



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

**ACTIVIDAD BIOLÓGICA *IN VITRO* E *IN VIVO* DEL VENENO  
DE *Thalassophryne maculosa* (PISCES, BATRACHOIDIDAE)**

Asesores:

Aleikar Vásquez-Suárez  
Leonardo De Sousa

Trabajo de Grado presentado por:

González Romero, Carlos Andrés  
Sulbaran Castillo, Xiomara del Valle  
Surga Tovar, Félix José

Como requisito parcial para optar al título de Médico Cirujano

Barcelona, junio de 2013



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

## DECLARACIÓN JURADA

El Trabajo de Grado presentado por los Estudiantes Universitarios **González Romero, Carlos Andrés**, C. I. N.º V-19.346.722, **Sulbaran Castillo, Xiomara del Valle**, C. I. N.º V-18.786.360 y **Surga Tovar, Félix José**, C. I. N.º V- 18.905.640, titulado “**ACTIVIDAD BIOLÓGICA *IN VITRO* E *IN VIVO* DEL VENENO DE *Thalassophryne maculosa* (PISCES, BATRACHOIDIDAE)**”, ha sido aprobado por los miembros del Jurado Evaluador, quienes lo han encontrado correcto en su contenido y forma de presentación; asimismo, declaran que los datos presentados son responsabilidad exclusiva de los autores, en fe de lo cual firman:

Prof. Irene Rodríguez  
**Miembro Principal**

Prof. Mercedes Matos  
**Miembro Principal**

Prof. Aleikar Vásquez-Suárez  
**Miembro Principal Asesor**

Prof. Leonardo De Sousa  
**Miembro Principal Asesor**

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

JUNIO 2013

## RESUMEN

### ACTIVIDAD BIOLÓGICA *IN VITRO* E *IN VIVO* DEL VENENO DE *Thalassophryne maculosa* (PISCES, BATRACHOIDIDAE)

González Romero, Carlos Andrés; Sulbaran Castillo, Xiomara del Valle y Surga Tovar, Félix José. Asesores: Vásquez-Suárez, Aleikar y De Sousa, Leonardo. Laboratorio de Toxinología, Grupo de Investigación en Toxinología Aplicada y Animales Venenosos, Escuela de Ciencias de la Salud, Núcleo de Anzoátegui, Universidad de Oriente.

Ejemplares del pez sapo *Thalassophryne maculosa* fueron capturados en aguas someras del Parque Nacional La Restinga, estado Nueva Esparta, Venezuela. El veneno se obtuvo por ordeño manual de las espinas dorsales y operculares. La actividad proteolítica se determinó por digestión de gelatinasa en placa radiográfica, la hemolítica en placas de agar sangre y la antibacteriana por el método de difusión en discos, utilizando cepas Gram negativas y positivas, certificadas. La  $DL_{50}$  del veneno, para una hora de experimentación, fue determinada por el método secuencial de Dixon y Mood. Se escogió al azar, cuatro ratones hembra de la cepa C57BL/6. Se administró por vía intraperitoneal una  $DL_{50}$  de veneno de *Thalassophryne maculosa* equivalente a  $70,8 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  de ratón. Luego fueron evaluados durante sesenta minutos, obteniendo una frecuencia de sobrevivencia de 50% ( $n = 2$ ). El veneno de *Thalassophryne maculosa* no presenta actividad antimicrobiana sobre 12 cepas de bacterias tanto Gram negativas como positivas, pero si posee actividad hemolítica expresada en la placa de agar sangre y proteolítica en la placa radiográfica evidenciada hasta una dilución de 1:64. Luego de la administración de una  $DL_{50}$  del veneno, equivalente a  $70,80 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  de ratón, se observaron ocho manifestaciones clínicas inducidas por el veneno de *Thalassophryne maculosa* en ratones C57BL/6, con aparición gradual en el curso temporal de toxicidad aguda. Los signos inmediatos de toxicidad aguda fueron hiperactividad seguida de taquipnea, entre 10 y 20 minutos se evidenció hipoactividad, distensión abdominal; posteriormente signos de toxicidad grave caracterizados por bradipnea alternada con apnea hasta finalmente la muerte de los animales. En el tejido cardiaco de los ratones C57BL/6 inyectados con una  $DL_{50}$  del veneno de *Thalassophryne maculosa* los cambios histológicos más significativos fueron infiltrado inflamatorio neutrofilico (agudo) intepretado como miocarditis hemorrágica, degeneración y acúmulo de material hialino en el intersticio intermiofibrilar y pericarditis fibrinosa. En tejido pulmonar los cambios histológicos más significativos fueron edema y hemorragia intraalveolar, intersticial con la formación de membrana hialina, que conlleva a síndrome de dificultad respiratoria aguda, sacos alveolares distendidos con ruptura de tabiques alveolares y formación de enfisema pulmonar y áreas de colapso alveolar (focos de atelectasia).

## DEDICATORIA

A Dios, a San Miguel Arcángel, y a mis difuntos, mi abuelo Andrés González y a mi prima Krisna Gil a quienes siempre me encomiendo en las situaciones difíciles.

A mis padres Dulce Romero y Carlos González por ser pieza fundamental en mi vida, por estar siempre ahí cuando los he necesitado, por todos sus sacrificios y por su apoyo incondicional para ayudarme alcanzar cada una de mis metas, a Uds. debo todo lo que soy. Los quiero mucho.

A mis Abuelos y Abuelas por inculcarme los valores del respeto, la responsabilidad, la paciencia, la solidaridad, y por sus palabras de apoyo en todo momento.

A mis tías y tíos especialmente a Andrés González, María Gil, Diana González, Odila González, Ramón González, Oscar Rendón, Betty Rendón, Gregorina Romero, Luisa Romero, Simón Romero por estar presentes durante toda mi carrera, siempre atentos y dispuestos a ayudarme, A ustedes mi eterno agradecimiento.

A mi hermano Andrés Felipe González por apoyarme todos estos años y por ser mi amigo de toda la vida.

A mis primas y primos, en especial a Adriana y a Annia, por abrirme las puertas de sus casas y estar siempre dispuestas a ayudarme en las buenas y en las malas, y a Jesús, Judith, Pachico, Fabiana, María José, Víctor Daniel, Juancho, Andrés y María Virginia por todos los buenos momentos compartidos y por su apoyo incondicional.

A mis amigos Felito, Vito, Yoselin, Sheyla y Xiomara siempre fieles e incondicional, por abrirme las puertas de sus casas, por su cariño y preocupación constante y siempre darme una palabra de ánimo y fuerza en los momentos en que más lo necesitaba.

A mi novia Marbella Cárdenas por brindarme su apoyo y su cariño al inicio y ahora en la recta final de mi carrera, por estar siempre atenta y por darme ánimos y consejos cada vez que necesitaba escuchar esas palabras de aliento, te quiero mucho.

A mis amigos y amigas Taty, Francelys, Marianellys, Sandy, José, Javier, Ernesto, Emizael, Alejandro, Domingo, Elmith, Yaylem, May, María Almida y Andreina por acompañarme durante este largo camino, por los buenos momentos que pasamos juntos, gracias por estar siempre conmigo en las buenas y en las malas, los quiero mucho.

*Carlos Andrés González Romero*

## DEDICATORIA

A Dios y la Virgen del Valle, por ser la luz que guía mis pasos, mi fortaleza en los momentos difíciles y mi fuerza para levantarme y seguir adelante.

A mi madre Xiomara Castillo, por brindarme la mejor educación, por estar ahí cuando la necesito, por su gran paciencia, su apoyo incondicional, consejos y sacrificios dados para ayudarme a lograr alcanzar cada meta que me propongo. Gracias por enseñarme que todo lo puedo con esfuerzo y dedicación.

A mis hermanos Osmarilys y Omar José, por estar presentes en cada uno de mis pasos. Gracias por su apoyo y preocupación

A mi hermana Osmary Sulbaran y su esposo Alcides Pereda, porque quererme como una hija, por ser mis amigos incondicionales durante todos estos años. Gracias por sus consejos, por su ayuda, su apoyo, por preocuparse por mí y estar en cada uno de mis pasos, pero sobre todo, gracias por regalarme la dicha de ser tía de Ricardo José.

A mis grandes amigos Félix Surga, por apoyarme en los momentos difíciles, por ser incondicional y siempre estar presente. Carlos González, por su cariño y preocupación constante. Luis Guerra, por ser franco y enseñarme a ser fuerte antes los obstáculos de la vida, por quererme como una hermana y Francisco Ovando, por enseñarme que la esperanza es lo último que se pierde y que el tiempo puede acortar las distancias. Gracias por cuidarme, gracias por sus palabras de aliento y gracias por enseñarme que *“Lo que pinta este pincel ni el tiempo lo ha de borrar, y nadie ha de animarse a corregirle la plana; no pinta quien tiene ganas sino quien sabe pintar”*.

A nuestros asesores Aleikar Vásquez Suárez y Leonardo De Sousa por permitirme ser su tesista y por orientar pacientemente la trayectoria de tan anhelado objetivo; siento mucha admiración por ustedes, tanto por su humildad como por su dedicación como profesores.

A mis amigos y compañeros de la Universidad; Nereida Solano, Meralcy Bolívar, Jesús Senior, José Guacarán, Milagros Tirado, María Rodríguez, Luz Romero, Kelly Franco, Adriana Avilera, Dairilys Hernández, Brigitte Cabello, Eri Meneses, José Ordoñez, por sus complicidad y por brindarme tanta alegría a cada momento de mi vida, gracias por estar siempre conmigo en las buenas y en las malas.

