIP para 60 minutos de observación.	24
Gráfico n° 4. Comparación Dosis Letal (DL ₅₀) del veneno de <i>Crotalus durissus ruruima</i> en ratones C57bl/6, BALB’c y NMRI (♀), administrado por VIP para 60 minutos de observación.	26

LISTA DE FIGURAS

		Pág
Figura 1.	Actividad proteolítica del veneno de <i>Crotalus durissus ruruima</i> sobre el gel radiográfico.	29
Figura 2.	Hipoactividad.	42
Figura 3.	Marcha parética.	42
Figura 4.	Parálisis en extensión.	43
Figura 5.	Postración.	43
Figura 6.	Convulsión.	44
Figura 7.	Muerte	44

RESUMEN

Efectos biológicos y dosis letal 50 (DL50) del veneno de *Crotalus durissus ruruima* en tres modelos múridos. Cazorla S., Mariadella; Quijada O., Dallana; Salazar B., Dámaso J. y Kiriakos, Demetrio. Universidad de Oriente, Núcleo Anzoátegui, 2009.

Se determinó la DL₅₀ del veneno de *Crotalus durissus ruruima* en los modelos múridos C57bl/6, NMRI y BALB`c hembras, inyectados por vía intraperitoneal y para una hora de observación, por el método secuencial de Dixon y Mood (1984) y modificado por Sevcik (1987). Los resultados obtenidos para las DL₅₀ fueron 6,64 mg/kg para BALB`c, 3,77 mg/kg para NMRI y 3,16 mg/kg para C57bl/6. Las manifestaciones clínicas más observadas fueron hipoactividad, taquipnea, rascado y defecación pastosa con frecuencias que variaron entre 57,14 y 100%, con un promedio de tiempo de aparición entre 6 y 23 minutos. Otras manifestaciones clínicas observadas con menor frecuencia en los tres modelos múridos fueron apnea, espasmos musculares, exoftalmos, cianosis y postración. La actividad procoagulante del veneno de *Crotalus durissus ruruima*, se evidenció hasta la dilución 0,25 mg/ml. La actividad proteolítica evaluada, como digestión de proteínas del gel radiográfico, se evidenció hasta una dilución de 1:16. Se concluye que los ratones C57bl/6 son más susceptibles al veneno *Crotalus durissus ruruima* siendo además, los que muestran menor índice de variabilidad y de gasto de material biológico en los experimentos, por lo que, resultan ser los más adecuados para este tipo de ensayos.

INTRODUCCIÓN

Las serpientes venenosas y sus presas han coexistido durante aproximadamente 200 millones de años, y a pesar que el ser humano no es parte de su cadena alimentaria, el contacto del hombre con éstas hace que el envenenamiento ofídico todavía sea una causa importante de morbilidad y mortalidad humana a nivel mundial (García, 1995).

En el mundo se presentan cada año alrededor de 5 400 000 envenenamientos ofídicos, de los cuales 2,5% son mortales. Para Latinoamérica se estiman 150 000 envenenamientos ofídicos anuales y 5 000 muertes por esta causa. El envenenamiento ofídico es un evento común en los países subdesarrollados y en vías de desarrollo del área tropical y subtropical. Las consecuencias del síndrome de envenenamiento ofídico en estos países han sido subestimadas, nunca verdaderamente registradas en estadísticas de salud (Castrillon y col, 2007).

El envenenamiento ofídico es causado por mordedura de serpientes que poseen e inyectan sustancias tóxicas que lesionan los tejidos y provocan alteraciones fisiopatológicas. En el mundo existen aproximadamente 3 000 especies de serpientes, de las cuales 200 son venenosas (Castrillon y col, 2007).

En Venezuela existe una fauna abundante, distribuida en todos los ambientes del país, con un alto número de serpientes venenosas, que causan entre 4 000 - 6 000 casos de envenenamiento por año, siendo un problema de Salud Pública (Rodríguez-Acosta y col, 1995).

La distribución geográfica de las serpientes en nuestro país, se encuentra relacionada con su comportamiento bioecológico. Así, los géneros *Bothrops* y *Lachesis* se ubican en regiones húmedas del piso tropical y subtropical, piedemonte, márgenes de ríos y quebradas. Son serpientes agresivas y provocan accidentes graves (Lancini, 1986). Las serpientes de los géneros *Crotalus* y *Micrurus* se encuentran preferiblemente en las sabanas, piedemontes y regiones xerófilas (Rodríguez-Acosta y col, 1998).

La dentadura de este grupo geológico es muy diversa, lo que permite clasificarlas en 1) Aglifas: caracterizadas por tener la dentadura del maxilar superior formado por dientes pequeños en forma de gancho y curvados hacia atrás, sin colmillos. 2) Opistomegadontes similares a los anteriores pero tienen unos dientes de mayor tamaño ubicados en la parte posterior de la cavidad bucal. 3) Opistoglifas la disposición dental es igual a la del grupo anterior, pero con un par de dientes posteriores alargados, fijos y surcados por un canal lateral externo, capaz de escurrir veneno. 4) Proteroglifas los colmillos están ubicados en el maxilar superior, pero en su parte anterior, poseen canales inoculadores de veneno, son pequeños, ligeramente curvados e inmóviles. 5) Solenoglifas: tienen un par de colmillos fuertes, curvados hacia atrás, situados en la parte anterior del maxilar superior. Tienen un maxilar pequeño, verticalmente eréctil, que les permite cerrar la boca y replegar los colmillos (Otero, 1990).

Varios géneros de serpientes venenosas son reconocidas en Latinoamérica de los cuales *Bothrops*, *Bothriechis*, *Bothriopsis*, *Porthidium*, *Crotalus*, *Lachesis* y *Micrurus* se encuentran en Venezuela. Los seis primeros corresponden a la familia Viperidae y el género *Micrurus*, pertenece a la familia Elapidae (Rodríguez-Acosta, 1998). Los accidentes botrópicos representan en Venezuela, alrededor del 70% de los envenenamientos por mordeduras de serpiente, seguido por los accidentes crotálicos y otros (Pifano, 1989).

Las serpientes de la familia Viperidae son las que poseen el aparato venenoso más evolucionado, son animales de cabeza grande y triangular, debido a la presencia de voluminosas glándulas venenosas de Duvernoy. Las escamas cefálicas son pequeñas, el cuerpo es grueso y la cola corta. Las pupilas son verticales, adaptadas a visión nocturna, pues cazan de noche o en lugares sombríos. Su aparato venenoso es de tipo solenoglifo y algunas tienen un par de fosetas termorreceptoras, a cada lado de la región supralabial, entre los orificios nasales y los ojos, las cuales sirven para detectar a su presa (foseta loreal). Este grupo representa a la subfamilia Crotalinae (Pirela y Hernández, 2006)

Los efectos causados por el envenenamiento ofídico se clasifican en sistémicos y locales. Los envenenamientos por mordeduras de serpientes de la familia Viperidae, subfamilia Crotalinae, son caracterizados por prominentes alteraciones a nivel local, incluyendo hemorragia, edema y necrosis, efectos que pueden resultar en secuelas permanentes, desarrollándose muy rápidamente después del envenenamiento (Gutiérrez y col, 2000).

El género *Crotalus* (generalmente, llamadas serpientes de cascabel) está representado en el país por 5 subespecies: *Crotalus durissus cumanensis*, *Crotalus durissus vegrandis*, *Crotalus durissus maricelae*, *Crotalus durissus ruruima* y *Crotalus durissus pifanorum*. En Venezuela aproximadamente el 15% de los accidentes ofídicos corresponden a aquellos provocados por serpientes de cascabel, ampliamente distribuidas en el país en todas las regiones geográficas, con características xerófilas y semixerófilas, habitando también regiones de sabanas, valles y depresiones (Rodríguez-Acosta y col, 1998). En el Estado Anzoátegui el envenenamiento crotálico, representa el 78% de todos los envenenamientos (Kiriakos, 1993).

Crotalus durissus ruruima presenta ojos con pupilas verticales, un par de internasales alargadas y dos prefrontales grandes, de 13 a 14 supralabiales y de 16 a 17 infralabiales. Esta subespecie se caracteriza por ser de pequeño tamaño y un patrón de coloración pardo rojizo, con dos estrías paraventrales negruzcas y una serie de 20 a 25 rombos oscuros con bordes blancos. Habita en el Sur de nuestro país, extendiéndose hasta Guyana y Brasil (Lancini y Kornacker, 1989).

Los venenos de los vipéridos no sólo son los venenos más complejos, en comparación con los de otras familias, sino también contienen las proteínas de mayor peso molecular en correlación con las características propias de las mismas. El cuadro clínico manifestado, resulta de la combinación de los diferentes efectos producidos por los componentes proteicos presentes en el veneno (Bogarín y col, 1999).

Las neurotoxinas son componentes clásicos del veneno de las serpientes que afectan particularmente, la función de la unión neuromuscular. Las neurotoxinas actúan sobre distintas estructuras, por lo que originan diversos cuadros clínicos y patológicos. De acuerdo al sitio de acción, se pueden clasificar en neurotoxinas presinápticas de la unión neuromuscular, que afectan al axón terminal y producen ruptura de las vesículas sinápticas, daño al axón terminal y cese de la descarga de acetilcolina, bloqueando completamente la transmisión neuromuscular y, neurotoxinas postsinápticas que son menos potentes pero más rápidas en actividad y potencialmente más letales, se unen al receptor proteico de la acetilcolina o en sus adyacencias en el extremo terminal de la placa del lado del músculo, bloqueando así la señal que llega al músculo y generando parálisis flácida (Rodríguez-Acosta y col, 1998).

El sistema nervioso central intenta conservar la homeostasis a través de la barrera hematoencefálica, ejercida por las células endoteliales capilares del sistema nervioso central, por los plexos coroides y los vasos piales así como también, la barrera

epéndimo-espinal. El transporte a través de esta barrera se realiza por diversos mecanismos, que incluyen canales iónicos transporte específicos, las bombas dependientes de energía y la endocitosis mediadas por receptores (Neuwelt, 1999).

Con respecto al componente neurotóxico de los venenos de las serpientes, mayormente descritos en crotálidos, está claramente establecido que en condiciones naturales no son capaces de penetrar la barrera hematoencefálica, sin embargo, bajo profundas alteraciones, ellas pueden alcanzar el sistema nervioso central y generar cuadros patológicos, hasta ahora descritos de forma incompleta (Monterrey, 2001).

Los efectos tóxicos de mordeduras de las serpientes de cascabel, son debidos principalmente a las proteinasas presentes en el veneno. Como los venenos de las serpientes poseen una composición variable, también existen diferencias importantes en las actividades enzimáticas y en los efectos locales y sistémicos, no sólo entre distintas especies de la misma familia, sino también como diferencias intraespecíficas entre poblaciones de distintas zonas geográficas (Francischetti, 2002).

CAPITULO I: EL PROBLEMA

1.1 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Los venenos de Viperidae contienen diversas actividades enzimáticas, como las de fosfolipasas, fosfodiesterasas, fosfomonoesterasas, alfa-aminoacidooxidasas, acetilcolinesterasas, enzimas proteolíticas de la serina proteinasa y varias clases de metaloproteinasas, arginina-esterasa, hialorunidasa y NAD nucleasas (Markland, 1998).

