



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

Variabilidad genérica de la susceptibilidad al veneno de *B. venezuelensis* y *B. colombiensis* (SERPENTES; VIPERIDAE) en ratones C57bl/6.

Tutor:

Prof: Kiriakos Demetrio

Presentado por:

Clavell, Diana.

Díaz, Jennifer.

Domínguez, Damelys.

Trabajo presentado como requisito parcial para optar
al título de MÉDICO CIRUJANO

Barcelona, Agosto 2010



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

Variabilidad genérica de la susceptibilidad al veneno de *B. venezuelensis* y *B. colombiensis* (SERPENTES; VIPERIDAE) en ratones C57bl/6.

Tutor:

Prof: Kiriakos Demetrio

Presentado por:

Clavell, Diana.

Díaz, Jennifer.

Domínguez, Damelys.

Trabajo presentado como requisito parcial para optar
al título de MÉDICO CIRUJANO

Barcelona, Agosto 2010.



UNIVERSIDAD DE ORIENTE
ESCUELA DE CIENCIAS DE LA SALUD
NUCLEO DE ANZOATEGUI
COMISION DE TRABAJO DE GRADO

DECLARACION JURADA

El trabajo de grado presentado por las bachilleres **Clavell Rojas, Diana CI: 17.360.362; Díaz Zapata, Jennifer CI: 16.480.582 y Domínguez López Damelys CI: 17.537.244**, titulado “**Variabilidad genérica de la susceptibilidad al veneno de *B. venezuelensis* y *B. colombiensis* (SERPENTES; VIPERIDAE) en ratones C57bl/6**”, ha sido aprobado por el jurado evaluador quienes lo han encontrado correcto en su contenido y forma de presentación, así mismo, declaran que los datos presentados son responsabilidad exclusiva de su autor, en fe de lo cual firman:

Prof. González Luis

Prof. Ovalles María

Prof. Kiriakos Demetrio

Dra. Villegas Rosibel
Presidenta de la comisión Trabajo de Grado
Escuela de Ciencias de la Salud.

AGRADECIMIENTOS

La realización de esta investigación fue posible gracias a la contribución de muchas personas, quienes con su experiencia, conocimiento, sugerencias, estímulos y disposición lograron que llegara a una culminación exitosa.

En primer lugar, al Dr. Kiriakos, quien en todo momento nos guió para el desarrollo de este trabajo.

En segundo lugar al Serpentario de la Universidad de Oriente Núcleo Anzoátegui puesto que en éste se encontraban las serpientes de las cuales obtuvimos el veneno para la realización de los experimentos requeridos.

Al Centro de Investigaciones en Ciencias de la Salud (CICS) de la Universidad de Oriente Núcleo de Anzoátegui, especialmente al Dr. De Sousa, quien aportó datos significativos y siempre estuvo dispuesto a ayudarnos.

DEDICATORIA

Quiero dedicárselo a:

1.- Dios por darme salud, guiarme por el camino adecuado y por darme la paciencia y persistencia para llevar a cabo mis propósitos.

2.- Mi papá y mi mamá por haberme dado la vida, por acompañarme en cada uno de mis pasos, por estar en los momentos difíciles y por darme el aliento necesario para enfrentar cada uno de los obstáculos que se han presentado.

3.- Ernestico mi hermano, por toda la ayuda que me ha brindado.

4.- Mi abuelo Efraín y mi abuela Ligia por su colaboración y compañía brindada a lo largo de toda mi carrera y a la abuela Rosa por tenerme presente en cada una de sus oraciones y por estar pendiente de mí.

5.- Mis tíos (Vicente, Maribel, Sonia, Elías y Maysa) por extenderme su mano amiga de forma incondicional y por estar presente en los momentos difíciles.

6.- Krissly mi prima, por brindarme de su tiempo para escucharme, apoyarme y respaldarme en las decisiones tomadas.

7.- Lago gracias por ofrecerme tu cooperación y apoyo en todos los momentos en que más lo necesitaba y por la amistad incondicional que tenemos.

8.- Jennifer y Damelys estoy muy complacida de formar parte de su grupo y de contar con el apoyo, paciencia y amistad que nos ha permitido entendernos y tener la amistad que hoy tenemos.

9.- Querida amiga Yanetsy (mona) por todas sus atenciones brindadas y por su respaldo a lo largo de los 7 años de carrera.

10.- El Dr. Kiriakos y Dr. De Sousa fue muy agradable el tiempo que compartí con ustedes y le estoy agradecida por el tiempo, colaboración y dedicación ofrecida y con la cual espero contar en el tiempo venidero.

Diana Clavell

Quiero dedicárselo a:

1.- Primero a mi Señor Jesucristo por cada día de su misericordia y fidelidad para conmigo; puesto que sin su ayuda y presencia nada de lo que hasta ahora tengo lo hubiera podido lograr.

2.- Mis queridos y apreciados padres, Henry y Xiomara; por su incomparable amor, porque por ellos existo y por ser los responsables de inculcarme los principios y educación que hoy en día me caracterizan.

3.- Mi queridísima abuela María ya que desde mi nacimiento me ha brindado incondicionalmente su amor, paciencia e infinitos cuidados y atenciones.

4.- Yaribays mi prima, que siempre ha estado dispuesta a ayudarme cuando más lo he necesitado.

5.- Mis compañeras de tesis y amigas; Damelys y Diana, por darme la oportunidad de realizar junto a ellas nuestra tesis de grado; gracias por su paciencia, apoyo, comprensión pero por sobre todo su autentica amistad.

6.- Diomigdy mi gran amiga, no podía dejar de agradecerle porque en estos 7 años que tenemos de amistad siempre me ha brindado su apoyo y cariño de forma incondicional y me ha aceptado tal como soy con mis virtudes y defectos.

7.- Ubaldo mi amor; por estar a mi lado y darme la dicha y el privilegio de ser madre.

8.- Sr Irma por brindarme su amistad y por todas las atenciones que ha tenido siempre conmigo.

9.- Dr Kiriakos y Dr De Sousa por hacer posible la realización de esta tesis al brindarnos sus conocimientos, tiempo y paciencia durante todo el desarrollo del presente trabajo.

Jennifer Díaz.

A DIOS, por ser el creador y guía de mi vida. Gracias por darme una razón para soñar y estar siempre conmigo, sin ti no lo hubiese logrado. Gracias por iluminar mis días y darme el tacto de sentir tu presencia en todo momento, porque nuestra comunicación es mágica y especial.

TE AMO Padre Celestial..!

A mis padres **Jesús y Luisa** a los cuales extrañe en cada amanecer de estos siete años por no tenerlos cerca, pero Gracias a su amor constante, comprensión y confianza iluminaron cualquier penumbra en mi camino, y me dieron las herramientas para levantarme cuando había caído, y así ser mas fuerte...Sin ustedes no lo hubiese logrado. Los amo intensamente. Esto es por ustedes y para ustedes. Orgullosa de que sean mis padres.

LOS AMO son mi vida entera..!

A mis hermanos **Dayana y Dannys**; Por ser los mejores del mundo, por apoyarme en todo momento y brindarme siempre ese apoyo incondicional. Manis te extraño!!!

Los amo intensamente..!

A mi abuela Bernada Tiamo; por abrirme sus puertas y brindarme el apoyo, cariño y protección de una madre... Gracias abuela. Este triunfo también es para ti...

Te adoro abuela..!

A ti, Manuel Enrique..! Mi ángel bello, porque siempre creíste en mí, porque el tiempo que me regalaste aquí en la tierra fue perfecto para tomar todo lo bueno de ti, Diera la vida porque aun estuvieses con nosotros... Aun te extraño hermanito! Eres irremplazable en mi vida, como TU nadie...

Siempre Te Amare..!