*Xiomara del Valle Sulbaran Castillo*

## **DEDICATORIA**

Primeramente a Dios, y a su gran hijo nuestro señor Jesucristo por regalarme la oportunidad de vivir y de ser hoy lo que soy, llevarme de su mano en todos mis caminos y mantenerme firme para lograr todas mis metas. De verdad Señor, me siento muy feliz por regalarme innumerables cosas, en especial tu amor.

A mi madre Yuraima Tovar y mi hermano José Francisco, por estar conmigo en toda circunstancia. Por siempre apoyarme, en las buenas y en las malas. Por quererme tanto, hacerme sentir seguro y no desvanecer ante cualquier obstáculo. Siempre lo tengo presente en cada decisión que he de tomar. Gracias los amo

A Xiomara Sulbaran, por siempre darme su apoyo. Ser pilar fundamental en la culminación de mi carrera, ayudarme ante las adversidades y problemas a lo largo de esta hermosa carrera y llenarme de alegría en tantos momentos de mi vida. Xiomara muchas gracias

A mi tía Luisa Figueroa, gracias por su apoyo incondicional, por cuidarme y guiarme a lo largo de mi carrera. Me siento muy feliz por tenerte. Gracias por estar ahí.

A mi abuela Delfina Tovar y mi abuelo Félix Palomo que aunque sé que ya no están físicamente sé que desde siempre confiaron en mí y esperaban que este día llegara y, y sé que desde el cielo me han iluminado el camino para superar los obstáculos y seguir adelante con mi sueño que apenas comienza.

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

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

A mi amigo Carlos por permitirme compartir los estudios a su lado y juntos superar todos los obstáculos

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

*Félix José Surga Tovar*

## **AGRADECIMIENTOS**

A la Universidad de Oriente y Escuela de Ciencias de la Salud, Núcleo de Anzoátegui, por ser nuestra segunda casa y brindarnos la oportunidad de formar parte de su gran Comunidad Académica.

Al Laboratorio de Toxinología y Grupo de Investigación en Toxinología Aplicada y Animales Venenosos, Escuela de Ciencias de la Salud, Núcleo Anzoátegui, por permitirnos el desempeño y elaboración de nuestro Trabajo de Grado.

A nuestros tutores Prof. Aleikar Vásquez, y Dr. Leonardo De Sousa por su dedicación, por brindarnos su ayuda, apoyo, paciencia y conocimientos en la realización de este trabajo de investigación.

La Dra. Irene Rodríguez de Ortega y los técnicos Juan Carlos Rodríguez y Milagros López, por sus conocimientos y por habernos permitido trabajar en la institución para la realización de este trabajo.

Al Dr. Demetrio Kiriakos, a la Dra. Nereida Solano y Yolimar Natera, por su contribución académica y espiritual en la realización del presente trabajo.

A todas aquellas personas que de una u otra forma contribuyeron en la realización del presente trabajo, nuestros más profundos agradecimientos. Fue duro y largo el camino, pero al fin lo logramos.

*Carlos Andrés González Romero  
Xiomara del Valle Sulbaran Castillo  
Félix José Surga Tovar*

# ÍNDICE GENERAL

	<b>Página</b>
DECLARACIÓN JURADA .....	ii
RESUMEN.....	iii
DEDICATORIA. Br. Carlos González .....	iv
DEDICATORIA. Br. Xiomara Sulbaran. ....	v
DEDICATORIA. Br. Felix Surga. ....	vi
AGRADECIMIENTOS .....	vii
ÍNDICE GENERAL .....	viii
ÍNDICE DE TABLAS .....	x
ÍNDICE DE FIGURAS.....	xi
INTRODUCCIÓN .....	13
CAPÍTULO I.....	14
EL PROBLEMA .....	14
OBJETIVOS .....	15
Objetivo general .....	15
Objetivos específicos.....	15
CAPÍTULO II .....	16
MARCO TEÓRICO.....	16
CAPÍTULO III.....	19
MARCO METODOLÓGICO.....	19
Obtención y purificación parcial del veneno .....	19
Determinación de la actividad proteolítica .....	20
Determinación de la actividad hemolítica .....	20

Comprobación de la actividad antibacteriana.....	21
Designación de una DL <sub>50</sub> como dosis controlada del veneno de <i>Thalassophryne maculosa</i> .....	21
Evaluación de los signos de toxicidad aguda experimental y su curso temporal de aparición .....	22
Descripción de los cambios histológicos agudos en tejido cardiopulmonar de ratones C57BL/6, causados por la inyección intraperitoneal del veneno de <i>Thalassophryne maculosa</i> .....	22
 CAPÍTULO IV .....	 24
ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	24
Resultados.....	24
Actividad antimicrobiana del veneno de <i>Thalassophryne maculosa</i> .....	24
Actividad hemolítica del veneno de <i>Thalassophryne maculosa</i> .....	26
Actividad proteolítica del veneno de <i>Thalassophryne maculosa</i> .....	26
Curso temporal de toxicidad aguda experimental.....	29
Hallazgos histológicos .....	30
Descripción histológica del tejido cardiopulmonar posterior a la inyección de una DL <sub>50</sub> de veneno de <i>Thalassophryne maculosa</i> en ratones de la cepa C57/BL6.....	33
Discusión .....	42
 CAPÍTULO V .....	 45
CONCLUSIONES .....	45
 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	 46
 HOJA DE METADATOS PARA TESIS Y TRABAJOS DE ASCENSO .....	 51

## ÍNDICE DE TABLAS

	<b>Página</b>
<b>Tabla.1</b> Resistencia o susceptibilidad antimicrobiana de diferentes cepas de bacterias al veneno de <i>Thalassophryne maculosa</i> (Pisces, Batrachoididae).....	24

## ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
<b>Figura 1.</b> Determinación de la Dosis Letal Cincuenta (DL <sub>50</sub> ) del veneno de <i>Thalassophryne maculosa</i> (Pisces, Batrachoididae) por vip en ratones hembra C57BL/6.....	21
<b>Figura 2.</b> Actividad proteolítica del veneno <i>Thalassophryne maculosa</i> sobre placa radiográfica.....	26
<b>Figura 3.</b> Actividad proteolítica del veneno <i>Thalassophryne maculosa</i> , sobre placa radiográfica, obtenido por Alcalá y colaboradores (2010). .....	27
<b>Figura 4.</b> Regresión logarítmica y exponencial de la actividad proteolítica del veneno <i>Thalassophryne maculosa</i> sobre placa radiográfica (tomado de Alcalá y col., 2010). .....	28
<b>Figura 5.</b> Curso temporal de aparición de los signos de toxicidad aguda experimental inducidos por el veneno de <i>Thalassophryne maculosa</i> administrado por vip en ratones C57BL/6. ....	29
<b>Figura 6.</b> Sección de tejido cardíaco correspondiente a un ratón control de la cepa C57BL/6.....	31
<b>Figura 7.</b> Sección de tejido pulmonar normal de ratón C57BL/6.....	32
<b>Figura 8.</b> Corte longitudinal de tejido cardíaco de ratón C57BL/6 inyectado con una DL <sub>50</sub> del veneno de <i>Thalassophryne maculosa</i> teñido con hematoxilina-eosina a 10x.....	34
<b>Figura 9.</b> Corte longitudinal de tejido cardíaco de ratón C57BL/6 inyectado con una DL <sub>50</sub> del veneno de <i>Thalassophryne maculosa</i> teñido con hematoxilina-eosina a 10x.....	35
<b>Figura 10.</b> Corte longitudinal de tejido cardíaco de ratón C57BL/6 inyectado con una DL <sub>50</sub> del veneno de <i>Thalassophryne maculosa</i> teñido con hematoxilina-eosina a 10x.....	35
<b>Figura 11.</b> Corte longitudinal de tejido cardíaco de ratón C57/BL6 inyectado con una DL50 del veneno de <i>Thalassophryne maculosa</i> teñido con hematoxilina-eosina a 4x.....	36

<b>Figura 12.</b> Corte transversal de tejido pulmonar de ratón C57BL/6 inyectado con una DL <sub>50</sub> del veneno de <i>Thalassophryne maculosa</i> teñido con hematoxilina-eosina a 4x.....	36
<b>Figura 13.</b> Tejido pulmonar de ratón C57BL/6 inyectado con una DL <sub>50</sub> del veneno de <i>Thalassophryne maculosa</i> teñido con hematoxilina-eosina a 4x. ....	37
<b>Figura 14.</b> Tejido pulmonar de ratón C57BL/6 inyectado con una DL <sub>50</sub> del veneno de <i>Thalassophryne maculosa</i> teñido con hematoxilina-eosina a 10x. ....	37
<b>Figura 15.</b> Corte longitudinal de tejido pulmonar de ratón C57BL/6 inyectado con una DL <sub>50</sub> del veneno de <i>Thalassophryne maculosa</i> teñido con hematoxilina-eosina a 4x.....	38
<b>Figura 16.</b> Corte transversal de tejido pulmonar de ratón C57BL/6 inyectado con una DL <sub>50</sub> del veneno de <i>Thalassophryne maculosa</i> teñido con hematoxilina-eosina a 10x.....	38
<b>Figura 17.</b> Tejido pulmonar de ratón C57BL/6 inyectado con una DL <sub>50</sub> del veneno de <i>Thalassophryne maculosa</i> teñido con hematoxilina-eosina a 10x. ....	39
<b>Figura 18.</b> Corte transversal de tejido pulmonar de ratón C57BL/6 inyectado con una DL <sub>50</sub> del veneno de <i>Thalassophryne maculosa</i> teñido con hematoxilina-eosina a 4x.....	39
<b>Figura 19.</b> Corte transversal de tejido pulmonar de ratón C57BL/6 inyectado con una DL <sub>50</sub> del veneno de <i>Thalassophryne maculosa</i> teñido con hematoxilina-eosina a 4x.....	40
<b>Figura 20.</b> Corte longitudinal de tejido pulmonar de ratón C57BL/6 inyectado con una DL <sub>50</sub> del veneno de <i>Thalassophryne maculosa</i> teñido con hematoxilina-eosina a 4x.....	40
<b>Figura 21.</b> Corte transversal de tejido pulmonar de ratón C57BL/6 inyectado con una DL <sub>50</sub> del veneno de <i>Thalassophryne maculosa</i> teñido con hematoxilina-eosina a 4x.....	41
<b>Figura 22.</b> Corte transversal de tejido pulmonar de ratón C57BL/6 inyectado con una DL <sub>50</sub> del veneno de <i>Thalassophryne maculosa</i> teñido con hematoxilina-eosina a 10x.....	41