Las actividades hemorrágicas y proteolíticas, de las serpientes suramericanas, están casi exclusivamente en los venenos botrópicos y lachésicos, sin embargo, en los últimos años se han descrito estas actividades en algunas especies de crótalos venezolanos (Rodríguez-Acosta, 1998). En adición, la acción proteolítica produce aminas y péptidos vasoactivos, tales como bradiquinina, histamina y serotonina que causan lesión capilar, lo cual se traduce en hemorragias petequiales, hematuria, hematemesis, epistaxis y hemorragias viscerales (Toro, 1999).

Las proteínas y péptidos biológicamente activos de los venenos de las serpientes interactúan con componentes del sistema homeostático humano, afectando la coagulación sanguínea, las células endoteliales y las plaquetas (Markland, 1998).

La actividad coagulante del tipo trombina produce fibrina a partir de fibrinógeno o por activación del factor X en presencia de calcio. La formación de trombos es casi instantánea en la vecindad del área de inoculación y en cierta forma bloquea la difusión del veneno por vía hemática; existe sin embargo, difusión linfática y

formación de microtrombos de fibrina, especialmente en capilares pulmonares (Toro, 1999).

Por otro lado, es importante recalcar que los venenos de las diferentes especies y entre individuos de la misma especie, pero de distintas poblaciones, producen distintos efectos locales y sistémicos (Ferreira, et al, 1992)

En nuestro país son pocos los estudios realizados en venenos de serpientes y los que existen, utilizan métodos variados que no facilitan las comparaciones. En este sentido, en los laboratorios del Centro de Investigaciones en Ciencias de la Salud (CICS) de la Universidad de Oriente (UDO), se está llevando a cabo una línea de investigación en venenos de crotálicos. Algunos ensayos ya efectuados han permitido calcular las DL-50 de *Crotalus durissus cumanensis* (Baldi y Chalbaud, 2007), *Crotalus durissus vegrandis* (Valerio, 2007) y *Crotalus durissus pifanorum* (Acosta, Cayama y Graziani, 2008) en el modelo de ratones C57bl/6, NMRI y BALB/C hembras, inyectados por vía intraperitoneal y sometidos a periodos de una hora de observación. Los resultados han demostrado diferencias interesantes entre las DL-50 y los efectos biológicos de los venenos de estas subespecies. Con el objetivo de continuar con el avance de estas investigaciones hemos propuesto estudiar el veneno de *Crotalus durissus ruruima* para responder a las siguientes preguntas: ¿Cuál es la potencia relativa y cuales los efectos biológicos del veneno de esta especie? ¿Cómo se compara este veneno con el de las subespecies previamente estudiadas en nuestra universidad?

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 Objetivo General:

Evaluar los efectos biológicos y la dosis letal 50 (DL-50) del veneno de *Crotalus durissus ruruima* en diferentes modelos múridos.

1.2.2 Objetivos Específicos:

1. Calcular y comparar la DL-50 del veneno de *Crotalus durissus ruruima* en los modelos múridos C57bl/6, NMRI y BALB´C (hembras), inyectados por vía intraperitoneal y evaluados durante un periodo de una hora de observación.
2. Determinar las manifestaciones clínicas provocadas por la inyección intraperitoneal del veneno de *Crotalus durissus ruruima* en los diferentes modelos múridos.
3. Estudiar los efectos proteolíticos del veneno de *Crotalus durissus ruruima* en sistema *in vitro* conformado por la capa de gelatina presente en las placas de rayos X veladas.
4. Establecer el efecto procoagulante del veneno de *Crotalus durissus ruruima*, mediante ensayos *in vitro* efectuados con plasma humano.

5. Comparar las DL-50 y los efectos biológicos del veneno de *Crotalus durissus ruruima* con los de otras cascabeles estudiadas previamente en los laboratorios del CICS-UDO-Anzoátegui.

1.3 JUSTIFICACIÓN

La intención de este proyecto fue evaluar los efectos tóxicos y la potencia del veneno de *Crotalus durissus ruruima*. Consideramos que el valor de esta investigación radica en el hecho que los crótalos son responsables del 78% de los envenenamientos ofídicos en el estado Anzoátegui. Con los ensayos que se proponen, se puede determinar los efectos locales y sistémicos que ocasionan estas serpientes en los modelos muridos, como base para la comprensión del efecto toxico que inducen en el hombre y como sustento teórico que estaría a disposición del clínico para el manejo terapéutico del envenenamiento producido por las diferentes especies, evitando así las complicaciones y muerte de los pacientes. Por otra parte, el empleo de diversos modelos animales en estudios experimentales similares contribuiría significativamente a la determinación de las diferencias de susceptibilidad relacionadas con los factores genéticos propios de la interacción molecular entre el veneno y las células del organismo afectado.

CAPITULO II: MARCO TEÓRICO

2.1 Serpientes de la Familia Viperidae

Las serpientes de la familia Viperidae son las que poseen el aparato venenoso más evolucionado, son animales de cabeza grande y triangular, debido a la presencia de voluminosas glándulas venenosas de Duvernoy. Las escamas cefálicas son pequeñas, el cuerpo es grueso y la cola corta. Las pupilas son verticales, adaptadas a visión nocturna, pues cazan de noche o en lugares sombríos. Su aparato venenoso es de tipo solenoglifo y algunas tienen un par de fosetas termorreceptoras, a cada lado de la región supralabial, entre los orificios nasales y los ojos, las cuales sirven para detectar a su presa (foseta loreal). Este grupo representa a la subfamilia Crotalinae (Pirela y Hernández, 2006)

Los efectos causados por el envenenamiento ofídico se clasifican en sistémicos y locales. Los envenenamientos por mordeduras de serpientes de la familia Viperidae, subfamilia Crotalinae, son caracterizados por prominentes alteraciones a nivel local, incluyendo hemorragia, edema y necrosis, efectos que pueden resultar en secuelas permanentes, desarrollándose muy rápidamente después del envenenamiento (Gutiérrez y col, 2000).

El género *Crotalus* (generalmente, llamadas serpientes de cascabel) está representado en el país por 5 subespecies: *Crotalus durissus cumanensis*, *Crotalus durissus vegrandis*, *Crotalus durissus maricelae*, *Crotalus durissus ruruima* y *Crotalus durissus pifanorum*. En Venezuela aproximadamente el 15% de los accidentes ofídicos corresponden a aquellos provocados por serpientes de cascabel,

ampliamente distribuidas en el país en todas las regiones geográficas, con características xerófilas y semixerófilas, habitando también regiones de sabanas, valles y depresiones (Rodríguez-Acosta y col, 1998). En el Estado Anzoátegui el envenenamiento crotálico, representa el 78% de todos los envenenamientos (Kiriakos, 1993).

Crotalus durissus ruruima presenta ojos con pupilas verticales, un par de internasales alargadas y dos prefrontales grandes, de 13 a 14 supralabiales y de 16 a 17 infralabiales. Esta subespecie se caracteriza por ser de pequeño tamaño y un patrón de coloración pardo rojizo, con dos estrías paraventrales negruzcas y una serie de 20 a 25 rombos oscuros con bordes blancos. Habita en el Sur de nuestro país, extendiéndose hasta Guyana y Brasil (Lancini y Kornacker, 1989).

Los venenos de los vipéridos no sólo son los venenos más complejos, en comparación con los de otras familias, sino también contienen las proteínas de mayor peso molecular en correlación con las características propias de las mismas. El cuadro clínico manifestado, resulta de la combinación de los diferentes efectos producidos por los componentes proteicos presentes en el veneno (Bogarín y col, 1999).

2.2 Neurotoxinas

Las neurotoxinas son componentes clásicos del veneno de las serpientes que afectan particularmente, la función de la unión neuromuscular. Las neurotoxinas actúan sobre distintas estructuras, por lo que originan diversos cuadros clínicos y patológicos. De acuerdo al sitio de acción, se pueden clasificar en neurotoxinas presinápticas de la unión neuromuscular, que afectan al axón terminal y producen ruptura de las vesículas sinápticas, daño al axón terminal y cese de la descarga de acetilcolina, bloqueando completamente la transmisión neuromuscular y,

neurotoxinas postsinápticas que son menos potentes pero más rápidas en actividad y potencialmente más letales, se unen al receptor proteico de la acetilcolina o en sus adyacencias en el extremo terminal de la placa del lado del músculo, bloqueando así la señal que llega al músculo y generando parálisis flácida (Rodríguez-Acosta y col, 1998).

El sistema nervioso central intenta conservar la homeostasis a través de la barrera hematoencefálica, ejercida por las células endoteliales capilares del sistema nervioso central, por los plexos coroides y los vasos piales así como también, la barrera epéndimo-espinal. El transporte a través de esta barrera se realiza por diversos mecanismos, que incluyen canales iónicos transporte específicos, las bombas dependientes de energía y la endocitosis mediadas por receptores (Neuwelt, 1999).

Con respecto al componente neurotóxico de los venenos de las serpientes, mayormente descritos en crotálidos, está claramente establecido que en condiciones naturales no son capaces de penetrar la barrera hematoencefálica, sin embargo, bajo profundas alteraciones, ellas pueden alcanzar el sistema nervioso central y generar cuadros patológicos, hasta ahora descritos de forma incompleta (Monterrey, 2001).

Los efectos tóxicos de mordeduras de las serpientes de cascabel, son debidos principalmente a las proteinasas presentes en el veneno. Como los venenos de las serpientes poseen una composición variable, también existen diferencias importantes en las actividades enzimáticas y en los efectos locales y sistémicos, no sólo entre distintas especies de la misma familia, sino también como diferencias intraespecíficas entre poblaciones de distintas zonas geográficas (Francischetti, 2002).

CAPITULO III: MARCO METODOLÓGICO

3.1 Tipo de Investigación

La investigación es del tipo experimental. En el presente trabajo se establece la potencia (DL_{50}) y los efectos biológicos del veneno de *Crotalus durissus ruruima* en tres modelos múridos.

3.2 Variables

Independientes: el veneno de ejemplares adultos de *Crotalus durissus ruruima*.

Dependientes: La reacción del plasma sanguíneo humano, la evolución clínica de la toxicidad aguda experimental en los modelos múridos y el efecto digestivo de las proteínas contenidas en la capa de gelatina presente en las placas de rayos X veladas.

3.3 Materiales

- Veneno de la especie *Crotalus durissus ruruima* (adultos).
- Ratones hembra homocigotos de las cepas C57bl/6 y BALB'C, y heterocigotos NMRI.
- Plasma humano.
- Placas radiográficas veladas.
- Incubadora Biocasa® modelo INCOX.116.