A mi tesoro más grande. "MIS NIÑOS" los cuales con su ternura y sus sonrisas mágicas alegraron mis días amargos... Con solo verles sus caritas, encontraba la

paz perdida, Los adoro a todos... Samuelito, Manolete, Georcita, José ángel, Dianita, Jesusito y mi santi... Gracias por tanto amor y cariño DIOS me los bendiga.

Los Adoro mis Pedacitos de Felicidad..!

A mi tía, Nancy López! Figura como motivación al logro... Te adoro mi gorda gracias por tantos consejos y tanto amor... Y a las morochas (Mary y Rosi) por ser como mis hermanas y ayudarme en todo momento... Gracias por todo!

Las Quiero un Montón..!

A mis primos... Los mejores del mundo, Por apoyarme y regalarme siempre su cariño. Mil Gracias Mila, Ana, Luis, Felo y Andre.

Los quiero Primos..!

A personas que conocí durante la carrera y llenaron mis días de alegrías y enseñanzas... A ustedes muchas gracias por estar cuando los necesitaba... Prof. Kiriakos, Prof De Sousa. Y a mis amigas de siempre Diomi, Jenni, Jessica y Diana.

Gracias por todo..!

Y por ultimo pero no menos importante, a esa persona que estando lejos o cerca, permaneció siempre a mi lado, Gracias por ser tan especial, y por alegrarme los días con tu buen humor...

Mil Gracias Vida..!

Damelys Domínguez.

RESUMEN

Variabilidad genérica de la susceptibilidad al veneno de *B. venezuelensis* y *B. colombiensis* (SERPENTES; VIPERIDAE) en ratones C57bl/6. Clavell R. Diana; Díaz Z. Jennifer; Domínguez L. Damelys y Kiriakos, Demetrio. Universidad de Oriente, Núcleo Anzoátegui, 2010.

Se determinó la DL_{50} del veneno de *B. venezuelensis* y *B. colombiensis* en el modelo murino C57bl/6, macho, inyectados por vía intraperitoneal y para una hora de observación, por el método de Dixon y Mood (1948) modificado por Sevcik (1987). Los resultados obtenidos para la DL_{50} de *B. venezuelensis* fue de $15,96 \text{ mg/kg}^{-1}$ de ratón y la de *B. colombiensis* de $14,99 \text{ mg/kg}^{-1}$ de ratón. Al compararlas con la DL_{50} previamente establecidas en ratones hembra de la misma cepa, podemos concluir que al utilizar veneno de *B. venezuelensis* los roedores hembras son más susceptibles que los machos, mientras que al usar el veneno de *B. colombiensis* los roedores machos presentan mayor susceptibilidad que las hembras. Los signos de toxicidad más frecuentemente observados luego de la inyección del veneno de *B. venezuelensis* y *B. colombiensis* fueron similares y entre éstos destacan: taquipnea, hipoactividad y postración en un 100% con un tiempo de aparición promedio de 3, 7 y 12 minutos respectivamente. El gasto de veneno e índice de variabilidad al usar *B. venezuelensis* fue de $6.733,03 \mu\text{g}$ y 6.08% respectivamente, mientras que, al usar veneno de *B. colombiensis* el consumo de veneno fue de $3200,12 \mu\text{g}$ y el índice de variabilidad de $11,47\%$. En conclusión, el gasto biológico, la variabilidad de los experimentos y DL_{50} son similares y sólo muestran variaciones individuales, por lo que es indiferente si se utilizan ratones hembras o machos.

CONTENIDO

AGRADECIMIENTOS	iv
DEDICATORIA	v
RESUMEN.....	xi
CONTENIDO	xii
LISTA DE TABLAS	xiii
INTRODUCCIÓN	1
OBJETIVOS	8
1.2 General	8
1.3 Específicos	8
JUSTIFICACIÓN	9
MATERIALES Y MÉTODOS	10
1.4 Tipo de Investigación.....	10
1.5 Variables	10
1.6 Materiales.....	10
1.7 Procedimiento:	11
1.7.1 Extracción del veneno:.....	11
1.7.2 Determinación de la dosis letal:	11
1.7.3 Procesamiento de los Datos:	13
RESULTADOS.....	14
DISCUSIÓN	20
CONCLUSIONES	24
RECOMENDACIÓN.....	25
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	26
ANEXOS	29

LISTA DE TABLAS

Tabla 1: Datos para el cálculo de la Dosis Letal (DL ₅₀) del veneno de <i>Bothrops colombiensis</i> en ratones macho C57bl/6, administrado por VIP para 60 min de observación.	14
Tabla 2: Datos para el cálculo de la Dosis Letal (DL ₅₀) del veneno de <i>B. venezuelensis</i> en ratones macho C57bl/6, administrado por VIP para 60 min de observación.	15
Tabla 3: Frecuencia de muerte inducida por el veneno de <i>B. colombiensis</i> . C57bl/6 macho. VIP. 60 min.	16
Tabla 4: Frecuencia de muerte inducida por el veneno de <i>B. venezuelensis</i> . C57bl/6 macho. VIP. 60 min.	17
Tabla 5: Signos clínicos de toxicidad observados en ratones C57bl/6 macho, durante 60 min, posterior a la administración intraperitoneal del veneno de <i>B. colombiensis</i> y <i>B. venezuelensis</i>	18
Tabla 6: Gasto biológico y variabilidad de los experimentos en el cálculo de la DL ₅₀ C57bl/6 (macho y hembra).	19

INTRODUCCIÓN

La industrialización trajo como consecuencia el desplazamiento de un número importante de personas desde poblaciones rurales a centros urbanos disminuyendo la frecuencia de algunos problemas de salud, entre ellos, el ataque de serpientes venenosas. Sin embargo, hoy en día algunos habitantes de bajos recursos de nuestro país se alojan en terrenos baldíos cercanos a montañas o con abundante maleza, edificando viviendas improvisadas, lo que aumenta el riesgo de accidentes ofídicos (González, 2008).

El accidente ofídico se define como el resultante de la inyección accidental de sustancias venenosas por parte de serpientes que pertenecen a las familias Viperidae y Elapidae, ya que poseen glándulas capaces de segregar venina y ser introducidas al organismo a través de sus colmillos, produciendo síntomas en el hombre (Mota, 2008).

El accidente ofídico representa un importante problema de salud pública en las zonas tropicales y subtropicales del mundo. Las estadísticas de la Organización Mundial de la Salud revelan que a nivel mundial se registran anualmente cerca de 5 millones de accidentes por animales ponzoñosos de los cuales entre el 50 y 75% requieren tratamiento para prevenir la muerte, amputaciones o secuelas permanentes (OMS, 2007). En Latinoamérica ocurren 150.000 accidentes ofídicos por año con 5.000 muertes por esta causa. Tienen mayor riesgo los hombres que habitan en áreas rurales de países tropicales, en especial quienes trabajan en el campo, en época de lluvia y en horas de la tarde; los niños de dichas áreas les siguen en frecuencia por escasa supervisión de sus padres. Venezuela al ser un país tropical presenta índices considerables de envenenamiento ofídico, contando con amplia variedad de ofidios venenosos distribuidos en el territorio nacional,

que causan alrededor de 4.000 a 7.000 casos de envenenamiento por año (González, 2008).

El Estado Anzoátegui, aunque no figure dentro de los más endémicos del país, tiene una producción de casos de envenenamiento ofídico nada despreciable. Según los datos de la Dirección de Epidemiología Especial, del Estado Anzoátegui, en el quinquenio 95-99, nuestro estado promedió más de 250 casos por año (tasa promedio de 28 por 100.000 habitantes). Otro factor que influye sobre el número de casos de envenenamiento ofídico es la estación del año. Efectivamente, ocurren accidentes durante todo el año, pero aumentan hacia el segundo semestre del mismo, coincidiendo con el periodo de lluvias que, en nuestro país, ocurre entre junio y noviembre aproximadamente (Kiriakos, 2001).