## INTRODUCCIÓN

El envenenamiento causado por el pez sapo cano *Thalassophryne maculosa*, produce manifestaciones clínicas fundamentalmente inflamatorias, con el desarrollo de necrosis en el sitio de inyección del veneno, a través de las espinas dorsales y/u operculares, de este pez de la familia Batrachoididae. A pesar de ello, mucho de los componentes responsables de tales efectos no han sido estudiados ni identificados con precisión.

Por todo lo expuesto anteriormente, este trabajo se elaboró de acuerdo con los siguientes capítulos:

El capítulo I, denominado el problema, en el cual se plantea la pregunta de investigación, a raíz de ello surgen las interrogantes que dan paso a la formulación del objetivo general y los objetivos específicos. También contempla la justificación e importancia y los alcances de la investigación. Seguidamente, en el capítulo II se expone el marco teórico, en el cual se presenta los antecedentes de la investigación relacionados con estudios previos que tienen relación con el problema planteado. Además, comprende las bases teóricas donde se citan distintos autores sobre los conceptos y puntos relevantes del tema de estudio y los objetivos planteados. El capítulo III, está dirigido a describir e interpretar la naturaleza de la investigación, estableciendo el tipo, modelo y diseño de la misma. Luego, el capítulo IV referido al análisis de la investigación, consiste en interpretar cada uno de los objetivos para obtener respuestas a las interrogantes surgidas en el planteamiento del problema. En el capítulo V, se desarrollan las conclusiones obtenidas.

# **CAPÍTULO I**

## **EL PROBLEMA**

En las costas venezolanas especialmente las del oriente del país, tanto pescadores artesanales como turistas, son víctimas frecuentes de accidentes por diversos animales marinos (Boccalon y col., 2004). Sin embargo, la carencia de estadísticas epidemiológicas no permite, al presente, conocer la verdadera magnitud de la incidencia de estos casos y por ende, su relevancia (Boccalon y col., 2004; Gutierrez y col., 2004; Loyo y col., 2008).

Debido a la falta de información sobre la actividad biológica, particularmente la del veneno del pez *Thalassophryne maculosa*, surgiría la necesidad de dilucidar los posibles efectos bioactivos de sus componentes, los cuales pudieran servir de base molecular en la preparación de nuevos fármacos; y al mismo tiempo, aportar conocimientos que pudiesen servir de línea base en la elaboración de un antiveneno para ésta y otras especies del género.

## OBJETIVOS

### Objetivo general

Evaluar los efectos biológicos *in vitro* e *in vivo* del veneno del pez *Thalassophryne maculosa* (Pisces, Batrachoididae) presente en costas venezolanas.

### Objetivos específicos

Actividad *in vitro*:

1. Determinar el efecto del veneno *T. maculosa* sobre cepas bacterianas Gram negativas y positivas.
2. Determinar la actividad biológica (proteolítica y hemolítica) *in vitro* del veneno.

Actividad *in vivo*:

1. Designar una  $DL_{50}$ , como dosis controlada, del veneno de *T. maculosa* para la cepa de ratón C57BL/6.
2. Observar en la cepa de ratón C57BL/6, los signos clínicos de toxicidad aguda experimental y su curso temporal de aparición, durante sesenta minutos, inducidos como efecto tóxico de la inyección intraperitoneal de una dosis controlada de veneno de *T. maculosa*.
3. Determinar los cambios histológicos agudos como efecto de toxicidad aguda experimental del veneno de *T. maculosa* en tejido cardiopulmonar de ratones C57BL/6.

## **CAPÍTULO II**

### **MARCO TEÓRICO**

En las grandes masas de agua que recubren el globo terráqueo, existe una amplia variedad de peces cartilaginosos y óseos, marinos y dulceacuícolas, potencialmente ponzoñosos y venenosos para el ser humano, que han sido reconocidos como agentes causales de problemas de salud pública en algunas zonas tropicales. Las personas que visitan esporádicamente o frecuentan el litoral marino por motivos de esparcimiento, deportivos o profesionales están expuestas a la toxicidad producida por algún tipo de contacto con diversas especies animales peligrosas que habitan en lecho marino. Y el tipo de actividad puede determinar la probabilidad y naturaleza de la exposición humana a estos organismos que son variados y por lo general de importancia local o regional.

Las costas venezolanas, por su ubicación relativa en la zona tropical, presentan gran variedad de invertebrados y vertebrados marinos y dulceacuícolas que pueden ocasionar diferentes tipos de interacción con el hombre, potencialmente negativas, caracterizadas por dolor, envenenamiento, reacciones alérgicas, trastornos psicológicos y hasta la muerte (Machado-Allinson y Rodríguez-Acosta, 1997; Gutiérrez y col., 2004). El pez sapo cano, *Thalassophryne maculosa* Günther, 1861, perteneciente a la familia Batrachoididae, es una especie venenosa distribuida en la costa norte Suramericana, en las islas de Aruba, Curazao, Trinidad y Tobago. En la región insular venezolana, es común a lo largo de las playas arenosas al suroeste de la isla de Cubagua y en la costa sur de la isla de Margarita.

De forma general, a los peces capaces de generar toxinas se les denominan acantotóxicos, conociéndose en la actualidad más de 1.500 especies, muchas de ellos caracterizados por poseer espinas dorsales asociadas a una glándula productora de veneno, en la que se generan toxinas que varían en composición química y farmacológica. Las toxinas producidas por peces son denominadas ictiotoxinas, pueden ser moléculas no proteicas, de bajo peso molecular, termoestables, tóxicas luego de su ingestión, y las de grandes biomoléculas, cuyo peso molecular puede variar entre 50.000 y 800.000 Dalton, por lo general de naturaleza proteica, termolábiles y activas por vía parenteral (Loyo y col., 2008).

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

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

son utilizados como órganos defensivos venenosos, pudiendo infligir, con tales estructuras, punciones dolorosas (Junghanss y Bodio, 2006).

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

Es conocida la naturaleza proteica de los venenos sintetizados por los peces (Fry y col., 2009), sin embargo, algunas investigaciones han mencionado contradicciones relativamente significativas con respecto a su actividad biológica y a sus propiedades bioquímicas. Tales discrepancias han sido atribuidas principalmente a las condiciones fisiológicas entre los especímenes, que podrían estar relacionadas con la constitución del veneno y adicionalmente, a su marcada inestabilidad química (Goudey-Perrière y Perrière, 1998).

## **CAPÍTULO III**

### **MARCO METODOLÓGICO**

#### **Obtención y purificación parcial del veneno**

Ejemplares del pez sapo *Thalassophryne maculosa* fueron capturados en aguas someras del Parque Nacional La Restinga, estado Nueva Esparta, Venezuela. El veneno se obtuvo por ordeño manual, mediante el descubrimiento de sus espinas dorsales y operculares. Posterior a su eyección, éste fue recogido con ayuda de una micropipeta y transferido a tubos Eppendorf de 1,5 mL. Las muestras se mantuvieron a -20°C hasta el momento de su uso.

El veneno, transferido a tubos Eppendorf de 1,5 mL, fue suspendido en 1 mL de agua bidestilada y agitado en vortex (Super-Mixer<sup>®</sup>). Consecutivamente se centrifugó a 14.000 g (Labnet para tubos Eppendorf<sup>®</sup>, modelo Z180M) por 20 minutos para separar restos celulares de la fase soluble que contiene las proteínas con actividad farmacológica.

Se realizaron diluciones del veneno, 1/5, 1/10 o 1/20, en agua bidestilada, como paso previo a la cuantificación de las proteínas contenidas en el mismo. Se determinó la concentración de proteínas mediante lectura de absorbancia en un espectrofotómetro Jenway<sup>®</sup>, modelo 6405 UV/vis, a una longitud de onda de 280 nm, asumiendo que 1 unidad de absorbancia (a esta longitud) representó una concentración de 5,46 mg/mL (De Sousa y col., 2009; 2010; De Sousa, 2011).

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

Un volumen de 100  $\mu\text{L}$  del veneno crudo, en conjunto con diluciones seriadas del mismo, fueron centrifugadas a 2 500 rpm por 1 min. A partir de cada dilución, se obtuvo un volumen de 20  $\mu\text{L}$  que fue colocado sobre una placa radiográfica humedecida con agua destilada. La placa radiográfica, portadora de las muestras, se incubó a 37°C por 4 horas. Posteriormente se lavó con agua destilada para eliminar el veneno; se secó a temperatura ambiente y finalmente se evidenció la digestión de gelatina (Huang y Pérez, 1980).