- Cristalería de laboratorio (microjeringas de 50 microlitros de capacidad, vasos de precipitado, tubos de ensayo, micropipetas graduadas de volumen variable, jeringas de 10 y 20cc, piceta plástica, microgoteros, tubos Eppendorf[®]).
- Liofilizador Labconco[®], modelo Freezone 45.
- Balanza analítica Sartorius[®], modelo Handy.
- Balanza digital Denver Instrument[®], modelo XS-300.D.
- Cloroformo.
- Anticoagulante.
- Solución Salina (0,9%).
- Baño de María.
- Papel Parafilm[®].
- Refrigerador marca Whirpoll de -20°C.
- Ganchos metálicos para serpientes.
- Agua destilada.
- Trombo Hacina C Plus[®] de Laboratorio Dade.

3.4 Extracción del veneno

El ordeño del veneno de cada ejemplar adulto, de *Crotalus durissus ruruima*, se realizó en el Serpentario de la Universidad de Oriente, Núcleo Anzoátegui. Para ello, los crotálidos se extrajeron de su terrario con un gancho en forma de “S” en la punta. Luego se procedió a tomar el animal con el dedo pulgar en un lado, el índice sobre la cabeza y el dedo medio sujetando el otro lado de la cabeza en forma tal que se imposibilita que la culebra gire y muerda. Se tomó posteriormente un vaso de precipitado de 50 ml de capacidad, previamente cubierto con un plástico (Parafilm[®]) adherido a la boca del vaso. Se acercó la cabeza de la serpiente para que ésta mordiera el plástico naturalmente mientras que se realizaron suaves masajes sobre las

glándulas productoras de veneno que se encuentran en la parte postero-lateral de la cabeza, para facilitar la caída de una pequeña cantidad de veneno en el recipiente. Inmediatamente, el veneno extraído fue colocado en tubos de ensayo y refrigerado a -20°C para su posterior utilización. El tratamiento inicial se basó en la desecación al frío (Liofilizador Labconco[®]), pesado en una balanza analítica (Sartorius[®]), y reconstituido con un volumen pequeño de solución salina (0,9%). Finalmente, los cristales de veneno fueron almacenados a bajas temperaturas en tubos Eppendorf[®] de 1,5 ml de capacidad.

3.5 Determinación de la dosis letal 50 (DL₅₀)

La DL₅₀ del veneno de la cascabel se determinó por el método secuencial de aumentar y disminuir la dosis descrita por Dixon y Mood (1984) modificado por Sevcik, (1987). El veneno se inyectó en ratones C57bl/6, NMRI y BALB’c, con una microjeringa de 50 μl (Hamilton[®]) utilizando la vía intraperitoneal (VIP), previamente pesados en una balanza digital (Denver Instrument[®], modelo XS-310.D). Para iniciar el experimento, en el primer ratón se administró el anti-*log* de una dosis inicial X1, arbitraria y modificada por un factor arbitrario constante ($d = 0.05$) y se observó la respuesta en un tiempo definido de observación (una hora).

Si el primer ratón respondía con la muerte, el segundo recibiría un anti-*log* de la dosis $X_2 = \text{anti-}log(X_1 - d)$. Si por el contrario el ratón sobrevivía, al segundo murido se le administraría un anti-*log* de la dosis $X_2' = \text{anti-}log(X_1 + d)$. Se continuó con el experimento hasta encontrar el primer fenómeno vida – muerte o muerte – vida que es el punto de inflexión a partir del cual se comenzó la corrida válida para el experimento. La dosis para cada siguiente animal fue la anti-*log* de $X_m - d$ si el animal “m” murió con la dosis anti-*log* X_m o bien, anti-*log* $X_m + d$, si el animal “m” sobrevive a la dosis anti-*log* X_m . El muestreo se detuvo al obtener una

secuencia similar a +0+0+0+ * ó 0+0+0+0 *, donde positivo (+) indica muerte, cero (0) indica sobrevivencia y asterisco (*), la dosis que debió ser administrada al siguiente ratón. La corrida válida se consideró completa al obtener tres ciclos de muerte – no muerte.

En el cálculo de la DL-50, según la mediana y sus límites de confianza, se tomaron en cuenta las dosis de la corrida válida más la del punto final.

Los signos clínicos (neurológicos, respiratorios, gastrointestinales y musculares) consecuencia del efecto de toxicidad aguda experimental inducida por la inyección VIP de veneno de ejemplares *Crotalus durissus ruruima*, en los modelos múridos C57bl/6, NMRI y BALB’C, se observaron durante una hora de experimentación y se registraron cronológicamente en un formato específicamente diseñado para este propósito. A modo de ensayo control fueron empleados ratones en los que se administraran 50 µl de solución fisiológica.

3.6 Determinación de la actividad proteolítica del veneno en ensayos *in vitro*

La determinación del efecto proteolítico del veneno extraído, se realizó por el método de la actividad en gelatinas (Huang y Pérez, 1980). Este consiste en lo siguiente:

Se humedeció con agua desionizada las gelatinas que cubren una película de radiografía; luego se colocó la película de radiografía en un envase plástico y seguidamente se introdujo en una incubadora a 37°C por 30 minutos. Luego se eliminó el exceso de humedad de la película, aireándola y secándola en pocos minutos. Posteriormente, se procedió a realizar las divisiones para la colocación de

las muestras, con la ayuda de una hoja de papel cuadriculado, se colocó debajo de la película bajo iluminación para proyectar las divisiones.

Se hicieron 9 diluciones, en serie, iniciando con una proporción de 1:2 y finalizando en 1:512. Se colocó un control de veneno puro (100% veneno) y otro de solución 0,9% (0%veneno).

Se colocó 25 μ l, de cada dilución, sobre cada recuadro dibujado en el papel debajo de la película. Seguidamente se colocó la película dentro de un recipiente plástico con toallas de papel humedecidas con agua en el fondo. Se tapó el recipiente y se colocó dentro de la incubadora a 37°C por 4 horas. Finalmente, se retiró la placa de la incubadora y se lavó con agua destilada a presión, utilizando una piceta para permitir la visualización de la digestión del gel.

3.7 Determinación del efecto procoagulante

En la determinación del efecto coagulante inducido por el veneno del cascabel, se centrifugó 10 ml de sangre humana, extraída en un tubo sin anticoagulante, y el plasma obtenido se repartió equitativamente en 6 tubos de ensayo.

Uno de los tubos (control) se empleó para el cálculo del tiempo de protrombina (PT) con el reactivo químico Trombo Hacina C Plus[®], de Laboratorios Dade; empleado en los laboratorios clínicos y se llevó a baño de maría, tomando paralelamente una solución madre de 1mg/ml preparada disolviendo 1mg de veneno de los ejemplares adultos de *Crotalus durissus ruruima* con 1 ml de solución salina. A partir de la solución madre se hicieron diluciones con solución salina a 0,9% para obtener concentraciones de 0,5mg/ml; 0,25mg/ml; 0,1mg/ml y 0,05mg/ml y 0,025 mg/ml, obteniendo así 6 soluciones de veneno. Posteriormente, a cada tubo de ensayo

se agregó 200 μ l de plasma y se llevó a baño de maría a 37°C, a cada uno se le administró 100 μ l de cada dilución del veneno, empezando por la más concentrada, para cuantificar el tiempo en que ocurre la coagulación del plasma con cada solución. Los tiempos de coagulación obtenidos, con cada dilución de veneno se registraron en una tabla para su posterior procesamiento.

3.8 Procesamiento de los Datos.

Se utilizó el programa Microsoft Office Excel 2007 para automatizar los cálculos y elaborar la gráfica de la DL 50.

Todos los datos experimentales se procesaron por métodos estadísticos no paramétricos o de libre distribución.

Se calcularon las medianas según Hodges y Lehman y sus límites de confianza al 95%.

Las diferencias entre los cálculos de la DL 50 de veneno de *Crotalus durissus ruruima*, en los modelos muridos, fueron probados por la técnica de análisis de varianza de Kurskall-Wallis. Se tomó un nivel de significancia $p < 0.05$

Para el procesamiento de los datos por el método estadístico no paramétrico se utilizó el programa V-8.2 (Sevcik, 1987) Laboratorio de Neurofarmacología Celular, Centro de Biofísica y Bioquímica, IVIC, Miranda.

CAPITULO IV: ANALISIS Y PRESENTACION DE RESULTADOS

4.1 PRESENTACION DE RESULTADOS

Se iniciaron los experimentos con el cálculo de la Dosis Letal Cincuenta (DL_{50}) del veneno de *Crotalus durissus ruruima* según el método de Dixon y Mood (1948) modificado por Sevcik (1987).

En la tabla 1 se presentan los datos necesarios para el cálculo de la DL_{50} del veneno de *Crotalus durissus ruruima*, en ratones BALB'c hembra, inyectados por VIP y observados durante 60 minutos.

El total de ratones BALB'c, para la determinación de la DL_{50} fue de $n = 19$, con un peso promedio de 19,82 g. El punto de inflexión se ubicó en R_6 . A partir de este punto se consideró la corrida válida para la determinación de la DL_{50} . Esta comprendió desde R_6 hasta $R_{19} + R_{20}$ (punto final). La cantidad de veneno utilizado fue de 2543,6 μg (Tabla 1).

La DL_{50} , del veneno de *Crotalus durissus ruruima* en ratones BALB'c hembra, inyectados por VIP y para 60 minutos de observación, se presenta en la gráfica 1, donde se puede observar una mediana de 6,64 (6,35-7,12) mg/kg de ratón con un índice de variabilidad de 11,51%.

La frecuencia de muerte causada por la administración del veneno en estos ratones se presenta en la tabla 2. La mayor frecuencia de muerte, fue de 44,44% ($n = 4$) y

ocurrió con la dosis D (7,08 $\mu\text{g/g}$). Con la dosis C (6,30 $\mu\text{g/g}$) y E (7,94 $\mu\text{g/g}$) la frecuencia fue de 22,22 % (n = 2). La dosis F (8,91 $\mu\text{g/g}$) tiene una frecuencia de 11,11% (n=1). Cuando se administró la dosis A (5,01 $\mu\text{g/g}$) y B (5,62 $\mu\text{g/g}$) todos los ratones sobrevivieron.

Tabla 1. Datos para el cálculo de la Dosis Letal (DL_{50}) del veneno de *Crotalus durissus ruruima* en ratones BALB^c (♀), administrado por VIP para 60 minutos de observación.