Los ofidios o serpientes son animales que pertenecen al filo de los cordados (Chordata), que poseen cuerda dorsal y simetría bilateral, clase Reptilia, cuellos flexibles, alargados, cilíndricos y un corazón con tres cavidades, respiración pulmonar, temperatura corporal variable (ectotermos) y forman parte del grupo de los vertebrados (Vertebrata) por tener un endoesqueleto y un cráneo que envuelve al encéfalo y se les ha incluido dentro del Orden de los Escamosos (Squamata) y suborden Serpentes porque tienen el cuerpo totalmente cubierto de escamas epidérmicas (Pérez Ramos y col, 2000).

Tienen preferencia por vivir en selvas, sabanas y bosques cálidos y húmedos, aunque también habitan en las zonas templadas y las desérticas. La dispersión altitudinal en los ofidios se extiende desde el nivel del mar hasta los lugares cercanos al límite inferior a las nieves perpetuas (Mota, 2008).

En Venezuela la mayor incidencia de accidentes ofídicos ocurren, en orden de frecuencia, en los siguientes estados: Zulia, Táchira, Lara, Portuguesa, Carabobo, Bolívar, Barinas, Miranda, Apure, Falcón, Trujillo y Mérida; mientras que las

tasas más bajas se observaron en los estados (Delta Amacuro, Vargas, Distrito Capital, Amazonas y Nueva Esparta).

El estado Anzoátegui se sitúa en la décimasexta posición con 205 casos por año y una tasa de 14,6 (Anuario de epidemiología y estadística vital del Ministerio del Poder Popular para la Salud, 2004).

Las serpientes se agrupan en 19 familias de las cuales sólo dos son peligrosas para el humano (Viperidae y Elapidae). No obstante desde el punto de vista médico, es de interés agruparlas de acuerdo a su peligrosidad, tomando en cuenta su tipo de dentición: aglifas (sin colmillos); opistoglifas (un par de colmillos acanalados y fijos situados en la parte trasera del maxilar); proteroglifas (un par de colmillos fijos, acanalados o huecos, situados en la parte delantera del maxilar) y las solenoglifas (un par de colmillos móviles, huecos y situados en la parte delantera del maxilar). Los Elápidos son proteroglifos y los Vipéridos, solenoglifos (Pérez Ramos y col, 2000).

Siguiendo el orden de ideas, las serpientes venenosas de Venezuela pertenecen a varios géneros: *Bothrops*, *Bothriechis*, *Bothriopsis*, *Porthidium*, *Crotalus*, *Lachesis*, *Leptomicrurus* y *Micrurus*. Los 6 primeros corresponden a la familia Viperidae y los últimos dos, a Elapidae (Campbell y Lamar, 2004).

En la familia Viperidae se incluye a la subfamilia Crotalinae, la cual, se caracteriza por tener especies desarrolladas, robustas, de colores opacos, cabeza ancha, triangular o romboidal, con escamas aquilladas (carenadas), ojos de pupila vertical y, su característica distintiva, una fosa termorreceptora a nivel de las escamas loreales (Sandner – Montilla, 1994).

La distribución geográfica de las serpientes se encuentra relacionada con su comportamiento bioecológico. Así, *Bothrops* y *Lachesis* se ubican en regiones húmedas del piso tropical y subtropical, piedemonte, márgenes de los ríos y quebradas; son especies agresivas y provocan accidentes graves. Mientras que

Crotalus y *Micrurus* se encuentran preferiblemente en las sabanas, pie de montes y regiones xerófilas. En atención a lo expuesto, desde el punto de vista epidemiológico, predominan los casos de accidente ofídico tipo Bothrópico en alrededor de un 80% (Mota, 2008).

En Venezuela hay 05 especies de *Bothrops* conocidas, las cuales son: *B. colombiensis* (considerada por connotados autores como *B. asper*), *B. venezuelensis*, *B. atrox*, *B. brazili* y *B. isabellae* (Campbell - Lamar, 2004 y Lancini - Kornocker, 1989) siendo objeto de estudio en esta investigación las dos primeras especies.

Bothrops venezuelensis cuyos nombres vulgares son tigre mariposa, barriga morada, rabo de candela, cachete de puinke y cuatro narices, tiene una longitud promedio 1142 mm (máximo: 1677 mm); dosis veneno capaz de matar a un adulto 20 mg. Sus colores básicos pueden variar desde el gris claro al oliva, pardo, amarillo, limón, morado y verde claro, con marcas negras trapezoidales y puntos debajo, separadamente dispuestos y bordes claros de anchura mayor en la parte media, se confunde con el color básico a medida que se ensancha. La cara ventral es gris a negra, más hacia la parte posterior. Presenta una banda temporal negra, ancha y bordeada de blanco. Escamas subcaudales todas divididas (Sandner – Montilla, 1994). Posee hábitos nocturnos y prefiere vivir en bosques húmedos subtropicales de la cordillera de la costa. Se alimenta especialmente de roedores, lagartos y ranas (Lancini, 1986).

Bothrops colombiensis cuyos nombres más frecuentes son guayacan, macagua, mapanare y terciopelo, se caracteriza por presentar cabeza triangular y alargada, ojos grises o amarillentos, pupilas verticales, color pardo negruzco o gris claro en la parte superior de la cabeza, cuerpo y cola grisáceos. Su vientre es de color marfil, poco o muy manchado de gris o negruzco (Lancini, 1986). Presenta 17 a 23 triángulos dorsolaterales en forma de sierra o trapezoidales a lo largo del cuerpo, que si son vistas desde la parte superior simulan múltiples “X”

yuxtapuestas y desde una vista lateral múltiples “A” yuxtapuestas, los adultos tienen una longitud promedio de 1,5 m pero algunos ejemplares como las grandes hembras pueden tener una longitud que sobrepase los 2 m. Tiene hábitos nocturnos, se alimenta de roedores y se camuflajea fácilmente entre las hojas secas (Sandner – Montilla, 1994).

En otro orden de ideas, refiriéndonos al mecanismo de acción del veneno podemos decir que sus efectos principales van a variar según la especie, edad, volumen del veneno inyectado y ubicación geográfica de la serpiente (Rodríguez-Acosta y col., 1998).

La potencia de un veneno se expresa como la Dosis Letal Mínima (DLM) que representa la menor cantidad que debe ser administrada a un organismo para matarlo, pero en toxicología, generalmente se usa la Dosis Letal Cincuenta (DL₅₀), que representa la dosis capaz de matar al 50% de los animales de experimentación en un período de tiempo determinado (Lancini, 1986).

El veneno del género *Bothrops* es vasculotóxico, hemotóxico y mionecrogénico, tiene acción proteolítica y coagulante, debido a la presencia de abundantes metaloproteasas, fosfolipasa A₂, miotoxinas, batroxobina, hemorraginas y aspercetina, ésta última, específica para *Bothrops colombiensis* (Araujo y Ribas, 1999).

En lo que respecta a las manifestaciones clínicas locales, se evidencia en el sitio de inoculación los orificios dejados por el accidente ofídico, con aspecto de dos micropunturas, con separación variable y sangrado continuo (la sangre que sale por estos orificios es incoagulable), proporcional al tamaño y especie de la serpiente. La característica principal del dolor es su intensidad y su aparición inmediata, debido a la liberación de sustancias eicosanoides como la bradisinina e interleukinas. Se evidencia la formación del edema por la actividad lítica de proteinasas y fosfolipasas, lo que a su vez ocasiona la liberación de sustancias

vasoactivas tipo prostaglandinas que inducen dilatación vénulo-capilar. El edema resultante tiene características sintomáticas que se evidencian a los 30 minutos aproximadamente, tales como, consistencia dura, doloroso, eritematoso y luego equimótico. Así mismo, hay formación de vesículas, ampollas y flictenas, las cuales, al romperse drenan un líquido serohemático rico en veneno. La necrosis se observa principalmente en el sitio de inoculación y áreas adyacentes y se explica por la acción proteolítica de enzimas proteásicas que lesionan los tejidos y los endotelios vasculares (Watanabe y col, 2003; Mota, 2008).