Con un scanner HP ScanJet ADF se obtuvo una imagen, en formato JPG del gel radiográfico, que fue procesado con el programa Imaje J 1.28x de National Institutes of Health, para generar imágenes sometidas a filtros de color azul, rojo o verde; eligiéndose finalmente la generada por el filtro verde. La copia originada se almacenó en formato texto que contenía la localización de los diferentes pixeles de la imagen y su intensidad en escala de grises (8 bits de resolución) y luego se analizó en Mathcad versión 14.0 para componer en definitiva una imagen en falsos colores de 8 bits de resolución (256 colores) (Alcalá y col., 2010).

### **Determinación de la actividad hemolítica**

Se determinó en placas con agar sangre humana (preparado al 5% de sangre en agar nutriente). Se hicieron pozos 8 mm de diámetro contentivos (50  $\mu\text{L}$ ) de veneno crudo y diluciones (1:2; 1:3; 1:4). La actividad hemolítica se evidenció luego que las placas permanecieron por 20 horas a 35°C.

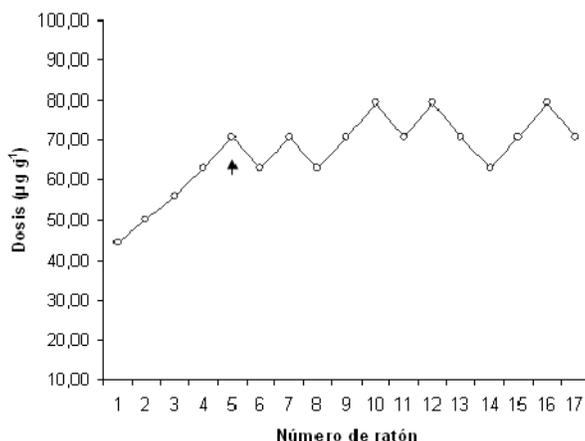
Adicionalmente se colocó un pozo con solución salina, el cual fue tomado como control.

### Comprobación de la actividad antibacteriana

El nivel de susceptibilidad antimicrobiana se realizó mediante el método de difusión en discos (Bauer y Kirby, 1966), utilizando cepas Gram negativas y positivas, certificadas.

### Designación de una $DL_{50}$ como dosis controlada del veneno de *Thalassophryne maculosa*

La  $DL_{50}$  del veneno de *Thalassophryne maculosa*, para una hora de experimentación, fue determinada (en trabajo previo) por el método secuencial de Dixon y Mood (1948) modificado por Sevcik (1987) en ratones hembra C57BL/6 (Alcalá y col., 2010) (Fig. 1).



**Figura 1.** Determinación de la Dosis Letal Cincuenta ( $DL_{50}$ ) del veneno de *Thalassophryne maculosa* (Pisces, Batrachoididae) por vip en ratones hembra C57BL/6.

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

## **Evaluación de los signos de toxicidad aguda experimental y su curso temporal de aparición**

Dos ratones hembra de la cepa C57BL/6, adquiridos en el Bioterio del Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC) y disponibles en el área del Laboratorio de Toxinología, fueron inyectados por vía intraperitoneal con una  $DL_{50}$  del veneno de *Thalassophryne maculosa*, como dosis controlada. En tal sentido, a cada uno de los 2 ratones C57BL/6 se les administró una dosis de veneno de 70,80  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  de ratón.

Los signos clínicos expresados como efecto de toxicidad aguda experimental inducida por la inyección intraperitoneal de la dosis controlada del veneno de *Thalassophryne maculosa*, fueron observados meticulosamente durante los 60 minutos de experimentación y tabulados cronológicamente; adicionalmente se registró el resultado final de sobrevivencia o muerte. Se utilizaron animales testigo a los cuales se les administró solución fisiológica en volúmenes similares a los del grupo experimental (De Sousa y col., 2009, 2010; De Sousa, 2011).

## **Descripción de los cambios histológicos agudos en tejido cardiopulmonar de ratones C57BL/6, causados por la inyección intraperitoneal del veneno de *Thalassophryne maculosa***

Una vez cumplido el tiempo de sesenta minutos de exposición al tratamiento, los animales que no sobrevivieron fueron elegidos para evaluar los cambios histológicos agudos causados por el veneno de *Thalassophryne maculosa*; para ello, se practicó incisión en la línea medio esternal y abdominal y se extrajeron las vísceras en bloque. Luego se fijaron mediante inmersión en formalina al 10% (v/v). Similarmente se procedió con un ratón control. Los órganos se fijaron, durante tres

días, y luego se procedió a la separación en bloque del tejido cardiopulmonar (envenenados y controles) para colocarlos individualmente en cajetillas de inclusión para su posterior tratamiento.

Las piezas se lavaron con agua corriente, por quince minutos, para eliminar la formalina. Posteriormente se deshidrataron con etanol, con concentraciones crecientes (v/v), iniciando al 70%, 80%, 95% y finalmente 100%. Cada paso de deshidratación duró 30 minutos. Posteriormente, el tejido se procesó con xilol (solución 50%-50% v/v de alcohol-xilol) por 15 minutos, seguido por dos períodos en xilol de 15 minutos cada uno. Finalmente fueron incluidos en bloques de parafina para realizar los cortes, con microtomo, con un espesor de 3 micras. Los cortes fueron colocados en portaobjetos rotulados, previamente tratados con albúmina de Mayer. Posteriormente se realizó su secado, en estufa, entre 50 y 55°C durante 20 a 30 minutos, luego se dejaron a temperatura ambiente. Una vez enfriados se procedió a fijar y colorear los cortes con Hematoxilina-Eosina (H-E). Finalmente observados en microscopio de luz.

## CAPÍTULO IV

### ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### Resultados

##### Actividad antimicrobiana del veneno de *Thalassophryne maculosa*

El método de difusión en disco (Bauer y Kirby, 1966) evidenció notable resistencia bacteriana a las diferentes concentraciones del veneno probadas (fueron 1, 5 10 y 15 mg.mL<sup>-1</sup>) (Tabla 1). El veneno de *Thalassophryne maculosa* no fue capaz de inhibir el crecimiento bacteriano comprado con los antibióticos (imipenen y ciprofloxacina) como controles positivos.

**Tabla.1** Resistencia o susceptibilidad antimicrobiana de diferentes cepas de bacterias al veneno de *Thalassophryne maculosa* (Pisces, Batrachoididae)

Microorganismos	Nº de cepas	Resistencia o susceptibilidad del microorganismo a diferentes concentraciones del veneno (mg.mL <sup>-1</sup> )				
		1,5	10	15	Cip	Imi
Cepas silvestres de <i>Aeromonas hydrophila</i>	8	-	-	-	+	+
Cepa certificada de <i>Aeromonas hydrophila</i> ATCC 49140 CVCM 581	1	-	-	-	+	+
Cepa certificada de <i>Aeromonas sobria</i> EM-315k3CVCM 869	1	-	-	-	+	+
Cepas silvestres de <i>Staphylococcus aureus</i>	2	-	-	-	+	+

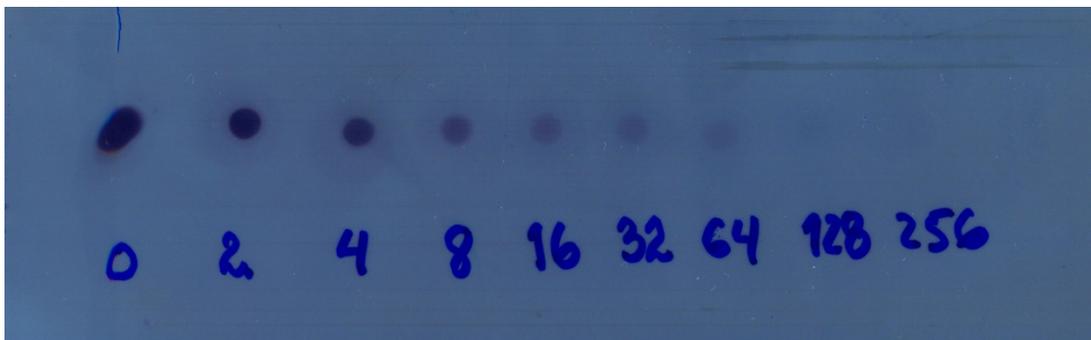
(-): Resistencia bacteriana, (+): Susceptibilidad bacteriana, Cip: ciprofloxacina, Imi: Imipenen

### **Actividad hemolítica del veneno de *Thalassophryne maculosa***

En placas con agar sangre humana con pozos de 8 mm de diámetro contentivos (50  $\mu$ L) de veneno crudo de *T. maculosa* se observó la formación de halos de 4 mm de diámetros, luego de 20 horas de incubación a 35°C, indicativo de actividad hemolítica indirecta del veneno. Este efecto no se observó en las diluciones 1:2, 1:3 o 1:4.