Ratón (n)	Peso (g)	Dosis (Anti -log)	Dosis ($\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$)	Dosis Total (μg)	Muerte (min)
Corrida No Válida					
1	20	A: 0,70	5,01	100,02	-
2	27,7	B: 0,75	5,62	155,67	-
3	18,73	C: 0,80	6,30	117	-
4	17,47	D: 0,85	7,08	123,69	-
5	23,78	E: 0,90	7,94	188,81	-
SUB – TOTAL					
Corrida Válida					
6	12,41	F: 0,95	8,91	110,57	† :51
7	16,86	E: 0,90	7,94	133,87	† :56
8	15,16	D: 0,85	7,08	107,33	† :33
9	16,89	C: 0,80	6,30	106,41	-
10	16,74	D: 0,85	7,08	118,52	† :59
11	17,55	C: 0,80	6,30	110,56	-
12	23,05	D: 0,85	7,08	163,19	† :48
13	20,91	C: 0,80	6,30	131,73	-
14	18,24	D: 0,85	7,08	129,14	-
15	25,34	E: 0,90	7,94	201,20	† :59
16	24,94	D: 0,85	7,08	176,57	† :51
17	20,65	C: 0,80	6,30	130,09	† :42
18	20,62	B: 0,75	5,62	115,88	-

19	19,58	C: 0,80	6,30	123,35	† :52
20		B: 0,75			⊗
\bar{X} 19,82		\bar{X} 6,80		Σ 2543,6	\bar{X} 50

Ratones válidos: R6→ R19+R20

†: Muerte

A: Anti $-\log$ 0,70 = 5,01

⊗: Punto Final

B: Anti $-\log$ 0,75 = 5,62

\bar{X} : Promedio

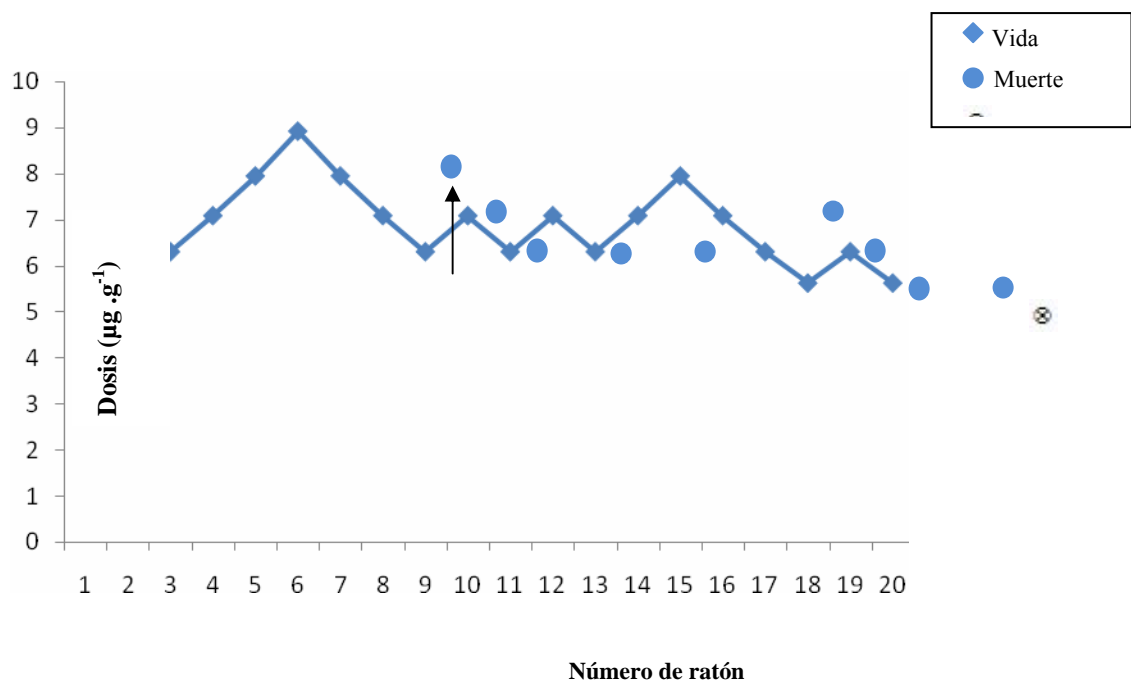
C: Anti $-\log$ 0,80 = 6,30

Σ : Sumatoria

D: Anti $-\log$ 0,85 = 7,08

E: Anti $-\log$ 0,90 = 7,94

F: Anti $-\log$ 0,95 = 8,91



Gráfica 1 Dosis Letal (DL_{50}) del veneno de *Crotalus durissus ruruima* en ratones BALB'c (♀), administrado por VIP para 60 minutos de observación.

Ratones hembra, del modelo mrido BALB'c, fueron inyectadas VIP con el veneno de *Crotalus durissus ruruima*. Los animales fueron observados por 60 minutos. La flecha indica el primer punto de inflexión e inicio de los datos válidos para el cálculo de la DL₅₀. El resultado se presenta como la mediana y sus límites de confianza al 95%.

DL₅₀ (VIP, 60 minutos) = 6,64 (6,35-7,12) mg/kg de ratón

ndice de Variabilidad = 11,6%

Tabla 2. Frecuencia de muerte inducida por el veneno de *Crotalus durissus ruruima* en el modelo mrido BALB`C (♀) según la dosis administrada por VIP.

N de ratón	Anti-Log dosis (mg·kg ⁻¹ de ratón)					
	Dosis A	Dosis B	Dosis C	Dosis D	Dosis E	Dosis F
	5,01	5,62	6,30	7,08	7,94	8,91
	Corrida no valida					
1	0	-	-	-	-	-
2	-	0	-	-	-	-
3	-	-	0	-	-	-
4	-	-	-	0	-	-
5	-	-	-	-	0	-
				Corrida	Valida	
6	-	-	-	-	-	† :51
7	-	-	-	-	† :56	-
8	-	-	-	† :33	-	-
9	-	-	0	-	-	-
10	-	-	-	† :59	-	-
11	-	-	0	-	-	-
12	-	-	-	† :48	-	-
13	-	-	0	-	-	-
14	-	-	-	0	-	-
15	-	-	-	-	† :59	-
16	-	-	-	† :51	-	-
17	-	-	† :42	-	-	-
18	-	0	-	-	-	-
19	-	-	† :52	-	-	-
	Punto final					

20	-	⊗	-	-	-	-
Datos validos n=9	0	0	2	4	2	1
[†]						
Frecuencia de muerte	-	-	22,22	44,44	22,22	11,11
[†]=100%						

†= Indica tiempo de muerte en minutos.

0: Indica sobrevivencia.

⊗= Indica punto final

En la tabla 3 se presentan los datos para el cálculo de la DL_{50} del veneno de *Crotalus durissus ruruima*, en ratones NMRI hembra, inyectados por VIP y observados durante 60 minutos.

El total de ratones NMRI, para la determinación de la DL_{50} fue de $n = 17$ con un peso promedio de 26,10 g. El punto de inflexión se ubicó en R_3 . A partir de este punto se consideró la corrida válida para calcular la DL_{50} ; ésta se ubicó desde R_3 hasta $R_{17} + R_{18}$ (punto final). La cantidad de veneno utilizado fue de 1685,31 μg (Tabla 3).

La DL_{50} para 60 minutos de observación, del veneno de *Crotalus durissus ruruima*, administrado por vía intraperitoneal en ratones hembra NMRI, se presenta en la gráfica 2, donde se puede observar una mediana de 3,77 (3,57-3,98) mg/kg de ratón y un índice de variabilidad de 10,88%.

La frecuencia de muerte causada por la administración del veneno se presenta en la tabla 4. Para este modelo, la mayor frecuencia de muerte (50%, $n = 4$) ocurrió con la dosis C (3,98 $\mu\text{g/g}$). Con las dosis B (3,55 $\mu\text{g/g}$) la frecuencia fue 25% ($n = 2$). Con la dosis D (4,47 $\mu\text{g/kg}$) y E (5,01 $\mu\text{g/g}$) fue 12,5% ($n=1$). Cuando se administró la dosis A (3,16 $\mu\text{g/g}$) todos los ratones sobrevivieron.

Tabla 3. Datos para el cálculo de la Dosis Letal (DL_{50}) del veneno de *Crotalus durissus ruruima* en ratones NMRI (♀), administrado por VIP para 60 minutos de observación.

Ratón (n)	Peso (g)	Dosis (Anti -log)	Dosis ($\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$)	Dosis Total (μg)	Muerte (min)
Corrida No Válida					
1	27,3	A: 0,50	3,16	86,27	-
2	28,74	B: 0,55	3,55	102,03	-
SUB – TOTAL					
Corrida Válida					
3	25,4	C: 0,60	3,98	101,09	† :56
4	28,35	B: 0,55	3,55	100,64	† :59
5	28,4	A: 0,50	3,16	89,74	-
6	24,52	B: 0,55	3,55	87,05	† :47
7	27,7	A: 0,50	3,16	87,53	-
8	23,8	B: 0,55	3,55	84,49	-
9	24,24	C: 0,60	3,98	96,48	† :55
10	27,15	B: 0,55	3,55	96,38	-
11	23,74	C: 0,60	3,98	94,49	-
12	28,92	D: 0,65	4,47	129,27	-
13	27,71	E: 0,70	5,01	138,83	† :50
14	25,23	D: 0,65	4,47	112,78	† :44
15	21,34	C: 0,60	3,98	84,93	† :48
16	24,63	B: 0,55	3,55	87,44	-
17	26,6	C: 0,60	3,98	105,87	† :40
18		B: 0,55			⊗
\bar{X} 26,10		\bar{X} 3,80		Σ 1685,31	\bar{X} 50

Ratones válidos: R3→ R17+R18

†: Muerte

A: Anti $-\log 0,50 = 3,16$

B: Anti $-\log 0,55 = 3,55$

C: Anti $-\log 0,60 = 3,98$

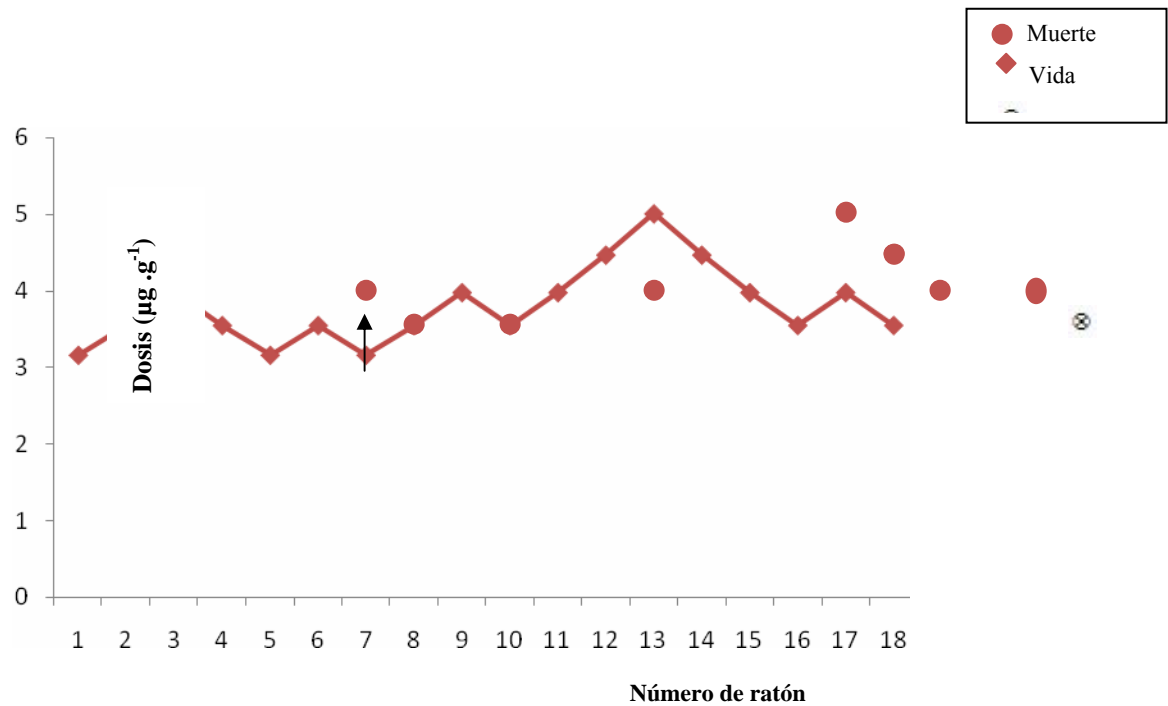
D: Anti $-\log 0,65 = 4,47$

E: Anti $-\log 0,70 = 5,01$

⊗: Punto Final

\bar{x} : Promedio

Σ : Sumatoria



Gráfica 2 Dosis Letal (DL₅₀) del veneno de *Crotalus durissus ruruima* en ratones NMRI (♀), administrado por VIP para 60 minutos de observación.