A nivel sistémico el envenenamiento bothrópico se caracteriza principalmente por producir trastornos de la coagulación sanguínea, debido a que posee una alta concentración de enzima tipo trombina, por lo cual, ocurre una hipofrinogenemia importante que termina haciendo la sangre incoagulable, dando manifestaciones clínicas de sangramiento como hematuria, gingivorragia, epistaxis, rectorragia y melena, que incluso puede llegar a ocasionar shock hipovolémico. A este cuadro se suman otros efectos coagulopáticos secundarios del veneno; por ejemplo, se sabe que también puede ocurrir activación de la trombina (factor II) endógena y del factor X, empeorando el trastorno de coagulación (Nahas, 1964; Kiriakos, 2001).

Y por último, se puede presentar insuficiencia renal, como consecuencia de la insuficiente perfusión renal o debido a la acción directa de los componentes tóxicos del veneno sobre los túbulos renales, donde se inicia la formación de microtrombos por la acción procoagulante, con obstrucción de la microcirculación renal, que desencadena una insuficiencia renal aguda por necrosis tubular aguda, con la presencia de mioglobinuria, hemoglobinuria para producir un fallo renal agudo (Mota, 2008).

Investigaciones anteriores han demostrado que la cepa de ratones C57bl/6 son los más indicados para determinar la susceptibilidad a los venenos de las distintas especies de crotálidos venezolanos (Méndez y Moreno, 2009; Fuenmayor y

Salazar, 2009), por garantizar una menor utilización de material biológico principalmente, del veneno, por su alto costo y el riesgo que implica su obtención. Así mismo, mediante un estudio realizado previamente se comprobó que las hembras de ésta cepa de roedores resultan más apropiadas para los estudios de DL50 cuando se trabaja con veneno de las distintas subespecies del género *Crotalus* (Arriola y Maneiro, 2009), pero se desconoce si se obtendrán los mismos resultados con el veneno del género *Bothrops*. Por lo tanto, es importante plantear ¿Habrá variabilidad genérica en la susceptibilidad al veneno de *Bothrops* en los roedores de la cepa C57bl/6? ¿Cómo cambiarán las variables experimentales cuando se comparan en ambos géneros de estos roedores?

OBJETIVOS

1.2 General

- Determinar la variabilidad genérica de la susceptibilidad al veneno del *B. venezuelensis* y *B. colombiensis* en ratones C57bl/6.

1.3 Específicos

- Calcular la dosis letal 50 (DL-50) del veneno de *B. venezuelensis* y *B. colombiensis* en ratones C57bl/6 macho, inyectado por vía intraperitoneal y para una hora de observación.
- Comparar las DL-50 del veneno de *Bothrops venezuelensis* y *Bothrops colombiensis* en ratones C57bl/6 machos con las previamente establecidas en ratones C57bl/6 hembra.
- Comparar las manifestaciones clínicas de ambos géneros de ratones al ser inyectados con los venenos.
- Contraponer la variabilidad de los experimentos y gasto biológico en ratones hembra y macho de esta cepa.

JUSTIFICACIÓN

La presente investigación tiene como finalidad comparar la DL-50 del veneno de *Bothrops venezuelensis* y *Bothrops colombiensis* de los modelos múridos C57bl/6 macho, con las previamente establecidas en los ratones C57bl/6 hembra, ya que se ha demostrado diferencias genéricas en cuanto a la susceptibilidad al veneno del género *Crotalus*, pero se desconoce si esta misma respuesta se obtendría al utilizar veneno de *Bothrops* y así, poder determinar cuál de los dos géneros del modelo múrido C57bl/6 es el más apropiado para seguir realizando este tipo de investigaciones que son de mucha importancia tomando en cuenta que el envenenamiento ofídico es un problema de salud pública en la mayoría de los países tropicales, entre ellos Venezuela.

Por otro lado, la selección del ratón más idóneo, garantiza el uso de menor cantidad de material biológico, especialmente de veneno, el cual, es altamente costoso y peligroso de obtener.

MATERIALES Y MÉTODOS

1.4 Tipo de Investigación

La presente investigación fue de tipo experimental y comparativa, ya que se estudiaron y compararon las DL-50 del veneno *Bothrops venezuelensis* y *Bothrops colombiensis* en el modelo múrido C57bl/6 macho inyectado por vía intraperitoneal para una hora de observación, con las previamente hechas en el modelo múrido C57bl/6 hembra.

1.5 Variables

Independientes: Veneno de *B. venezuelensis*.
Veneno de *B. colombiensis*.

Dependientes: Susceptibilidad del género masculino de múridos C57bl/6 al veneno de *Bothrops venezuelensis* y *Bothrops colombiensis*.

1.6 Materiales

- Veneno de *Bothrops venezuelensis* y *Bothrops colombiensis*
- Ratones cepa C57bl/6 macho.
- Cristalería de laboratorio (Microjeringas de 50 microlitros de capacidad, vasos de precipitado, tubos de ensayo, micropipetas graduadas de volumen variado, jeringas de 10 y 20 cc, piceta plástica, microgoteros, tubos Eppendorf ®)
- Liofilizador Labconco ®
- Balanza analítica Sartorius ®, modelo Handy
- Balanza digital Denver Instrument ®, modelo XS-310.D

- Cloroformo
- Solución fisiológica
- Papel Parafilm ®
- Refrigerador marca Whirpool de -20 °C
- Gancho para serpiente

1.7 Procedimiento:

1.7.1 Extracción del veneno:

El ordeño de cada uno de los ejemplares de mapanare, se realizó en el serpentario de la Universidad de Oriente, Núcleo de Anzoátegui. *Los Bothrops* 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 imposibilitó que la culebra girara y mordiera. Se tomó un vaso de precipitado de 50 ml de capacidad, previamente cubierto con un plástico (Parafilm®) adherido al vaso. Se acercó la cabeza de la serpiente para que mordiera al plástico naturalmente mientras que se realizaba suaves masajes sobre las glándulas productoras de veneno, las cuales se encuentran en la parte postero-lateral de la cabeza, para así dejar en el recipiente una pequeña cantidad de veneno. Posteriormente el tratamiento inicial consistió en desecarlo al frío (Liofilizador Labconco ®) y antes de su utilización fue pesado en una balanza analítica (Sartorius ®), reconstituido en solución salina (0,9%) y almacenado en tubos Eppendorf ® de 1,5 ml de capacidad.

1.7.2 Determinación de la dosis letal:

La dosis letal 50 del veneno de las mapanares se determinó por el método secuencial de aumentar y disminuir la dosis de Dixon y Mood (1984) modificado por Sevcik (1987). El

veneno se inyectó con microjeringa de 50 microlitros (Hamilton®) utilizando la vía intraperitoneal (VIP) en ratones C57bl/6 macho previamente pesados en una balanza digital (Denver Instrument®, modelo XS-310.D). Una vez iniciado el experimento, al primer ratón se le administró el anti-*log* de una dosis inicial X_1 , 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 respondió con la muerte, el segundo recibió un anti-*log* de la dosis $X_2 = \text{anti-}log(X_1 - d)$. Si por el contrario el ratón sobrevivió, al segundo múmero se le administró 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 sería el punto de inflexión a partir del cual comenzó la corrida válida para el experimento. La dosis de cada siguiente animal fue el 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” sobrevivió 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 (+) indicó muerte, cero (0) indicó 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.

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

Los signos clínicos, consecuencia del efecto de la toxicidad aguda experimental inducida por la inyección intraperitoneal de veneno de ejemplares *Bothrops venezuelensis* y *Bothrops colombiensis* en los modelos múmeros C57bl/6 macho, se observaron durante una hora de experimentación y se registraron cronológicamente en un formato preexistente (anexo). También se usó un ratón control al cual se le administró 50 microlitros de solución fisiológica.