### **Actividad proteolítica del veneno de *Thalassophryne maculosa***

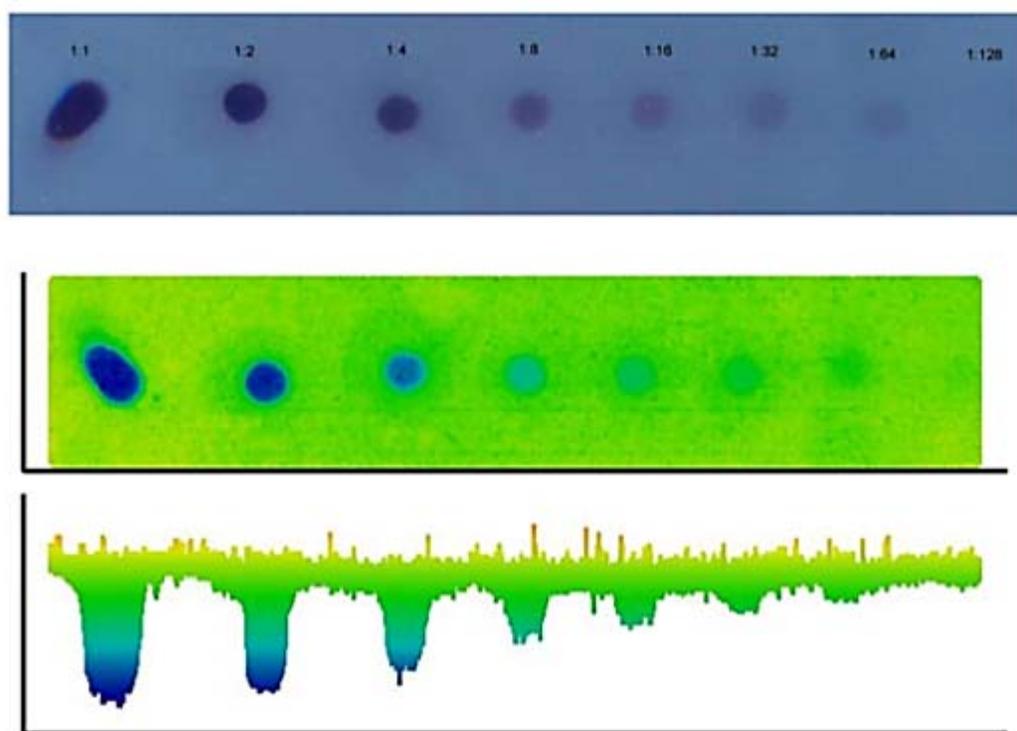
La actividad proteolítica del veneno de *T. maculosa* se estudió con diluciones sucesivas, colocadas sobre gel radiográfico para evidenciar la digestión de la gelatina. El proceso digestivo ocurrió hasta una dilución 1/64 (Fig. 2).



**Figura 2.** Actividad proteolítica del veneno *Thalassophryne maculosa* sobre placa radiográfica.

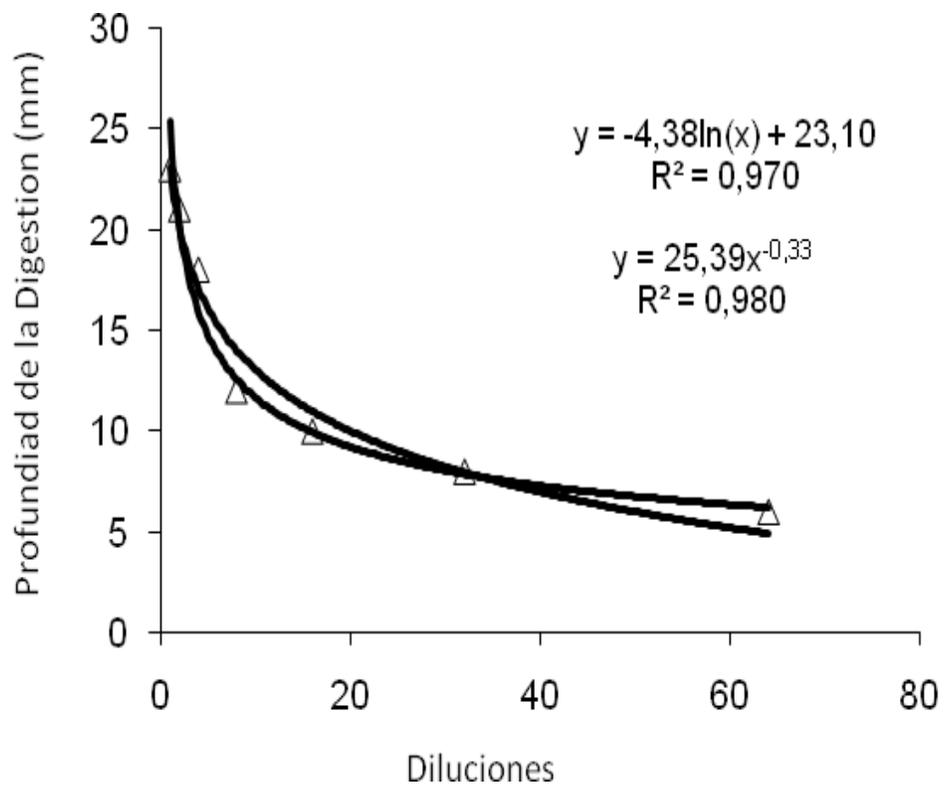
Alcalá y colaboradores (2010), obtuvieron actividad proteolítica similar al observado en este trabajo. Las figuras 3 y 4, tomadas de los autores, representan el procedimiento planteado por ellos, con el fin de demostrar la actividad enzimática del

veneno de *Thalassophryne maculosa*. La digestión de la placa radiográfica (Fig. 3a) se convirtió en una imagen en falsos colores de 8 bits de resolución generada con Mathcad versión 14.0 (Fig. 3b y 3c); indicando actividad hasta 1/64 (Fig. 3b), disminuyendo la potencia proteolítica con la progresión de la diluciones (Fig. 3c); demostrado mediante análisis de regresión logarítmica o exponencial, con alto grado de correlación [ $R^2 = 0,97$  (logarítmica) y  $R^2 = 0,98$  (exponencial)] (Fig. 4).



**Figura 3.** Actividad proteolítica del veneno *Thalassophryne maculosa*, sobre placa radiográfica, obtenido por Alcalá y colaboradores (2010).

(a) Imagen del gel radiográfico obtenido con un scanner HP ScanJet ADF. (b) y (c) Imagen en falsos colores de 8 bits de resolución generada con Mathcad versión 14.0 (a, vista inferior), (c, vista lateral). La imagen obtenida del gel radiográfico (Figura 2a) se procesó con el programa Imaje J 1.28x (National Institute of Health). Con este programa se generaron imágenes con filtros de color azul, rojo o verde; eligiendo la generada por el filtro verde. Ésta se almacenó en formato texto y luego se analizó mediante Mathcad versión 14.0 para componer una imagen en falsos colores de 8 bits de resolución (Figura 2b, vista inferior; Figura 2c, vista lateral) (tomado de Alcalá y col., 2010).

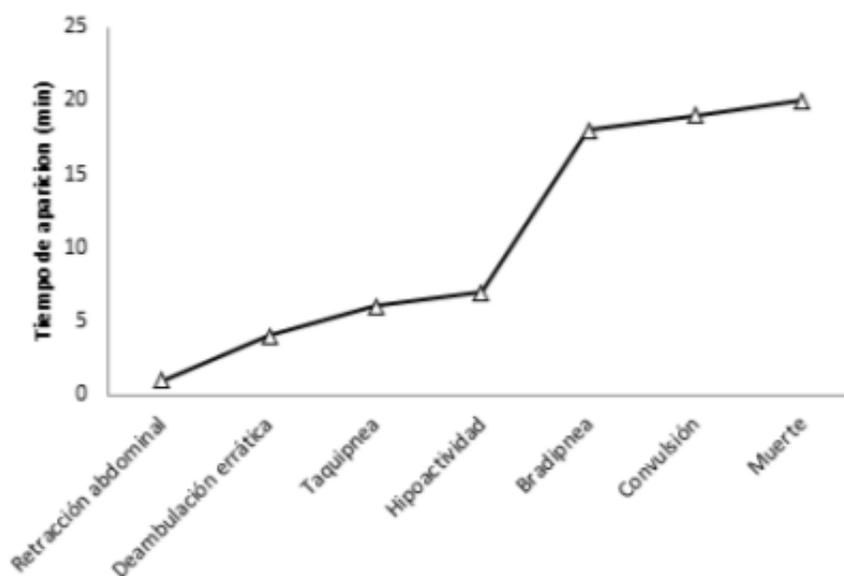


**Figura 4.** Regresión logarítmica y exponencial de la actividad proteolítica del veneno *Thalassophryne maculosa* sobre placa radiográfica (tomado de Alcalá y col., 2010).

### Curso temporal de toxicidad aguda experimental

Luego de la exposición, durante sesenta minutos, al tratamiento conformado por una  $DL_{50}$ , como dosis controlada, se obtuvo una frecuencia de 100% ( $n = 2$ ) de muerte. En la Figura 5 se presenta el curso temporal de aparición de los signos de toxicidad aguda experimental inducida por el veneno de *Thalassophryne maculosa* en ratones, hembra, cepa C57BL/6.

La toxicidad se inició con retracción abdominal, seguida por la presencia de deambulación errática, taquipnea e hipoactividad. Luego de la hipoactividad se evidenció bradipnea, convulsiones tónico-clónicas y finalmente la muerte.