Ratones hembra, del modelo mrido NMRI, fueron inyectadas VIP con el veneno de *Crotalus durissus ruruima*. Los animales fueron observados por 60 minutos. La flecha indica el primer 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 de confianza al 95%.

DL_{50} (VIP, 60 minutos) = 3,77 (3,57-3,98) mg/kg de ratón

ndice de Variabilidad = 10,88%

Tabla 4. Frecuencia de muerte inducida por el veneno de *Crotalus durissus ruruima* en el modelo mrido NMRI (♀) según la dosis administrada por VIP.

N de ratón	Anti-Log dosis (mg·kg ⁻¹ de ratón)				
	Dosis A	Dosis B	Dosis C	Dosis D	Dosis E
	3,16	3,55	3,98	4,47	5,01
	Corrida no valida				
1	0	-	-	-	-
2	-	0	-	-	-
				Corrida Valida	
3	-	-	† :56	-	-
4	-	† :59	-	-	-
5	0	-	-	-	-
6	-	† :47	-	-	-
7	0	-	-	-	-
8	-	0	-	-	-
9	-	-	† :55	-	-
10	-	0	-	-	-
11	-	-	0	-	-
12	-	-	-	0	-
13	-	-	-	-	† :50
14	-	-	-	† :44	-
15	-	-	† :48	-	-
16	-	0	-	-	-
17	-	-	† :40	-	-
	Punto final				
18	-	⊗	-	-	-

Datos	0	2	4	1	1
validos	n=8				
[†]					
Frecuencia	-	25	50	12,5	12,5
de muerte					
[†]=100%					

†= Indica tiempo de muerte en minutos.

0: Indica sobrevivencia.

⊗= Indica punto final

En la tabla 5 se presentan los datos necesarios para el cálculo de la DL_{50} del veneno de *Crotalus durissus ruruima*, en ratones C57bl/6 hembra, inyectados por VIP y observados durante 60 minutos.

El total de ratones C57bl/6, para la determinación de la DL_{50} fue de $n = 18$ con un peso promedio de 17,72 g. El punto de inflexión se ubicó en R_2 . A partir de éste roedor se consideró la corrida válida para la determinación de la DL_{50} , ésta se ubicó desde R_2 hasta $R_{18} + R_{19}$ (punto final). La cantidad de veneno utilizado fue de 988,9 μg (Tabla 5).

La DL_{50} , del veneno de *Crotalus durissus ruruima*, administrado por vía intraperitoneal en ratones C57bl/6 hembra para 60 minutos de observación, se presenta en la gráfica 3, donde se puede observar una mediana de 3,16 (2,99 -3,25) mg/kg de ratón y un índice de variabilidad de 8,23%.

La frecuencia de muerte causada por la administración del veneno en estos ratones se presenta en la tabla 6. Para este modelo la mayor frecuencia de muerte (44,44%, $n = 4$) ocurrió con la dosis E (3,55 $\mu\text{g/g}$). Con las dosis C (2,82 $\mu\text{g/g}$) la frecuencia fue

22,22% (n = 2). Con la dosis B (2,51 $\mu\text{g/g}$), D (3,16 $\mu\text{g/g}$) y F (3,98 $\mu\text{g/g}$), la frecuencia de muerte fue de 11,11% (n=1). Cuando se administró la dosis A (2,24 $\mu\text{g/g}$) todos los ratones sobrevivieron.

Tabla 5. Datos para el cálculo de La Dosis Letal (DL_{50}) del veneno de *Crotalus durissus ruruima* en ratones C57bl/6 (♀), administrado por VIP para 60 minutos de observación.

Ratón (n)	Peso (g)	Dosis (Anti $-log$)	Dosis ($\mu g \cdot g^{-1}$)	Dosis Total (μg)	Muerte (min)
Corrida No Válida					
1	18,41	E: 0,55	3,55	65,36	† :44
SUB – TOTAL					
Corrida Válida					
2	18,93	D: 0,50	3,16	59,82	-
3	17,75	E: 0,55	3,55	63,01	† :45
4	18,25	D: 0,50	3,16	57,67	-
5	17,96	E: 0,55	3,55	63,77	† :53
6	17,63	D: 0,50	3,16	55,71	† :50
7	16,93	C: 0,45	2,82	47,74	† :47
8	18,28	B: 0,40	2,51	45,88	-
9	16,21	C: 0,45	2,82	45,71	† :52
10	17,28	B: 0,40	2,51	43,37	† :57
11	15,36	A: 0,35	2,24	34,41	-
12	16,62	B: 0,40	2,51	41,72	-
13	22,42	C: 0,45	2,82	63,22	-
14	18,16	D: 0,50	3,16	57,39	-
15	15,47	E: 0,55	3,55	54,92	-
16	15,73	F: 0,60	3,98	62,61	† :48
17	20,75	E: 0,55	3,55	73,66	† :45
18	16,75	D: 0,50	3,16	52,93	-
19		E: 0,55			⊗
\bar{X} 17,72		\bar{X} 3,10		Σ 988,9	\bar{X} 49
Ratones válidos: R2→ R18+R19				†: Muerte	
A: Anti $-log$ 0,35 = 2,24				\bar{X} : Promedio	

B: Anti $-\log 0,40 = 2,51$

C: Anti $-\log 0,45 = 2,82$

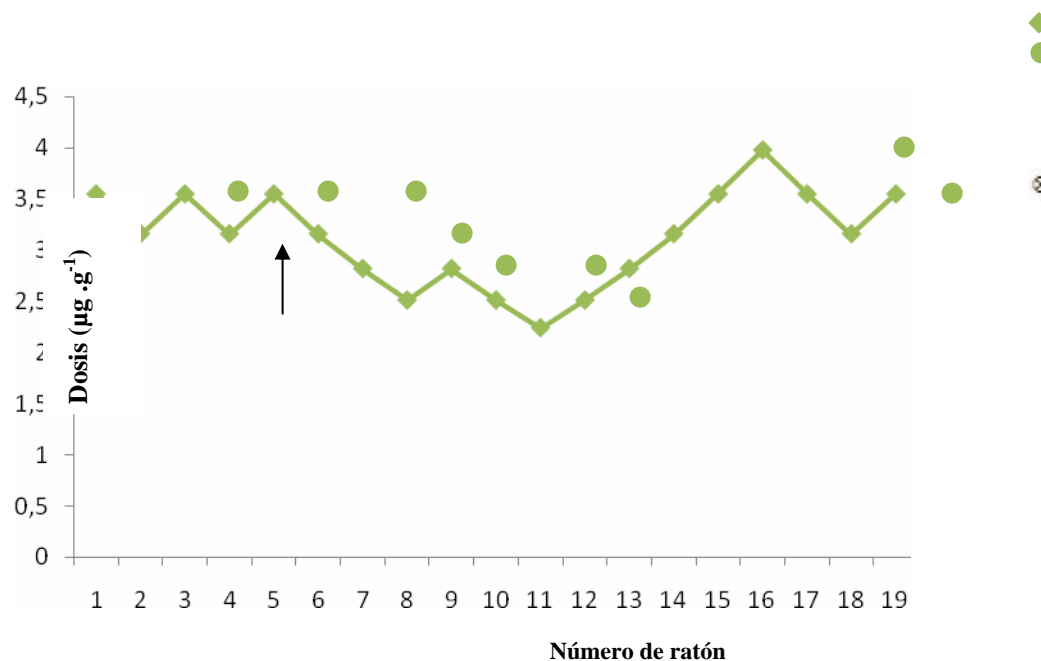
D: Anti $-\log 0,50 = 3,16$

E: Anti $-\log 0,55 = 3,55$

F: Anti $-\log 0,60 = 3,98$

Σ : Sumatoria

⊗: Punto Final



Gráfica 3. Dosis Letal (DL_{50}) del veneno de *Crotalus durissus ruruima* en ratones C57bl/6(♀), administrado por VIP para 60 minutos de observación.

Ratones hembra, del modelo múdo BALB'c, fueron inyectadas VIP con el veneno de *Crotalus durissus ruruima*. Los animales fueron observados por 60 minutos. La flecha indica el primer 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 de confianza al 95%.

DL_{50} (VIP, 60 minutos) = 3,16 (2,99-3,25) mg/kg de ratón

Índice de Variabilidad = 8,23%

Tabla 6. Frecuencia de muerte inducida por el veneno de *Crotalus durissus ruruima* en el modelo mrido C57bl/6 (♀) según la dosis administrada por VIP.

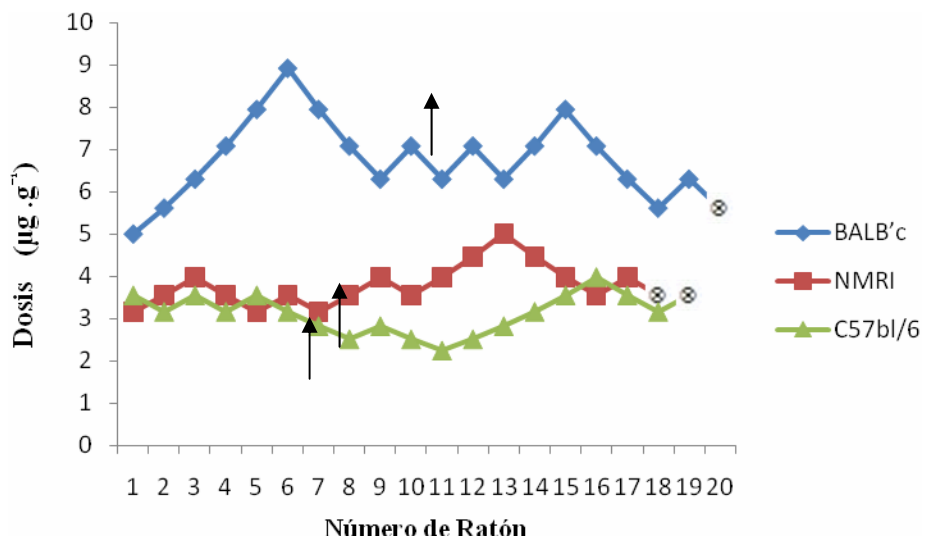
N de ratón	Anti-Log dosis (mg·kg ⁻¹ de ratón)					
	Dosis A	Dosis B	Dosis C	Dosis D	Dosis E	Dosis F
	2,24	2,51	2,82	3,16	3,55	3,98
	Corrida no valida					
1	-	-	-	-	† :44	-
				Corrida	Valida	
2	-	-	-	0	-	-
3	-	-	-	-	† :45	-
4	-	-	-	0	-	-
5	-	-	-	-	† :53	-
6	-	-	-	† :50	-	-
7	-	-	† :47	-	-	-
8	-	0	-	-	-	-
9	-	-	† :52	-	-	-
10	-	† :57	-	-	-	-
11	0	-	-	-	-	-
12	-	0	-	-	-	-
13	-	-	0	-	-	-
14	-	-	-	0	-	-
15	-	-	-	-	0	-
16	-	-	-	-	-	† :48
17	-	-	-	-	† :45	-
18	-	-	-	0	-	-
	Punto final					

18	-	-	-	⊗	-	-
Datos	0	1	2	1	4	1
validos	n=9					
[†]						
Frecuencia	-	11,11	22,22	11,11	44,44	11,11
de muerte						
[†]=100%						

†= Indica tiempo de muerte en minutos.