1.7.3 Procesamiento de los Datos:

1. Se utilizó el programa Excel 11.8146.81.36 (Microsoft Corporation, 2003) para automatizar los cálculos y elaborar la gráfica de la DL 50.
2. 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 *Bothrops venezuelensis* y *Bothrops colombiensis* en los modelos múridos C57bl/6 macho 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.

RESULTADOS

Tabla 1: Datos para el cálculo de la Dosis Letal (DL₅₀) del veneno de *Bothrops colombiensis* en ratones macho C57bl/6, administrado por VIP para 60 min de observación.

Ratón (n)	Peso (g)	Dosis (anti-log)	Dosis (μg·g ⁻¹)	Dosis total (μg)	Volumen (μl)	Muerte (minutos)
Corrida no válida						
1	31,51	1,15	14,13	445,23	25,58	-
Corrida válida						
2	24,96	1,20	15,85	395,61	22,73	†: 52
3	26,87	1,15	14,13	379,67	21,82	-
4	27,35	1,20	15,85	433,49	24,91	†: 53
5	26,45	1,15	14,13	373,73	21,47	-
6	24,92	1,20	15,85	394,98	22,7	†: 45
7	26,5	1,15	14,13	374,44	21,51	-
8	28,58	1,20	15,85	452,99	26,03	†: 48
9	27,97	1,15	14,13	395,21	22,71	-
Sub-total				3200,12	183,88	
Total				3645,35	209,46	
Siguiente Animal						
10		1,20	15,85			⊗
$\bar{X}= 26,7$		$\bar{X}= 14,99$		$\bar{X}=24,75$		

†: Muerte; ⊗ Punto final; \bar{X} : Promedio.

En la tabla 1 se muestra los datos para el cálculo de la Dosis Letal cincuenta (DL₅₀) del veneno de *B. colombiensis*, en el modelo múrido C57bl/6 macho para 60 minutos de observación. El ratón 1 representa la corrida no válida. En R2 ocurre el primer punto de inflexión con una dosis de veneno de 15,85 μg/g⁻¹, iniciando la corrida válida que incluye el punto final (ratón 10), dando 4 ciclos como referencia para el cálculo de los resultados, a expresarse como la mediana y sus límites de confianza al 95%. Para realizar el ensayo fueron necesarios 8 ratones (corrida válida) con un peso comprendido entre 24,92 y 28,58 g por unidad de ratón. Se utilizó una cantidad total de veneno de 3645,35 μg, correspondiendo 3200,12 μg a la corrida válida.

Tabla 2: Datos para el cálculo de la Dosis Letal (DL50) del veneno de *B. venezuelensis* en ratones macho C57bl/6, administrado por VIP para 60 min de observación.

Ratón (n)	Peso (g)	Dosis (anti-log)	Dosis ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)	Dosis (μg)	Volumen (μl)	Muerte (minutos)
Corrida no válida						
1	26,38	1,15	14,13	372,74	21,42	-
2	28,21	1,20	15,85	447,12	25,69	-
3	28,44	1,25	17,78	505,66	29,06	-
Sub-total					1325,52	76,17
Corrida válida						
4	25,09	1,30	19,95	500,54	28,76	†: 41
5	25,59	1,25	17,78	454,99	26,14	†: 26
6	17,6	1,20	15,85	278,96	16,03	†: 29
7	23,35	1,15	14,13	329,93	18,96	-
8	25,24	1,20	15,85	400,05	22,99	-
9	25,48	1,25	17,78	453,03	26,03	-
10	31,05	1,30	19,95	619,44	35,6	†: 54
11	23,09	1,25	17,78	424,94	24,42	†: 29
12	22,6	1,20	15,85	358,21	20,58	†: 24
13	25,48	1,15	14,13	360,03	20,69	-
14	29,89	1,20	15,85	473,75	27,22	†: 15
15	27,30	1,15	14,13	385,74	22,16	-
16	25,16	1,20	15,85	398,78	22,91	-
17	17,30	1,25	17,78	307,59	17,67	†: 30
18	27,9	1,20	15,85	442,21	25,41	†: 22
19	20,5	1,15	14,13	289,66	16,64	-
20	16,1	1,20	15,85	255,18	14,67	†: 35
Sub-total					6733,03	386,88
Total					8058,55	463,05
Siguiete Animal						
21		1,15	14,13			⊗
	$\bar{X}=24,04$		$\bar{X}=16,38$			$\bar{X}=30,5$

†: Muerte; ⊗ : Punto final; \bar{X} : Promedio.

En la tabla 2 se muestra los datos para el cálculo de la Dosis Letal cincuenta (DL₅₀) del veneno de *B. venezuelensis*, en el modelo murino C57bl/6 macho para 60 minutos de observación. Los ratones 1-3 representan la corrida no válida. En R4 ocurre el primer punto de inflexión con una dosis de veneno de 19,95 $\mu\text{g}/\text{g}^{-1}$, iniciando la corrida válida que incluye el punto final (ratón 21), dando 4 ciclos

como referencia para el cálculo de los resultados, a expresarse como la mediana y sus límites de confianza al 95%. Para realizar el ensayo fueron necesarios 17 ratones (corrida válida) con un peso comprendido entre 16,1 y 31,05 g por unidad de ratón. Se utilizó una cantidad total de veneno de 8058,55 µg, correspondiendo 6733,03 µg a la corrida válida.

**Tabla 3: Frecuencia de muerte inducida por el veneno de *B. colombiensis*.
C57bl/6 macho. VIP. 60 min.**

Anti – Log Dosis (mg.kg-1 de ratón)		
Nº ratón	15,85	14,13
Corrida no válida		
1	-	0
Corrida válida		
2	†: 52	-
3	-	0
4	†: 53	-
5	-	0
6	†: 45	-
7	-	0
8	†: 48	-
9	-	0
10	X	
DV: n = 4	4	0,0
FM (%)	100	0

†: Tiempo de muerte en minutos.

0: Supervivencia.

DV: datos válidos.

n: número de ratones de la corrida válida que murieron.

FM: frecuencia de muerte.

Tabla 3 muestra la frecuencia de muerte inducida por la administración del veneno de *B. colombiensis*, en ratones C57bl/6 según la dosis en la corrida válida.

Con la dosis de 15,85 mg.kg⁻¹ se inyectaron 4 ratones los cuales fallecieron, representando el 100% y con 14,13 mg.kg⁻¹ se inyectaron 5 ratones y todos sobrevivieron.

Tabla 4: Frecuencia de muerte inducida por el veneno de *B. venezuelensis*. C57bl/6 macho. VIP. 60 min.

Anti – Log Dosis (mg.kg ⁻¹ de ratón)				
Nº ratón	19,95	17,78	15,85	14,13
Corrida no válida				
1	-	-	-	0
2	-	-	0	-
3	-	0	-	-
Corrida válida				
4	†: 41	-	-	-
5	-	†: 26	-	-
6	-	-	†: 29	-
7	-	-	-	0
8	-	-	0	-
9	-	0	-	-
10	†: 54	-	-	-
11	-	†: 29	-	-
12	-	-	†: 24	-
13	-	-	-	0
14	-	-	†: 15	-
15	-	-	-	0
16	-	-	0	-
17	-	†: 30	-	-
18	-	-	†: 22	-
19	-	-	-	0
20	-	-	†: 35	-
21				X
DV: n=10	2	3	5	0,0
FM (%)	20	30	50	0

†: Tiempo de muerte en minutos.

0: Supervivencia.

DV: datos válidos.

n: número de ratones de la corrida válida que murieron.

FM: frecuencia de muerte.