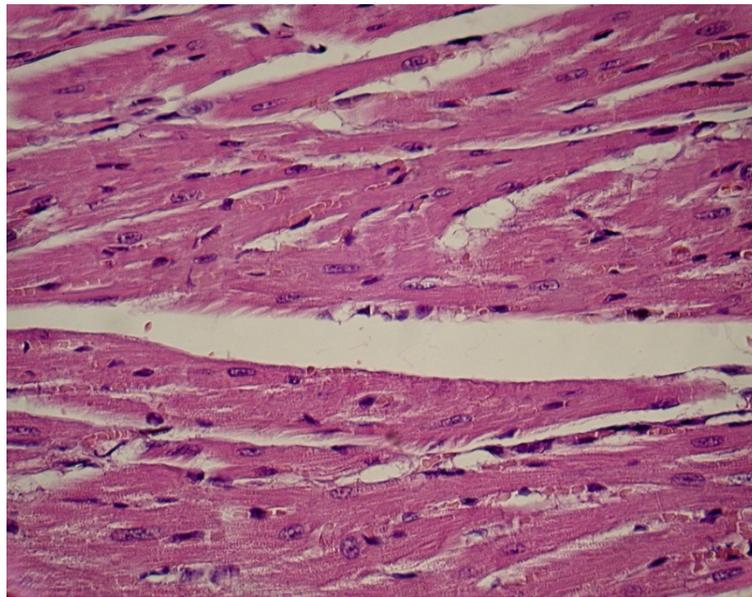
**Figura 5.** Curso temporal de aparición de los signos de toxicidad aguda experimental inducidos por el veneno de *Thalassophryne maculosa* administrado por vip en ratones C57BL/6.

### **Hallazgos histológicos**

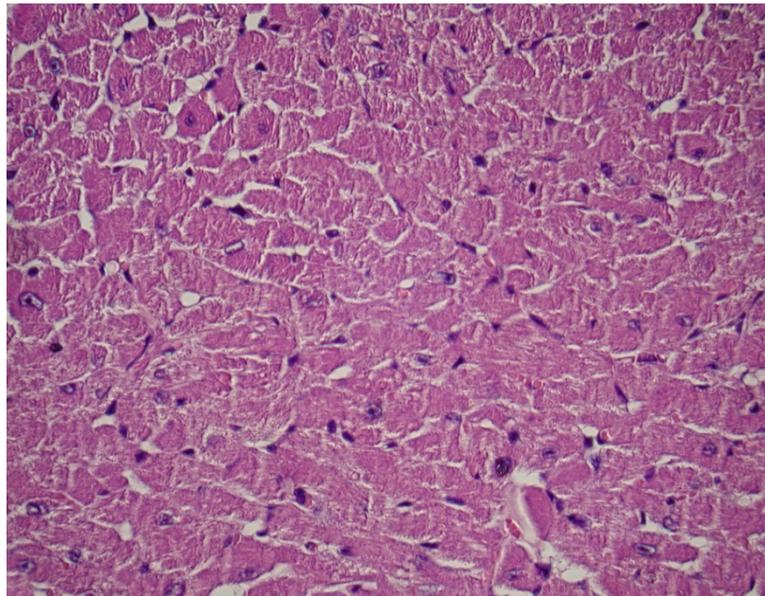
Fotografías de tejido cardiaco (Fig. 6a,b) y pulmonar (Fig. 7a,b) normal, de ratones C57BL/6, caracterizada por la integridad de los tejidos.

El miocardio se caracterizó por presentar fibras principalmente paralelas, de diámetro variable, con numerosos haces cruzados de fibras que se bifurcan y se conectan con fibras adyacentes para formar una red tridimensional. Entre ellos se encuentra un tejido conectivo fino que contiene vasos sanguíneos. Los núcleos de las unidades celulares están ubicadas dentro de las mismas con apariencia central, rodeados de sarcoplasma claro y cromatina finamente distribuida que le confiere un color claro. El sarcoplasma está ocupado por haces filamentosos paralelos que son las miofibrillas (Fig. 6a,b).

Tejido pulmonar normal, de un ratón control C57BL/6, caracterizado por la integridad del tejido alveolar, intersticial y de los vasos sanguíneos (Fig. 7a,b)



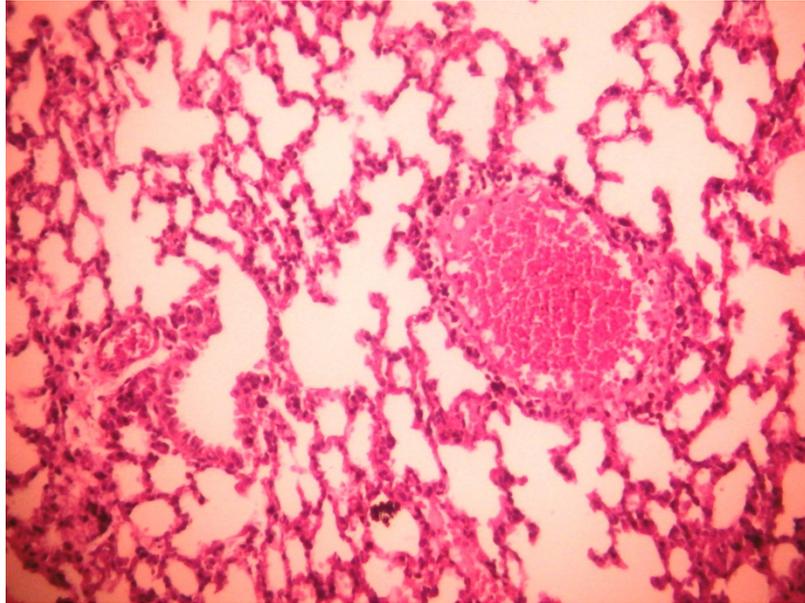
A



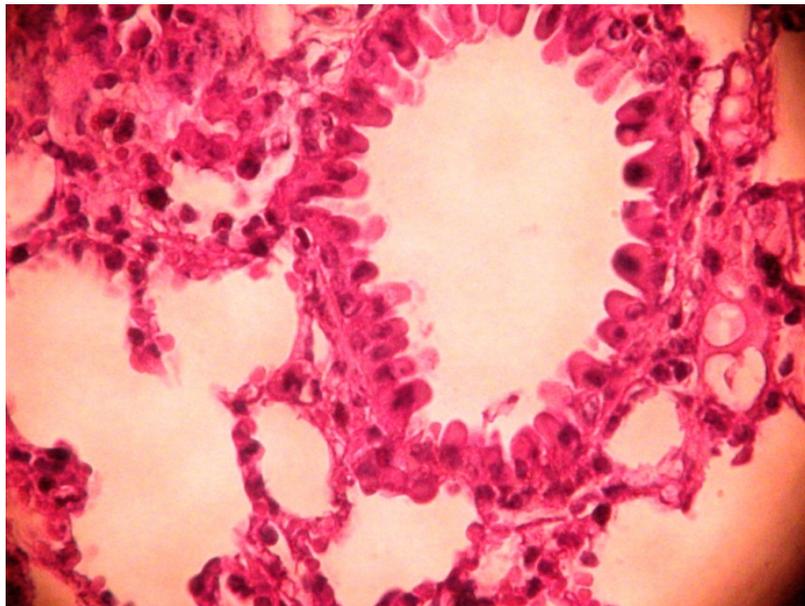
B

**Figura 6.** Sección de tejido cardíaco correspondiente a un ratón control de la cepa C57BL/6.

(a). Corte de sección longitudinal. Integridad de las fibras cardíacas que muestran su núcleo central y sus correspondientes estriaciones. H-E, 40X. (b). Músculo cardíaco cortado transversalmente. H-E, 40X.



A



B

**Figura 7.** Sección de tejido pulmonar normal de ratón C57BL/6. (a). Corte de sección longitudinal. H-E, 10X. (b). Bronquiolo. H-E, 40X.

**Descripción histológica del tejido cardiopulmonar posterior a la inyección de una DL<sub>50</sub> de veneno de *Thalassophryne maculosa* en ratones de la cepa C57/BL6**

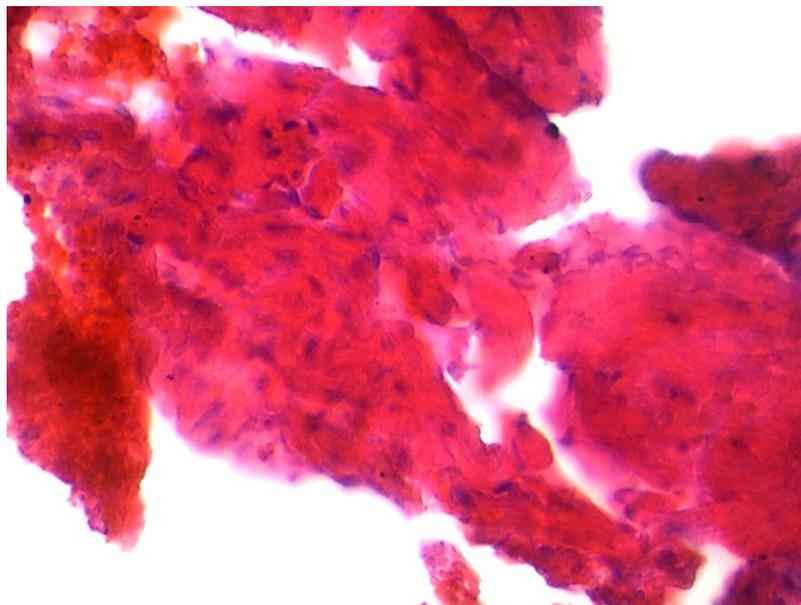
En el tejido cardiaco de los ratones C57BL/6 inyectados con una DL<sub>50</sub> de veneno *T. maculosa*, se observó:

1. Desorganización de miofibrillas (Fig. 8, 9, 10 y 11).
2. Pericarditis fibrinosa (Fig. 11).
3. Degeneración y acumulo de material hialino en el intersticio intermiofibrilar (Fig. 8, 9 y 10).
4. Hemorragia intermiofibrilar (Fig. 9 y 10).
5. Infiltrado inflamatorio neutrofílico (agudo) que se interpreta como miocarditis hemorrágica (Fig. 9 y 10).
6. Trombos intracavitarios (Fig. 10).