0: Indica sobrevivencia.

⊗= Indica punto final



Gráfica 4. Comparación Dosis Letal (DL_{50}) del veneno de *Crotalus durissus ruruima* en ratones C57bl/6, BALB'c y NMRI (♀), administrado por VIP para 60 minutos de observación

Al comparar las DL_{50} obtenidas con el veneno de *Crotalus durissus ruruima*, sobre las cepas de los modelos mridos BALB'c y NMRI hembras, administrado por VIP para 60 minutos de observación, empleando la técnica de análisis de varianza de Kruskall – Wallis, se encontró que BALB'C es más resistente al veneno (KW = 19,20; p = 0,000001). Al comparar las DL_{50} de los ratones NMRI con C57bl/6 resulta que los NMRI son más resistentes (KW= 12,75, p= 0,00008), determinando así, que la cepa C57bl/6 es la más sensible al veneno de *Crotalus durissus ruruima*, mientras que la BALB'c es la más resistente.

Tabla 7 Gasto biológico y sensibilidad al veneno de *Crotalus durissus ruruima* en ratones C57bl/6, BALB’c y NMRI hembras (VIP, 60 min de observación)

<i>Parámetros</i>	BALB’c	NMRI	C57bl/6
DL ₅₀ mg/kg de ratón	6,64	3,77	3,16
Veneno usado (µg)	1858,41	1497,01	923,54
Nº de ratones	14	15	17
Índice de variabilidad %	11,6	10,88	8,23

En la tabla 7 se observa que el modelo mÙrido C57bl/6 es más sensible al veneno de *Crotalus durissus ruruima* con una DL₅₀ de 3,16 mg/kg de ratón. Al contrario, los ratones BALB’c son los más resistentes (DL₅₀ de 6,64 mg/kg de ratón). En cuanto al número de ratones utilizados, fueron necesarios 14 ratones BALB’c, 15 NMRI y 17 C57bl/6. Los NMRI y BALB’c mostraron índices de variabilidad y gasto de ratones similares pero se usó un poco más de veneno con los primeros. En los experimentos de DL₅₀ con ratones C57bl/6 se usó un número levemente mayor de roedores (n=17), sin embargo, esta cepa fue la que mostró el menor índice de variabilidad de los ensayos realizados y la que requirió el menor gasto de veneno.

Los efectos tóxicos provocados por la administración del veneno de *Crotalus durissus ruruima*, en los modelos mÙridos C57bl/6, BALB’c y NMRI hembras, observados durante una hora de experimentación, se presentan en la tabla 8. Las manifestaciones clÍnicas como hipoactividad, taquipnea, rascado y defecación pastosa fueron los más frecuentes entre 57,14 y 100%, con un promedio de tiempo de aparición estimado entre 6 y 23 minutos. Otras manifestaciones clÍnicas observadas con menor frecuencia en los modelos mÙridos, fueron apnea, mioclonÍas, exoftalmos, cianosis y postración. En general, en las tres cepas de ratón, los signos dominantes

fueron propios del efecto neurotóxico (paralizante) del veneno, sin evidencias significativas entre estas.

Tabla 8. Manifestaciones clínicas de toxicidad aguda experimental observadas en ratones C57bl/6, NMRI y BALB'c (♀) inducidos por la administración VIP del veneno de *Crotalus durissus ruruima*

Manifestaciones clínicas	Nº de ratones			Aparición en %			\bar{X} de tiempo en minutos		
	C57bl/6	NMRI	BALB'c	C57bl/6	NMRI	BALB'c	C57bl/6	NMRI	BALB'c
Hipoactividad	16	14	14	100	100	100	21	23	17
Taquipnea	16	14	14	100	100	100	21	20	14
Rascado	15	14	8	93,75	100	57,14	8	11	6
Defecación pastosa	12	10	7	75	71,43	50	12	17	13
Convulsiones	10	2	5	62,5	14,29	35,71	45	47	46
Mioclónicas	11	8	8	68,75	57,14	57,14	26	39	31
Parálisis (en extensión)	14	7	9	87,5	50	64,29	36	41	37
Piloerección	10	3	10	62,5	21,43	71,43	34	20	33
Apnea y otros síntomas respiratorios	16	14	14	100	100	100	41	46	42
Postración	8	7	7	50	50	50	43	45	45
Marcha paretica	14	11	12	87,5	78,57	85,71	25	31	31
Cianosis	7	8	6	93,75	57,14	42,86	47	49	46
Exoftalmos	11	1	9	68,75	7,14	64,29	48	43	37

En general, las manifestaciones de toxicidad aguda experimental ocurrieron con frecuencias algo mayores en los ratones C57bl/6 (los más susceptibles) aunque con muchos signos (hipoactividad, postración, taquipnea, mioclonías, paresias, apnea y otras manifestaciones respiratorias) no hubo diferencias significativas en la frecuencia de aparición.

Tabla 9 Efecto procoagulante a diferentes diluciones del veneno de *Crotalus durissus ruruima*

Concentración (mg/ml)	1		0,5		0,25		0,1	
Prueba	A	B	A	B	A	B	A	B
Tiempo (seg)	10	9	18	17	26	32	101	81
\bar{x}	9,5		17,5		29		91	

La actividad procoagulante del veneno sobre el plasma se cuantificó midiendo el tiempo en el cual diferentes diluciones del veneno coagularon el plasma humano. Se obtuvo como resultado que la concentración de 1 mg/ml coaguló el plasma en 9,5 seg. Con 0,5 mg/ml, la coagulación ocurrió en 17,5 seg, con 0,25 mg/ml, en 29 seg y con 0,1 mg/ml, sobrepasó el minuto. La actividad procoagulante del veneno de *Crotalus durissus ruruima* se evidencia hasta la dilución 0,25 mg/dl.

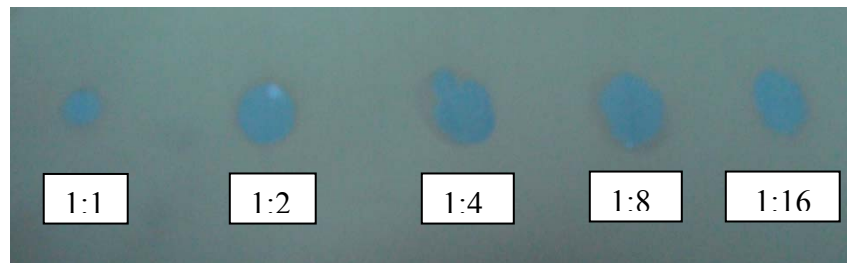


Figura 1. Actividad proteolítica del veneno de *Crotalus durissus ruruima* sobre el gel radiográfico

La actividad proteolítica del veneno de *Crotalus durissus ruruima* se estudia con diluciones sucesivas del veneno, colocadas sobre el gel radiográfico para evidenciar la digestión de la gelatina radiográfica. En la figura 1 se evidencia la digestión de proteínas del gel radiográfico hasta una dilución de 1:16

4.2 DISCUSIÓN

El envenenamiento ofídico especialmente los producidos por vipéridos es considerado un problema de Salud Pública en la mayoría de los países tropicales, ya que existe un elevado número de casos mortales, debido al elevado nivel tóxico de los venenos de esta categoría de serpientes. Venezuela es considerado uno de los países afectados, ya que en ella se encuentran especies venenosas como *Bothrops venezuelensis*, *Bothrops colombiensis* y *Crotalus durissus cumanensis*, todas estas serpientes junto con el resto, que completan las 150 especies, pueden ubicarse en las siguientes zonas biogeográficas: región del Lago de Maracaibo, Andina, Falcón-Lara, costera, llanos, Guayana, Amazónica y la región insular (Navarrete y col 2002).

Los envenenamientos por serpientes de la familia *Viperidae*, subfamilia *Crotalinae* están caracterizados por prominentes alteraciones a nivel local, incluyendo hemorragia, edema y necrosis, efectos que pueden resultar en secuelas permanentes, desarrollándose muy rápidamente después del envenenamiento causado principalmente por la crotoxina (Gutiérrez y col, 2000).

En 1938 es aislada la crotoxina, como el componente más importante del veneno de cascabel, con propiedades hemolíticas y neurotóxicas sobre los tejidos animales en donde se comprobó que la acción neurotóxica se evidencia por inhibición de la liberación de acetilcolina a nivel presináptico de la placa neuronal (Rodríguez, 1999).

Las serpientes de cascabel se encuentran en gran parte del territorio nacional, ubicándose entre el nivel del mar y los 2 500 metros sobre de altitud. *Crotalus durissus ruruima* se encuentra en el sur del país (Edo. Bolívar) y se extiende hasta Guyana y Brasil (Kornacker y Lancini, 1998).

Este estudio se basó en evaluar los efectos biológicos y la DL_{50} del veneno de *Crotalus durissus ruruima* en los modelos murinos C57bl/6, NMRI y BALB'C hembras, inyectados por vía intraperitoneal y para una hora de observación y compararlas entre sí.

Utilizando el método secuencial de Dixon y Mood (1948) modificado (Sevcik, 1987) se determinó que la DL_{50} para la cepa de ratones C57bl/6 fue particularmente menor a la DL_{50} de NMRI y éste, a su vez, menor al modelo BALB'c, lo cual corresponde con el resultado obtenido por Fuenmayor y Salazar (2009) con el veneno de *Crotalus durissus vegrandis*, quienes encontraron que la DL_{50} fue significativamente menor en ratones C57bl/6 que el obtenido en BALB'C, demostrando una mayor sensibilidad de C57bl/6 al efecto tóxico del veneno de la

especie estudiada, con lo cual, estos ratones (C57bl/6) resultando esta cepa más apropiada para el estudio del veneno con cascabeles.

Al comparar la potencia del veneno de *Crotalus durissus ruruima* con los de otros crotálidos, estudiados en el CICS con ratones C57bl/6, se tiene que la DL_{50} de *Crotalus durissus pifanorum* fue de 8,43 mg/kg de ratón (Acosta, Cayamo y Graziani; 2008), la de *Crotalus durissus cumanensis* de 10,6 mg/kg (Baldi y Chalhoud; 2007) y para *Crotalus durissus vegrandis* de 12,58 mg/kg de ratón (Valerio, 2007). Esta comparación indica que el veneno de *Crotalus durissus ruruima* es el más potente de todos los crotálidos hasta ahora estudiados en el CICS.