La tabla 4 muestra la frecuencia de muerte inducida por la administración del veneno de *B. venezuelensis*, en ratones C57bl/6 según la dosis en la corrida válida. Con la dosis de 19,95 mg.kg⁻¹ se inyectaron 2 ratones los cuales fallecieron (20%), con 17,78 mg.kg⁻¹ se inyectaron 4 ratones de los cuales 3 fallecieron (30%), con 15,85 mg.kg⁻¹ se inyectaron 7 ratones de los cuales 5 fallecieron (50%) y finalmente con la de 14,13 mg.kg⁻¹ se inyectaron 4 ratones y todos sobrevivieron. Los ratones murieron con un tiempo promedio de 48, 28 y 25 minutos para las dosis de 19,95; 17,78; 15,85 mg.kg⁻¹ respectivamente.

Tabla 5: Signos clínicos de toxicidad observados en ratones C57bl/6 macho, durante 60 min, posterior a la administración intraperitoneal del veneno de *B. colombiensis* y *B. venezuelensis*.

Signos clínicos	<i>Bothrops colombiensis</i>		<i>Bothrops venezuelensis</i>	
	Tiempo (min)	Frecuencia (%)	Tiempo (min)	Frecuencia (%)
Taquipnea	4	100	2	100
Hipoactividad	6	100	7	100
Postración	13	100	12	100
Exoftalmos	21	22,2	20	20
Periodos de Apnea	36	55,5	16	90
Quejido respiratorio	34	44,4	29	35
Respiración oral	40	44,4	26	25
Movimientos tónico-clónico	49	11,1	25	15
Marcha atáxica	47	11,1	12	40
Movimientos extensores de patas posteriores	38	11,1	34	10

Muerte	50	44,4	31	50
--------	----	------	----	----

En la tabla 5 se presentan los efectos tóxicos provocados por la administración intraperitoneal del veneno de *B. colombiensis* y *B. venezuelensis*, en el modelo múrido C57bl/6 (macho) para una hora de experimentación. Posterior a la inyección del veneno de *B. colombiensis* y *B. venezuelensis* todos los ratones presentaban taquipnea, hipoactividad y postración como primeras manifestaciones clínicas. Siguiendo el orden de frecuencia se presenta periodos de apnea en un 55,5 % a los 36 min para *B. colombiensis* y un 90% a los 16 min para *B. venezuelensis*.

Tabla 6: Gasto biológico y variabilidad de los experimentos en el cálculo de la

	Ratones macho			Ratones hembra			
	N	GV (µg)	IV (%)	N	GV (µg)	IV (%)	
Serpiente							
<i>B. colombiensis</i>	8	3200,12	11,47	15	5271,60	6,06	£
<i>B. venezuelensis</i>	17	6733,03	6,08	12	4039,69	11,60	Ж

DL₅₀ C57bl/6 (macho y hembra).

N: número total de ratones de la corrida valida.

GV: gasto de veneno.

IV: índice de variabilidad.

£: Astudillo y Osuna (2009).

Ж: Blanco y Rojas (2005).

En la tabla 6 se observa la comparación del gasto de veneno y ratones y el índice de variabilidad de los experimentos con las dos especies de *Bothrops* estudiadas en ratones macho y hembra C57bl/6 para determinar la DL₅₀ de las especies *B. colombiensis* y *B. venezuelensis*, en la misma, se evidencia que el gasto de veneno, ratones e índice de variabilidad es similar al usar ratones macho o hembra de la cepa C57bl/6, ya que no hay una variabilidad significativa en los resultados obtenidos.

DISCUSIÓN

El accidente ofídico representa un importante problema de salud pública en las zonas tropicales y subtropicales del mundo. Según el MPPS para el año 2004 se registró un total de 7186 casos en todo el país; aunque el estado Anzoátegui no figure dentro de las entidades más endémicas del país, tiene una producción de casos de envenenamiento ofídico nada despreciable con un total de 205 casos para el año en cuestión (MPPS, 2004; Lancini, 1986).

Se considera que en el continente americano las serpientes del género *Bothrops*, son la de mayor importancia médica por el número y la gravedad de los accidentes que provoca. En Venezuela, el 75% de los envenenamientos y reacciones causadas por animales venenosos son producidos por serpientes, siendo el género *Bothrops* el productor del mayor número de accidentes ofídicos, seguido por el género *Crotalus* (Montilla, J. 1998; Rodríguez- Acosta, 1995).

La caracterización de la actividad tóxica del veneno de los ofidios es necesaria para el cabal entendimiento de los procesos fisiopatológicos que se producen ante su mordedura, como también para evaluar la potencia neutralizante de los antivenenos utilizados para tratar estos envenenamientos (Roodt y col, 2005). La toxicidad de tales venenos se determina mediante el cálculo de la Dosis Letal Cincuenta (DL₅₀) (Montilla, 1999), la cual, permite estandarizar los venenos y antivenenos de origen animal y aporta conocimientos sobre la potencia y letalidad de los mismos (Sevcik,1987), ya que es un índice que hace referencia a la cantidad de droga o toxina que se requiere para producir la muerte del 50 % de una población de animales experimentales, expresándose generalmente como miligramos de material por kilogramo de peso del animal (Ross,1996). La DL₅₀ varía según la vía de administración, animal experimental utilizado, tiempo de observación, género, especie, edad y zona geográfica donde habita la serpiente de la que se extrae el veneno (Furnaletto y col, 1973).

En el Centro de Investigaciones en Ciencias de la Salud (CICS), de la Universidad de Oriente, Núcleo Anzoátegui se han realizado investigaciones previas que nos sirven de modelo de comparación en las cuales se han calculado Dosis Letal Cincuenta (DL_{50}) de *B. colombiensis* y *B. venezuelensis* en cepa de ratones C57bl/6 hembra. Astudillo y Osuna (2008), estudiaron el veneno de *B. colombiensis* en la cepa de ratones C57bl/6 hembra demostrando que la DL_{50} fue de $15,85 \text{ mg/kg}^{-1}$ de ratón con límites de confianza entre $14,99 - 15,95 \text{ mg/kg}^{-1}$ de ratón. En nuestro estudio al calcular la DL_{50} del veneno de *B. colombiensis* en ratones C57bl/6 macho fue de $14,99 \text{ mg/kg}^{-1}$ de ratón con límites de confianza entre $14,13 - 15,85 \text{ mg/kg}^{-1}$ de ratón. Por lo tanto se puede establecer que existe una mayor susceptibilidad al veneno de *B. colombiensis* por parte del género masculino de la cepa de ratones C57bl/6.

Por otra parte, la DL_{50} del veneno de *B. venezuelensis* en la cepa de ratones C57bl/6 macho fue $15,96 \text{ mg/kg}^{-1}$ de ratón, con límites de confianza entre $15,85 - 16,82 \text{ mg/kg}^{-1}$ de ratón mientras que la determinación de la DL_{50} del veneno de *B. venezuelensis* en la cepa de ratones C57bl/6 hembra establecida previamente por Blanco y Rojas (2005) fue de $15,84 \text{ mg/kg}^{-1}$ de ratón, con límites de confianza entre $14,98 - 16,81 \text{ mg/kg}^{-1}$ de ratón, en atención a lo expuesto se evidencia mayor susceptibilidad al veneno de *B. venezuelensis* en ratones C57bl/6 hembra en comparación con los macho.

Las principales manifestaciones clínicas causadas por el veneno bothrópico se deben al componente proteolítico, coagulante y vasculotóxico (Watanabe y col, 2003; Mota, 2008).

En el presente trabajo la inyección intraperitoneal del veneno de *B. colombiensis* en ratones C57bl/6 macho causó principalmente taquipnea, hipoactividad y postración en el 100% con un tiempo promedio de aparición de 4, 6, y 13 minutos respectivamente. Esto se corresponde con los hallazgos de Astudillo y Osuna (2009) en ratones hembra de la misma cepa, quienes

observaron taquipnea, hipoactividad y postración en 100% de los casos, el tiempo de aparición de las manifestaciones clínicas fue paulatino y variable pero en general no hubo mayores diferencias.