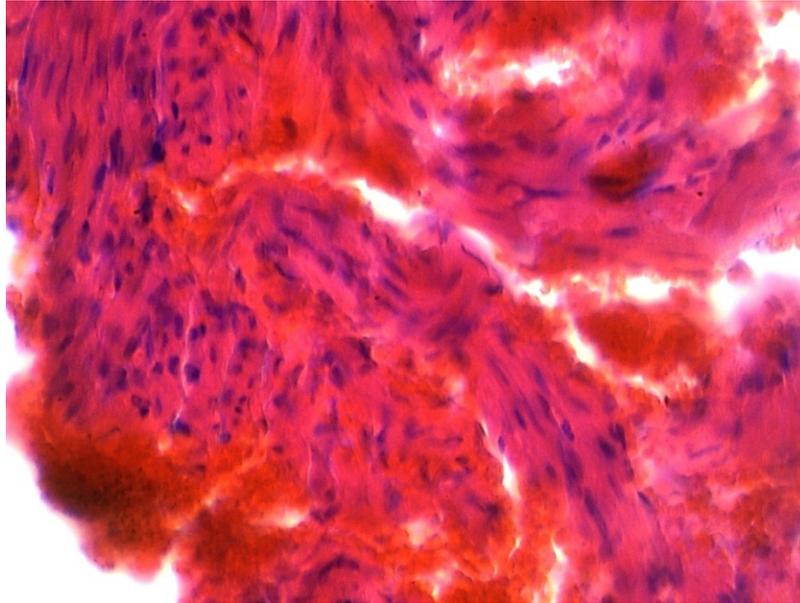
En tejido pulmonar de los ratones C57BL/6 inyectados con una DL<sub>50</sub> de veneno *T. maculosa*, se observó:

1. Sacos alveolares distendidos con ruptura de tabiques alveolares con la formación de enfisema pulmonar (Fig. 12, 15, 18, 20 y 21).
2. Hiperplasia de los neumocitos tipo II (Fig. 13 y 22)
3. Áreas de colapso alveolar (focos de atelectasia) (Fig. 13, 18, 21 y 22).

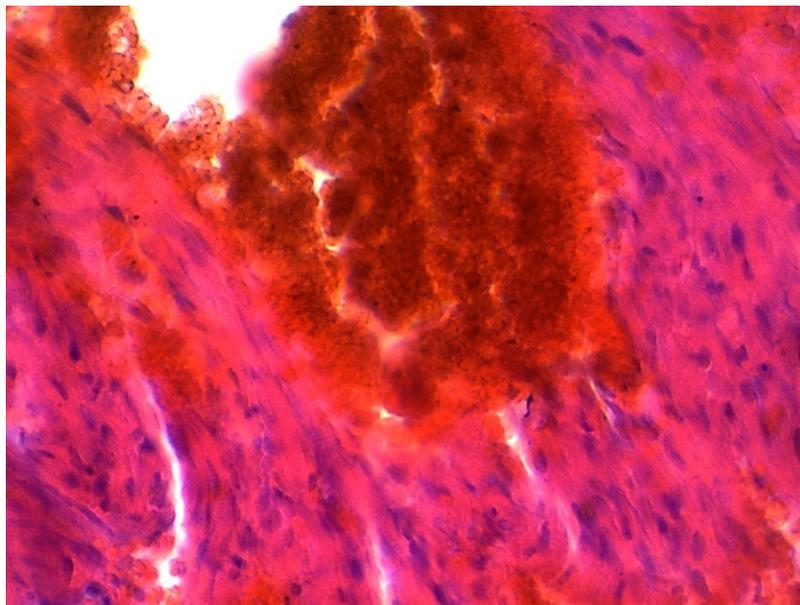
4. Edema y hemorragia intraalveolar, intersticial con la formación de membrana hialina que conlleva a síndrome de dificultad respiratoria aguda (falla respiratoria aguda) (Fig. 14 y 17).
5. Luces vasculares con degeneración hialina de la capa media y del endotelio vascular. Trombosis venosa (Fig. 15, 19 y 21).
6. Presencia de macrófagos cargados de hemosiderina (signo de insuficiencia cardíaca – edema pulmonar) (Fig. 14).
7. Infiltrado inflamatorio en bronquiolos terminales (Fig. 16).
8. Pleuritis fibrinohemática (Fig. 12, 18 y 22).



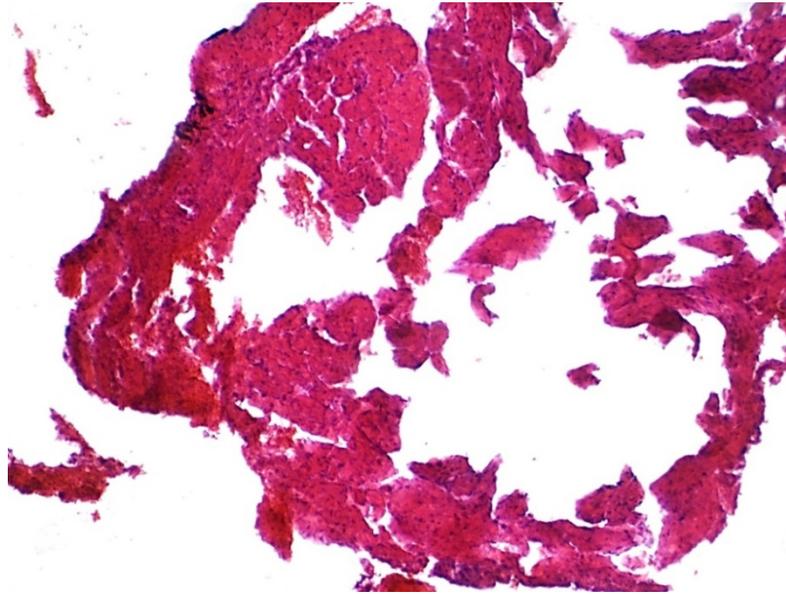
**Figura 8.** Corte longitudinal de tejido cardíaco de ratón C57BL/6 inyectado con una  $DL_{50}$  del veneno de *Thalassophryne maculosa* teñido con hematoxilina-eosina a 10x.



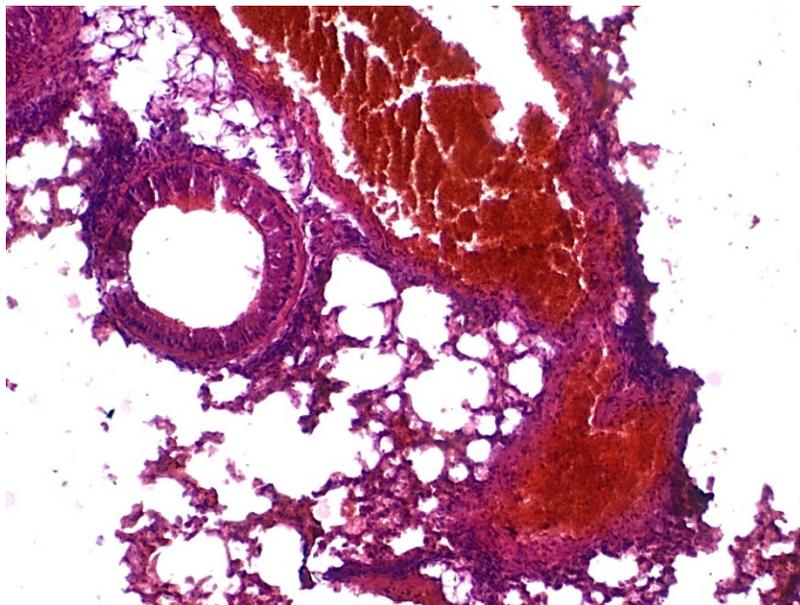
**Figura 9.** Corte longitudinal de tejido cardiaco de ratón C57BL/6 inyectado con una  $DL_{50}$  del veneno de *Thalassophryne maculosa* teñido con hematoxilina-eosina a 10x.



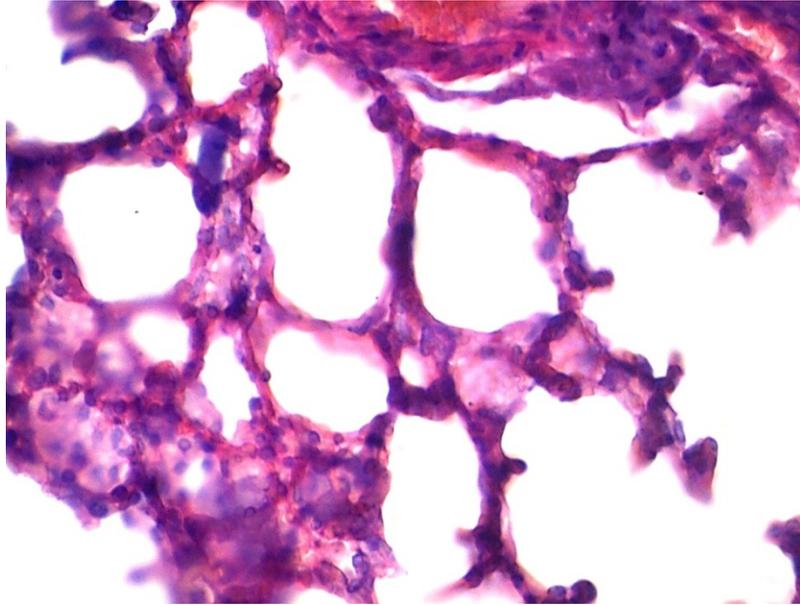
**Figura 10.** Corte longitudinal de tejido cardiaco de ratón C57BL/6 inyectado con una  $DL_{50}$  del veneno de *Thalassophryne maculosa* teñido con hematoxilina-eosina a 10x.