Arrijoja y Maneiro (2009) estudiaron la DL_{50} del veneno de *Crotalus durissus ruruima*, en el modelo mûrido C57bl/6 macho inyectados por vía intraperitoneal en una 1 hora de observación, obteniendo 3,17 mg/kg de ratón, resultados similares a los obtenidos en este estudio, Al menos con este veneno, no hay diferencia de susceptibilidad entre los ratones machos y hembra, diferente cuando se utilizan otros venenos de cascabeles, mostrando una mayor susceptibilidad los machos. Es posible que dosis muy bajas del veneno de *Crotalus durissus ruruima*, usados en los diversos experimentos, expliquen este fenómeno.

Los resultados presentados se corresponden con los de Hurtado, Montañó y Rodríguez (2008) quienes utilizaron veneno de la especie *Tityus nororientalis* (Scorpiones, Buthidae), la DL_{50} fue menor en ratones C57bl/6 ($DL_{50} = 8,43 \mu\text{g/kg}$ de ratón) que el obtenido en ratones hembra NMRI ($DL_{50} = 28,18 \mu\text{g/kg}$ de ratón) y éste, menor que el obtenido en los BALB'c ($DL_{50} = 40,07 \mu\text{g/kg}$ de ratón) demostrando que los modelos mûridos BALB'c y NMRI son más resistentes al veneno del escorpión *Tityus nororientalis* y los C57bl/6 los más sensibles.

Pirela de Salas y col (2006), demostraron que el veneno de *Crotalus durissus cumanensis* en la localidad de Porshoure, de La Guajira venezolana presenta una DL_{50} de 0,210 mg/kg, en ratones BALB'c para 24 horas de observación. Hernández y col (2005) expresaron que el veneno total del cascabel *Crotalus durissus cumanensis*, procedente de Caruachi, estado Bolívar, presentó una DL_{50} de 0,140 mg/kg de peso en ratones albinos NMRI para 24 horas de observación. Estas DL_{50} resultan imposibles de comparar con nuestros resultados, debido al tiempo de experimentación mayor para el cual fueron calculados.

La actividad proteolítica del veneno fue estudiada mediante el método de digestión de la gelatina de placa radiográfica, lo cual, permitió determinar que el veneno de *Crotalus durissus ruruima* tiene capacidad de digestión de proteínas que alcanzó una dilución de 1:16, comparable con los resultados presentados por Acosta, Cayamo y Graziani (2008) con el veneno de *Crotalus durissus pifanorum*, el cual, similarmente alcanzó una dilución de 1:16, pero muy inferior a los resultados obtenidos por Baldi y Chalboud (2007) con el veneno de *Crotalus durissus cumanensis*, quienes evidenciaron actividad proteolítica de este veneno hasta 512 diluciones. El veneno de *Crotalus durissus vegrandis* (Valerio, 2007) muestra una actividad proteolítica intermedia (256 diluciones).

La capacidad proteolítica de esta especie se puede explicar debido a la fuerte actividad de enzimas que han sido identificadas como metaloproteasas, específicas e inespecíficas dentro de las cuales, las más importantes son las que inducen hemorragias (Barraviera, 1994).

La actividad coagulante del veneno sobre el plasma se cuantificó midiendo el tiempo en el cual, las diferentes diluciones de los venenos coagulan el plasma humano. Se observó que el efecto procoagulante inducido por el veneno de *Crotalus durissus ruruima*, fue evidente hasta la dilución de 0,25 mg/ml para un tiempo de 29

seg, lo cual, puede ser comparado con los resultados obtenidos por Acosta, Cayamo y Graziani (2008) con el veneno de *Crotalus durissus pifanorum*, quienes encontraron que el veneno extraído de los adultos de esta especie coagula el plasma en un tiempo 26,7 segundos a esta dilución. Los venenos de *Crotalus durissus cumanensis* (Baldi y Chalhoud, 2007) y *Crotalus durissus vegrandis* (Valerio, 2007), muestran un poder coagulante menor (38,5 seg y 31,5 seg respectivamente) a dilución de 0,25 mg/ml. Estos resultados indican una relación del poder procoagulante del veneno de los cascabeles con su potencia, mucho más cercana, que con su efecto proteolítico.

Esta acción procoagulante puede ser explicada por la actividad que tiene el veneno activando el factor X, la protrombina y el fibrinógeno. La activación del factor X lleva a un aumento del consumo de plaquetas y de los factores V y VII, pudiendo desencadenar con esto un fenómeno de hipercoagulabilidad (Meier y col, 1991).

Al determinar las manifestaciones clínicas provocadas por la inyección intraperitoneal del veneno de *Crotalus durissus ruruima* en los diferentes modelos múridos, es importante considerar lo establecido con anterioridad, cuando se indicó que el cuadro clínico manifestado como consecuencia de la inyección del veneno de serpientes, resulta de la combinación de los diferentes efectos producidos por los componentes proteicos presentes en el veneno (Bogarín y col, 1999).

Los signos clínicos fueron observados durante 60 minutos, después de la inyección intraperitoneal del veneno, obteniéndose que los más frecuentes fueron hipoactividad, taquipnea, rascado de hocico y defecación pastosa, la mayor presencia de estos signos clínicos se explican por el hecho que el veneno de cascabel posee una acción predominantemente neurotóxica que se manifiesta a nivel presináptico en la placa motriz (Rodríguez, 1999). El veneno, una vez ubicado en las placas motoras, impide la liberación de acetilcolina, originando un bloqueo mioneuronal en la transmisión del

impulso nervioso a dicho nivel, con la consecuente parálisis muscular de extremidades y de músculos respiratorios (Mota 2008).

Entre otros signos, menos frecuentes, se pudieron encontrar espasmos musculares, cianosis, exoftalmo y apnea; el tiempo de aparición de las manifestaciones clínicas fue variable pero, en general, no hubo mayores diferencias entre las distintas cepas de ratón. Estos resultados corresponderían con los observados por Fuenmayor y Salazar (2009), por Astutillo y Bejarano (2008) y Baldi y Chalboud (2007); realizados con diferentes subespecies de cascabel, donde los signos neurotóxicos fueron los predominantes como manifestaciones de toxicidad aguda experimental en los roedores.

Es por estos motivos que la caracterización de los venenos de serpientes es necesaria para el entendimiento de los procesos fisiopatológicos que se producen ante su mordedura. Por otra parte, los valores reportados serían utilizados como referencia para la caracterización del veneno de esta subespecie y será un importante aporte en el estudio de las serpientes venenosas de esta zona. Así mismo, esta información permitiría que este veneno, según sus características toxinológicas, fuese considerado para su inclusión como inmunógeno en la formación de anticuerpos para la producción de antiveneno ofídico en nuestro país (Pirelas de las salas, 2006).

CAPITULO V: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1. CONCLUSIONES

La DL₅₀ del veneno de *Crotalus durissus ruruima* fue menor en ratones C57bl/6 en comparación con las otras cepas estudiadas.

Al comparar las DL₅₀ del veneno de *Crotalus durissus ruruima*, sobre las cepas de los modelos murinos estudiados, se encontró que la cepa BALB'C es más resistente al veneno.

El gasto de veneno y el índice de variabilidad de los experimentos utilizando ratones C5bl/6, resultan menor que con el uso de ratones de las cepas NMRI o BALB'c.

Las manifestaciones clínicas inducidas por el veneno de *Crotalus durissus ruruima* son predominantemente propias de neurotoxicidad y no muestran diferencias significativas entre las tres cepas de ratones estudiadas.

El veneno de *Crotalus durissus ruruima* es el más potente de todos los crotálidos venezolanos hasta ahora estudiado en el CICS.

La actividad procoagulante del veneno de *Crotalus durissus ruruima* se encuentra entre las más intensas entre los cascabeles venezolanos, relacionándose muy estrechamente con su poder tóxico.

La actividad proteolítica del veneno de *Crotalus durissus ruruima* fue, junto con la de *Crotalus durissus pifanorum*, la menos intensa entre los cascabeles estudiados hasta el momento.

5.2 RECOMENDACIONES

Mantener el uso de la cepa C57bl/6 como modelo para el estudio de toxicidad aguda con venenos de serpientes.

Incluir veneno de *Crotalus durissus ruruima* como inmunógeno en la fabricación de antivenenos, ya que éste es el más potente y el de mayor efecto coagulante de todos los cascabeles estudiados.

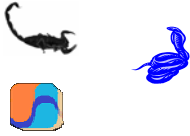
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

1. ACOSTA, L; CAYAMO, Y. y GRAZIANI, D. Efectos biológicos y DL-50 del veneno de *Crotalus durissus pifanorum*; estudio comparativo entre ejemplares juveniles y adultos, Tesis de grado (no publicado). Universidad de Oriente.2008.
2. ARRIOJA, A Y MANEIRO, F. Variabilidad genérica de la susceptibilidad al veneno de cuatro subespecies de cascabeles venezolanas en ratones c57bl/6. Trabajo de grado (no publicado). Universidad de Oriente (2009)
3. ASTUDILLO Y y M BEJARANO. Efectos biológicos y DL₅₀ del veneno de *Bothrops Colombiensis*; estudio comparativo entre ejemplares juveniles y adultos. Trabajo de grado. Universidad de Oriente, 2008
4. BALDI, P. y CHALHOUB, Y. Efectos biológicos y DL-50 del veneno de *Crotalus durissus cumanensis*; estudio comparativo entre ejemplares juveniles y adultos, Tesis de grado (no publicado). Universidad de Oriente. 2007.
5. BARRAVIERA B. Venenos animais. Uma visão integrada. Ed publicacoes científicas, 1era edición, Rio de Janeiro, 1994.
6. BOGARIN, G., M .ROMERO; G. ROJAS y col. Neutralization, by a monoespecific *Bothrops lanceolatus* antivenom, of toxic activities induced by homologous and heterologous *Bothrops* snake venoms. Toxicon. 1999; 37: 551-557.
7. CASTRILLÓN, D y col. Envenenamiento ofídico, Salud Uninorte. Barranquilla 2007; 23
8. (1): 96-111
9. DIXON WJ y AM MOOD. A method for obtaining and analyzing sensitivity data. J. Amer Stat. Assoc, 43: 109-126, 1948.