En lo concerniente a *B. venezuelensis* se obtuvo que los signos de toxicidad aguda, más frecuentes causados por el veneno en la cepa de ratones C57bl/6 macho fueron taquipnea, hipoactividad y postración en un 100% con un tiempo de aparición 2, 7 y 12 minutos respectivamente. Lo cual difiere de las principales manifestaciones clínicas que se observaron con el veneno de *B. venezuelensis* en la cepa de ratones C57bl/6 hembra, las cuales fueron hiperactividad inicial seguida de hipoactividad, debilidad muscular, hiperextensión de la cola, temblores, entre otros (Blanco y Rojas ,2005).

De manera general, los venenos de las dos especies de *Bothrops* que se utilizaron en esta investigación inducen la aparición de taquipnea, hipoactividad y postración con frecuencias similares. Otros signos frecuentes fueron quejido respiratorio, periodos de apnea y exoftalmo.

En otro orden de ideas, en lo que respecta a frecuencia de muerte, se obtuvo que esta fue variable. Con la inyección del veneno de *B. colombiensis* la muerte se presento en el 100% de los casos con la administración de 15,85 μg en un tiempo promedio de 50 minutos. Con el veneno de *B. venezuelensis* la frecuencia de muerte fue entre el 20, 30 y 50% de los casos con la administración de la dosis de 19,95; 17,78 y 15,85 μg respectivamente en un tiempo promedio de 31 minutos.

Con relación al gasto de material biológico, este trabajo indicó que cuando se utilizó veneno de *B. colombiensis* fue menor el número de ratones, el gasto de veneno y el índice de variabilidad utilizando macho de la cepa C57bl/6 al ser comparados con los anteriormente establecidos en ratones hembra de la misma cepa de Astudillo y Osuna (2009). Sin embargo, con el veneno de *B. venezuelensis* se evidenció, que fue mayor el número de ratones, el gasto de

veneno y el índice de variabilidad usando ratones C57bl/6 macho en comparación con las hembras de la misma cepa de ratones, las cuales fueron estudiadas por Blanco y Rojas (2005).

De manera general, el gasto de veneno, ratones e índice de variabilidad es similar al usar ratones macho o hembra en la cepa C57bl/6, ya que no hay una variabilidad significativa en los resultados obtenidos. Lo que difiere del estudio realizado por Arrijoja y Maneiro (2009) en el que se demostró que los ratones C57bl/6 machos presentaban una mayor susceptibilidad sobre las hembras.

Al comparar el gasto biológico utilizando ratones macho o hembra, de la cepa C57bl/6, este resulta significativamente menor que con el uso de ratones de las cepas NMRI o BALB^c, tal como fue determinado por Hurtado, Montaña y Rodríguez (2008) utilizando el veneno de escorpión *Tytius nororientalis*, Salazar y Fuenmayor (2009) con el veneno de *C.d cumanensis* y *C.d vegrandis* y Moreno y Méndez (2009) con el veneno de *B. venezuelensis* y *B.colombiensis*.

CONCLUSIONES

- La DL_{50} utilizando el modelo múrido C57bl/6 macho es mayor en *B.venezuelensis* que en *B.colombiensis*, mientras que empleando ratones C57bl/6 hembra la DL_{50} más elevada se observa en *B.colombiensis*.
- La DL_{50} de *B. colombiensis* indica que los machos son más sensible, mientras que la DL_{50} de *B. venezuelensis* demuestra que son las hembras las que presentan mayor susceptibilidad.
- Los signos clínicos de toxicidad que aparecen posterior a la inyección del veneno de *B. colombiensis*, son similares usando tanto ratones machos como hembras de la cepa C57bl/6. Sin embargo, al usar veneno de *B. venezuelensis* se aprecian diferencias de las manifestaciones clínicas en cuanto al empleo de múridos C57bl/6 macho y hembra.
- El gasto biológico de ratones y veneno así como el índice de variabilidad es similar al usar ratones macho o hembra de la cepa C57bl/6, ya que no hay una variabilidad significativa en los resultados obtenidos.

RECOMENDACIÓN

- Promover la realización de nuevas investigaciones que permitan completar este estudio con otras especies de *Bothrops* y otros géneros como por ejemplo (*Bothriechis*, *Bothriopsis*, *Porthidium*, y *Lachesis*).

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Araujo S. y F. Rivas. **Emponzoñamiento Ofídico en el Instituto Autónomo Hospital Universitario Los Andes**, Mérida, Venezuela; 1999.
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. Universidad de Oriente, 2009.
3. Astudillo, H. y Osuna, J. **Variación Ontogénica del veneno de *Bothrops colombiensis* (Serpentes, Viperidae); Estudio comparativo entre una madre y sus crías**. Trabajo de Grado. Universidad de Oriente, 2009.
4. Astudillo, Y. y Bejanaro, M. **Efectos biológicos y DL50 del veneno *Bothrops colombiensis*; estudio comparativo entre ejemplares y adultos**. Trabajo de Grado. Universidad de Oriente, 2008.
5. Blanco, M y Rojas, A. **Efectos biológicos del veneno de *Bothrops venezuelensis* (serpiente tigre mariposa) juveniles y adultos**. Trabajo de Investigación. Barcelona, 2005.
6. Campbell, J. y Lamar, W. **The venomous reptiles of the western hemisphere (2 tomos) cornell university press**. Ithaca and London, 2004: volume II: 334-336.
7. Fuemayor, Y. y Salazar, M. **Dosis letal50 del veneno de *Crotalus durissus cumanensis* y *Crotalus durissus vegrandis* (serpentes, viperidae) en los modelos múridos NMRI y BalB'C**. Trabajo de Grado (no publicado). Anzoátegui: Dpto de MI, Universidad de Oriente, 2009.

8. González, A. y col. **Emponzoñamiento ofídico, características clínicas y Epidemiológicas, Ciudad Hospitalaria Dr. Enrique Tejera**, Valencia, Venezuela; 2008.
9. Kiriakos, D. **Envenenamiento Ofídico en el Hospital Universitario Luís Razetti en el periodo 1989-1992**. Tesis de Postgrado (no publicado) Anzoátegui: Universidad de Oriente, 1993.
10. Kiriakos, D. **Serpientes venenosas de Venezuela y el accidente Ofídico**. Tesis de Ascenso (no publicado) Anzoátegui: Universidad de Oriente. Departamento de Medicina Interna, 2001.
11. Lancini, A.R. **Serpientes de Venezuela** (2 Ed). Caracas: Ernesto Armitano Editor, 1986.
12. Ministerio del Poder Popular Para la Salud. **Anuario de epidemiología y estadística vital periodo 2000-2004**.
13. Moreno, M. y Méndez, R. **Dosis letal⁵⁰ del veneno de *B. venezuelensis* y *B. colombiensis* (serpentes, viperidae) en los modelos muridos NMRI y BalB'C**. Trabajo de Grado (no publicado). Anzoátegui: departamento de MI, Universidad de Oriente, 2009.
14. Mota, J. **Accidente ofídico en Venezuela**. Edo Miranda: Universidad Rómulo Gallegos, 2008.
15. Pérez, E. y Carvajal, S. **Serpientes Venenosas, reconocimiento y tratamiento general de sus mordeduras**. Revista digital Universitaria. ISSN, 1607/6079,2000.
16. Rodríguez, A. Orihuela, R. y Mondolfi, A. **El accidente ofídico en Venezuela**. Caracas: Venediciones, 1998: 106.