10. FERREIRA, M; DA SILVA, A; MOTA, I. Neutralization of different activities of venoms from nine species of Bothrops snakes by Bothrops jararaca antivenom. *Toxicon* 30, 1591-1602. 1992.
11. FRANCISCHETTI, I. Intraspecific variation in the venom of the south American rattlesnake (*Crotalus durissus terrificus*). *Comp Biochem Physiol (C) Toxicol Pharmacol*, 2002. 127(1): 23-36.
12. FUENMAYOR Y SALAZAR Dosis letal 50 del veneno de *Crotalus durissus cumanensis* y *Crotalus durissus vegrandis* (Serpentes, Viperidae) en los modelos múridos NMRI y BALB'c. tesis de grado no publicado. Universidad de Oriente 2009
13. GARCÍA PÉREZ, J. Una Nueva Especie de Cascabel (SERPENTES: *Crotalidae*) para el bolsón árido de Lagunillas, Cordillera de Mérida. Venezuela. Universidad de los Andes, Mérida, Venezuela. 1995.
14. GUTIÉRREZ, J.M; G, ROJAS y R, AYMERICH. El envenenamiento ofídico: Fisiología y tratamiento. Publicaciones de la Universidad de Costa Rica, Facultad de Microbiología, Instituto Clodomiro Picado. 2000
15. GUTIÉRREZ, J.M.; LEÓN, G.; VALVERDE, J.; ROJAS, G.; LOMONTE, B. Comparative study on the ability of IgG and Fab sheep antivenoms to neutralize local hemorrhage, edema and myonecrosis induced by *Bothrops asper* (Terciopelo) snake venom. *Toxicon* 38: 233-244. 2000.
16. HERNANDEZ M, JH FINOL, JC LOPEZ. Alteraciones ultraestructurales de tejido cardíaco tratado con veneno crudo de serpiente de cascabel (*Crotalus durissus cumanensis*). *RFM*, vol.28, no.1, p.12-16. ISSN 0798-0469, 2005.
17. HURTADO A, L MONTAÑO Y F RODRÍGUEZ. Comparación de la actividad biológica y DL₅₀ del veneno de *Tityus nororientalis* (Scorpiones, Buthidae) en ratones albinos de las cepas NMRI y BALB'c. Trabajo de grado. Universidad de Oriente, 2008.

18. KIRIAKOS, D. Envenenamiento ofídico en el Hospital Universitario Luís Razetti en el período 1989-1992. Tesis de Post-grado (no publicado). Universidad de Oriente. 1993.
19. KORNACKER, P. M. Lista sistemática y clave para las serpientes de Venezuela. 1^{ra} Ed. Rheinbach, Germany: Pako-Verlag. 270 pp. 1999.
20. LANCINI, A. Serpientes de Venezuela. Ernesto Armitano Ed. Caracas. 1986.
21. LANCINI, A. y P, KORNACKER. Die Schlangen von Venezuela. Verlag Armitano Ed.C.A. Caracas. 1989.
22. MARKLAND, F. Snake venoms and hemostatic system. *Toxicon*. 1998; 45(8): 1021-1039.
23. MEIER, J; STOCKER, K.: Effects of snake venoms on homeostasis. *Crit Rev Toxicol*, 21(3):171-82, 1991.
24. MONTERREY, F. Trabajo de grado. Facultad de ciencias, Universidad Central de Venezuela, Caracas. 2001.
25. MOTA, J. Vicente. Universidad Rómulo Gallegos. Hospital general Dr. Victorino Santaella Ruiz. Los Teques edo. Miranda. Accidente ofídico en Venezuela. 2008.
27. NAVARRETE S., L. Jornadas de Actualización "Manejo Básico de Accidentes con Animales Venenosos en Venezuela Instituto de Medicina Tropical Taxonomía e historia natural de las serpientes d

28. e Venezuela. Universidad Central de Venezuela. Caracas, Venezuela. Noviembre, 2002.
29. NEUWELT, EA et al Neurosurgery. 1999. 44:604-609
30. OTERO, R. Efectos farmacológicos y enzimáticos de los venenos de serpientes de Antioquia y Choco, Colombia. 1990, Toxicon. 30: 611- 620.
31. PIFANO, F. Síndrome de envenenamiento ofídico, Universidad Central de Venezuela Caracas. 1989
32. PIRELA, R. y J. HERNÁNDEZ. Caracterización toxicológica de veneno total de la serpiente cascabel *Crotalus durissus cumanesis* (viperidae) presentes en la localidad de Porshoure, guajira Venezolana. Revista. 2006; 16(3): 232-238.
33. RODRÍGUEZ, ACOSTA; A, MONDOLFI; R, ORIHUELA y col ¿Qué hacer frente a un accidente ofídico?, Universidad Central de Venezuela, Caracas. 1995.
34. RODRÍGUEZ ACOSTA, A. Los venenos y el síndrome de envenenamiento ofídico, instituto de medicina tropical, Universidad Central de Venezuela, Caracas, Venezuela. 1998.
35. RODRÍGUEZ C., OMAÑA, B. Clínica Y Tratamiento De Los Accidentes Ofídicos De Venezuela. Hospital Leopoldo Manrique T. Caracas, Venezuela. 1999.
36. ROSENFELD, G. Symptomatology, pathology and treatment of snake bites in South America. In: Bûrkel, W., Buckey, E & Delofeu, V. Eds. Venomous animals and their venoms. New Cork Academia press, USA. 1971.
37. TORO, G. A randomized double-blind clinical trial of two antivenenom in patients bitten by *Bothrops atrox* in Colombia. Toxicon. 1999; 37: 895-909.
38. VALERIO, M. Efectos biológicos y DL-50 del veneno de *Crotalus durissus vegrandis* (Serpentes, Viperidae); Estudio comparativo entre ejemplares adultos y juveniles. Tesis de grado (no publicado). Universidad de Oriente.2007.



Anexo nº 1

UNIVERSIDAD DE ORIENTE

NÚCLEO DE ANZOÁTEGUI

ESCUELA DE MEDICINA

CENTRO DE INVESTIGACIONES EN CIENCIAS DE LA SALUD (CICS)

LABORATORIO DE TOXINOLOGÍA

FICHA DE RESULTADOS

DL₅₀ MÉTODO:

EXPERIMENTO:

VENENO (ESPECIE, SEXO):

ANIMAL EXPERIMENTAL:

(Número del animal, peso, vía de inyección)

CÁLCULO DE DOSIS:

Factor		Dosis (volumen)
--------	--	-----------------

Tabla de Resultados:

Tiempo

Manifestaciones clínicas

01.	
02.	
03.	
04.	
05.	
06.	
07.	
08.	
09.	
10.	
11.	
12.	



Figura N°2.



Hipoactividad.

Figura N°2.
Marcha
parética.



Figura N°3. Parálisis en extensión.



Figura N°4.
Postración.



Figura N°5.
Convulsión.



**METADATOS PARA TRABAJOS DE GRADO, TESIS Y
ASCENSO:**

TÍTULO	EFFECTOS BIOLÓGICOS Y DOSIS LETAL 50 (DL-50) DEL VENENO DE <i>Crotalus durissus ruruima</i> EN TRES MODELOS MÚRIDOS
SUBTÍTULO	

AUTOR (ES):

APELLIDOS Y NOMBRES	CÓDIGO CULAC / E MAIL
Cazorla S. Mariadella.	CVLAC: 17.848.436 E MAIL: mariadellacs@hotmail.com
Quijada O. Dallana.	CVLAC: 17.848.813 E MAIL: daquiorx@hotmail.com
Salazar B. Dámaso J.	CVLAC: 16.930527 E MAIL: formuladamaso8520@hotmail.com
	CVLAC: E MAIL:

PALÁBRAS O FRASES CLAVES:

Dosis letal 50 (DL50)_____

*Crotalus durissus ruruima*_____

Múridos_____

METADATOS PARA TRABAJOS DE GRADO, TESIS Y ASCENSO:

ÁREA	SUBÁREA
Ciencias de la Salud	Escuela de Medicina

RESUMEN (ABSTRACT):

Se determinó la DL_{50} del veneno de *Crotalus durissus ruruima* en los modelos múridos C57bl/6, NMRI y BALB`c hembras, inyectados por vía intraperitoneal y para una hora de observación, por el método secuencial de Dixon y Mood (1984) y modificado por Sevcik (1987). Los resultados obtenidos para las DL_{50} fueron 6,64 mg/kg para BALB`c, 3,77 mg/kg para NMRI y 3,16 mg/kg para C57bl/6. Las manifestaciones clínicas mas observadas fueron hipoactividad, taquipnea, rascado y defecación pastosa con frecuencias que variaron entre 57,14 y 100%, con un promedio de tiempo de aparición entre 6 y 23 minutos. Otras manifestaciones clínicas observadas con menor frecuencia en los tres modelos múridos fueron apnea, espasmos musculares, exoftalmos, cianosis y postración. La actividad procoagulante del veneno de *Crotalus durissus ruruima*, se evidenció hasta la dilución 0,25 mg/ml. La actividad proteolítica evaluada, como digestión de proteínas del gel radiográfico, se evidenció hasta una dilución de 1:16. Se concluye que los ratones C57bl/6 son más susceptibles al veneno *Crotalus durissus ruruima* siendo además, los que muestran menor índice de variabilidad y de gasto de material biológico en los experimentos, por lo que, resultan ser los más adecuados para este tipo de ensayos.

CONTRIBUIDORES:

APELLIDOS Y NOMBRES	ROL / CÓDIGO CVLAC / E_MAIL				
Kiriakos, Demetrio	ROL	CA	AS X	TU	JU
	CVLAC:	5.698.723			
	E_MAIL	kiriakosch@cantv.net			
	E_MAIL				
De Sousa, Leonardo	ROL	CA	AS	TU	JU X
	CVLAC:	14.214.493			
	E_MAIL	leonardodesousa@yahoo.com			
	E_MAIL				
Alicia, Jorquera	ROL	CA	AS	TU	JU X
	CVLAC:	10.822.219			
	E_MAIL	alijorque@yahoo.es			
	E_MAIL				
	ROL	CA	AS	TU	JU
	CVLAC:				
	E_MAIL				
	E_MAIL				

FECHA DE DISCUSIÓN Y APROBACIÓN:

2009	07	22
AÑO	MES	DÍA

LENGUAJE. SPA

METADATOS PARA TRABAJOS DE GRADO, TESIS Y ASCENSO:

ARCHIVO (S):

NOMBRE DE ARCHIVO	TIPO MIME
DL50 de <i>C.d. ruruima</i> .doc	APPLICATION/MSWORD

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: _____ (OPCIONAL)

TEMPORAL: _____ (OPCIONAL)

TÍTULO O GRADO ASOCIADO CON EL TRABAJO:

Médico Cirujano _____

NIVEL ASOCIADO CON EL TRABAJO:

Pre - Grado _____

ÁREA DE ESTUDIO:

Ciencias de la Salud _____

INSTITUCIÓN:

Universidad de Oriente Núcleo de Anzoátegui _____

METADATOS PARA TRABAJOS DE GRADO, TESIS Y ASCENSO:

DERECHOS

De Acuerdo al artículo 44° del reglamento de trabajo de grado: “Los trabajos de grado son de exclusiva propiedad de la Universidad, y sólo podrán ser utilizados a otros fines con el consentimiento del Consejo de Núcleo respectivo, quien lo participará _____ al _____ Consejo Universitario” _____

Cazorla; S. Mariadella Quijada; O. Dallana Salazar; B. Dámaso J
AUTOR AUTOR AUTOR

Kiriakos; Demetrio De Sousa; Leonardo Jorquera; Alicia
TUTOR JURADO JURADO

OVALLES; MARÍA
POR LA SUBCOMISION DE TESIS