17. Sandner – Montilla, F. **Miniinformación sobre Serpientes Venezolanas.**
Caracas, 1994: 15-22 pp.

18. Watanabe, L., J. Shannon, y col. **Amino Acid sequence and crystal structure of BaP₁, a metalloproteinase from *Bothrops asper* snake venom that exerts multiple tissue-damaging. Activities. *Protein. Sci*; 2003:12:2273-2281.**

ANEXOS



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

LABORATORIO DE TOXINOLOGÍA

FICHA DE RESULTADOS

DL₅₀ MÉTODO:	<input type="text"/>	EXPERIMENTO:	<input type="text"/>
VENENO (ESPECIE, SEXO):	<input type="text"/>		
ANIMAL EXPERIMENTAL:	<input type="text"/> (Número del animal, peso, vía de inyección)		
CÁLCULO DE DOSIS:	Factor	<input type="text"/>	Dosis (volumen)

Tabla de Resultados:

<i>Tiempo</i>	<i>Manifestaciones clínicas</i>
01.	
02.	
03.	
04.	
05.	
06.	
07.	
08.	
09.	
10.	
11.	
12.	
13.	
14.	
15.	
16.	
17.	
18.	
19.	

N° de casos de E.O en Anzoátegui por meses, año 1995-1999.

MESES	1995	1996	1997	1998	1999	PROMEDIO MENSUAL
ENERO	21	13	9	9	16	13,6
FEBRERO	8	13	11	27	37	19,2
MARZO	7	15	13	21	16	14,4
ABRIL	13	14	40	4	7	15,6
MAYO	5	20	17	22	20	16,8
JUNIO	13	37	26	49	15	28
JULIO	21	29	25	21	16	22,4
AGOSTO	18	21	40	46	14	29,8
SEPTIEMBRE	20	29	35	26	28	27,6
OCTUBRE	14	28	43	25	25	27
NOVIEMBRE	15	27	36	36	18	24
DICIEMBRE	19	21	10	10	25	18,8
TOTAL	174	277	305	296	237	258

Fuente: Dirección y Epidemiología SALUDANZ. Registro EPI-15 año 1995-1999.



MORDEDURAS DE SERPIENTES POR ENTIDAD FEDERAL VENEZUELA 2004

IDENTIDAD FEDERAL	CASOS	TASA
DTTO CAPITAL	37	1,8
AMAZONAS	25	19,1
ANZOATEGUI	205	14,6
APURE	345	78
ARAGUA	103	6,5
BARINAS	404	57,1
BOLIVAR	426	29,5
CARABOBO	426	20,1
COJEDES	189	67
DELTA AMACURO	96	66,9
FALCON	341	40
GUARICO	236	33,6
LARA	517	30,3
MERIDA	311	39,1
MIRANDA	367	13,5
MONAGAS	239	29,8
NUEVA ESPARTA	19	4,6
PORTUGUESA	483	58,6
SUCRE	110	12,6
TACHIRA	674	208,5
TRUJILLO	325	48,3
VARGAS	58	17,8
YARACUY	213	32,7
ZULIA	1037	30,3
VENEZUELA	7186	27,5



Ratón en hipoactividad



Ratón muerto a las 30 min posterior a la inyección del veneno de *B. venezuelensis*.

**HOJA DE METADATOS PARA TESIS Y TRABAJOS DE
ASCENSO – 1/5**

Título	Variabilidad genérica de la susceptibilidad al veneno de <i>B. venezuelensis</i> y <i>B. colombiensis</i> (SERPENTES; VIPERIDAE) en ratones C57bl/6.
Subtítulo	

Autor(es)

Apellidos y Nombres	Código CVLAC / e-mail	
Clavell Rojas, Diana Carolina	CVLAC	17.360.362
	e-mail	Dianaclavell_01@hotmail.com
	e-mail	
Díaz Zapata, Jennifer María	CVLAC	16.480.582
	e-mail	Jenxiher03@hotmail.com
	e-mail	
Domínguez López, Damelys Carolina	CVLAC	17.537.244
	e-mail	Tota1311@hotmail.com
	e-mail	

Palabras o frases claves:

Serpientes, *B. colombiensis*, *B. venezuelensis*, veneno, dosis letal₅₀, susceptibilidad, ratón C57BL/6

Líneas y sublíneas de investigación:

Área	Subárea
Escuela de Ciencias de la Salud	Medicina Interna
	Medicina Tropical

Resumen (abstract):

Variabilidad genérica de la susceptibilidad al veneno de *B. venezuelensis* y *B. colombiensis* (SERPENTES; VIPERIDAE) en ratones C57bl/6. Clavell R. Diana; Díaz Z. Jennifer; Domínguez L. Damelys y Kiriakos, Demetrio. Universidad de Oriente, Núcleo Anzoátegui, 2010.

Se determinó la DL₅₀ del veneno de *B. venezuelensis* y *B. colombiensis* en el modelo murino C57bl/6, macho, inyectados por vía intraperitoneal y para una hora de observación, por el método de Dixon y Mood (1948) modificado por Sevcik (1987). Los resultados obtenidos para la DL₅₀ de *B. venezuelensis* fue de 15,96 mg/kg⁻¹ de ratón y la de *B. colombiensis* de 14,99mg/kg⁻¹ de ratón. Al compararlas con la DL₅₀ previamente establecidas en ratones hembra de la misma cepa, podemos concluir que al utilizar veneno de *B. venezuelensis* los roedores hembras son más susceptibles que los machos, mientras que al usar el veneno de *B. colombiensis* los roedores machos presentan mayor susceptibilidad que las hembras. Los signos de toxicidad más frecuentemente observados luego de la inyección del veneno de *B. venezuelensis* y *B. colombiensis* fueron similares y entre éstos destacan: taquipnea, hipoactividad y postración en un 100% con un tiempo de aparición promedio de 3, 7 y 12 minutos respectivamente. El gasto de veneno e índice de variabilidad al usar *B. venezuelensis* fue de 6.733,03 µg y 6.08% respectivamente, mientras que, al usar veneno de *B. colombiensis* el consumo de veneno fue de 3200,12 µg y el índice de variabilidad de 11,47%. En conclusión, el gasto biológico, la variabilidad de los experimentos y DL₅₀ son similares y sólo muestran variaciones individuales, por lo que es indiferente si se utilizan ratones hembras o machos.

Contribuidores:

Apellidos y Nombres	ROL / Código CVLAC / e-mail								
Luis González	ROL	CA	<input type="checkbox"/>	A S	<input type="checkbox"/>	T U	<input type="checkbox"/>	J U	<input checked="" type="checkbox"/>
	CVLAC	7.229.906							
	e-mail	Luis2097@cantv.net							
	e-mail	Luis2097@gmail.com							
María Ovalles	ROL	CA	<input type="checkbox"/>	A S	<input type="checkbox"/>	T U	<input type="checkbox"/>	J U	<input checked="" type="checkbox"/>
	CVLAC	4.004.630							
	e-mail	dramovalles@gmail.com							
	e-mail								
Demetrio Kiriakos	ROL	CA	<input type="checkbox"/>	A S	<input type="checkbox"/>	T U	<input checked="" type="checkbox"/>	J U	<input type="checkbox"/>
	CVLAC	5.698.723							
	e-mail	kiriakosch@cantv.net							
	e-mail								

Fecha de discusión y aprobación:

Año	Mes	Día
2010	08	13

Lenguaje: spa

Archivo(s):

Nombre de archivo	Tipo MIME
TESIS.Bothrops.colombiensis.venezuelensis.doc	Aplication/Word

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:

Sección de Medicina Tropical, Departamento de Medicina Interna

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

Universidad de Oriente, Núcleo de Anzoátegui

Derechos:

De acuerdo al Artículo 41 del Reglamento de Trabajos de Grado: “Los Trabajos de Grado son de exclusiva propiedad de la Universidad de oriente y solo podrán ser utilizados a otros fines con el consentimiento del consejo de Núcleo respectivo, el cual notificará al Consejo Universitario”

Clavell Rojas, Diana Carolina

AUTOR

Díaz Zapata, Jennifer María

AUTOR

Dominguez Lopez, Damelys
Carolina

AUTOR

Kiriakos, Demetrio

TUTOR

Luis González

JURADO

María Ovalles

JURADO

JURADO

Profa. Rosibel Villegas

Coordinadora de la Comisión de Trabajos de Grado

POR LA SUBCOMISIÓN DE TESIS