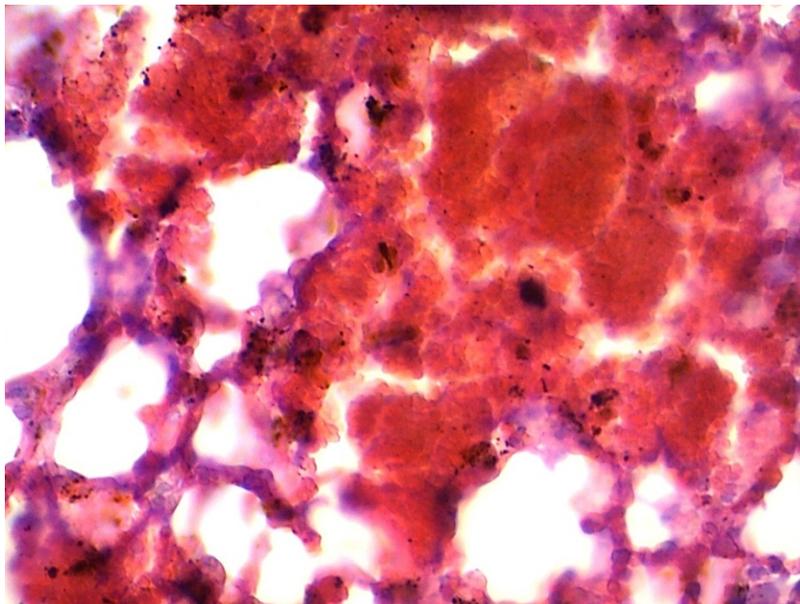
**Figura 11.** Corte longitudinal de tejido cardiaco de ratón C57/BL6 inyectado con una DL<sub>50</sub> del veneno de *Thalassophryne maculosa* teñido con hematoxilina-eosina a 4x.



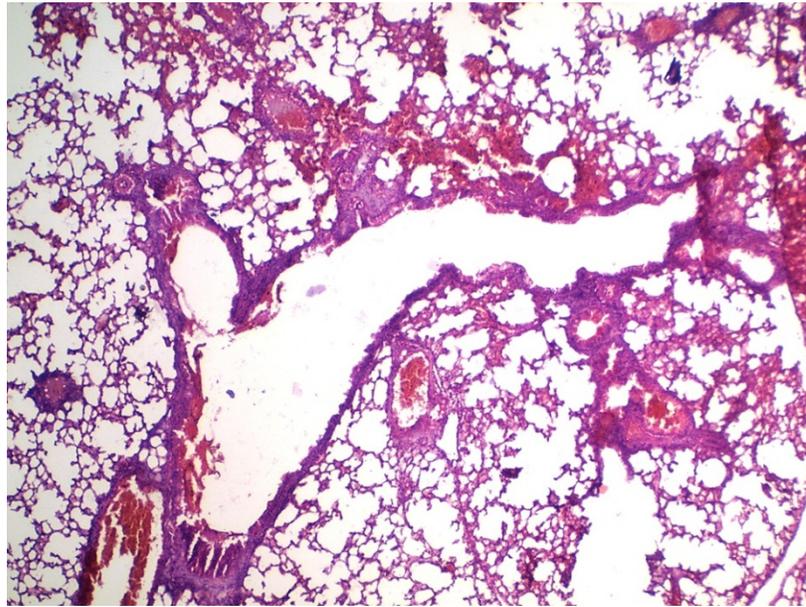
**Figura 12.** Corte transversal de tejido pulmonar de ratón C57BL/6 inyectado con una DL<sub>50</sub> del veneno de *Thalassophryne maculosa* teñido con hematoxilina-eosina a 4x.



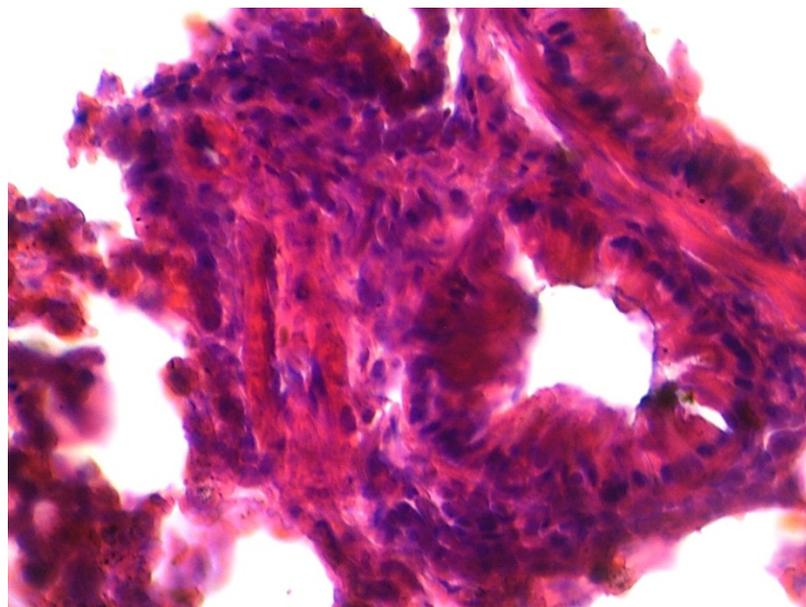
**Figura 13.** Tejido pulmonar de ratón C57BL/6 inyectado con una  $DL_{50}$  del veneno de *Thalasophryne maculosa* teñido con hematoxilina-eosina a 4x.



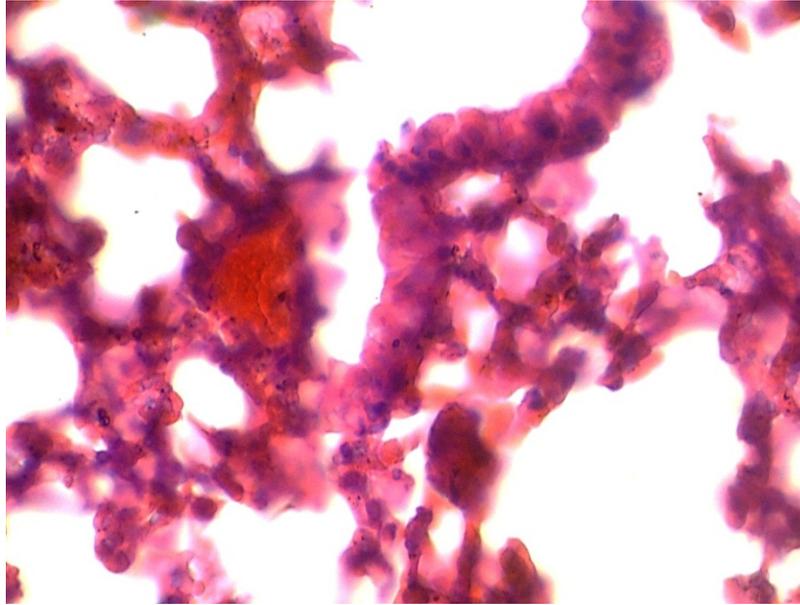
**Figura 14.** Tejido pulmonar de ratón C57BL/6 inyectado con una  $DL_{50}$  del veneno de *Thalasophryne maculosa* teñido con hematoxilina-eosina a 10x.



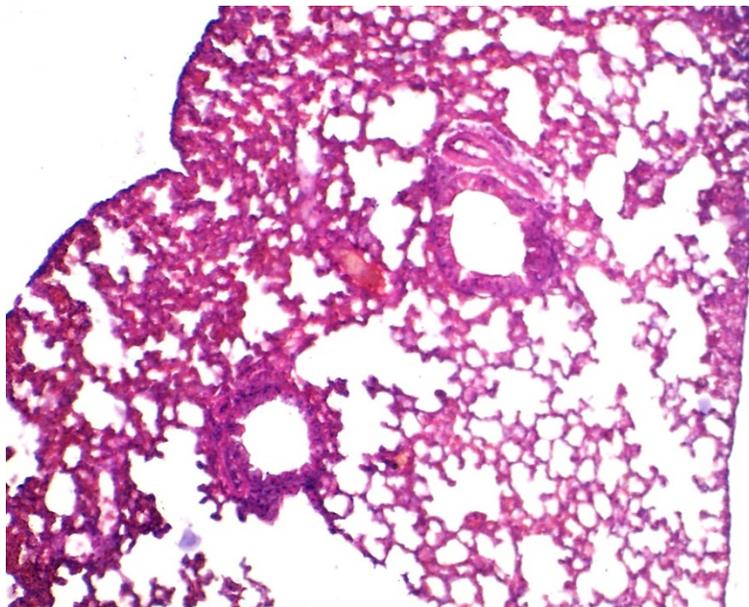
**Figura 15.** Corte longitudinal de tejido pulmonar de ratón C57BL/6 inyectado con una  $DL_{50}$  del veneno de *Thalassophryne maculosa* teñido con hematoxilina-eosina a 4x.



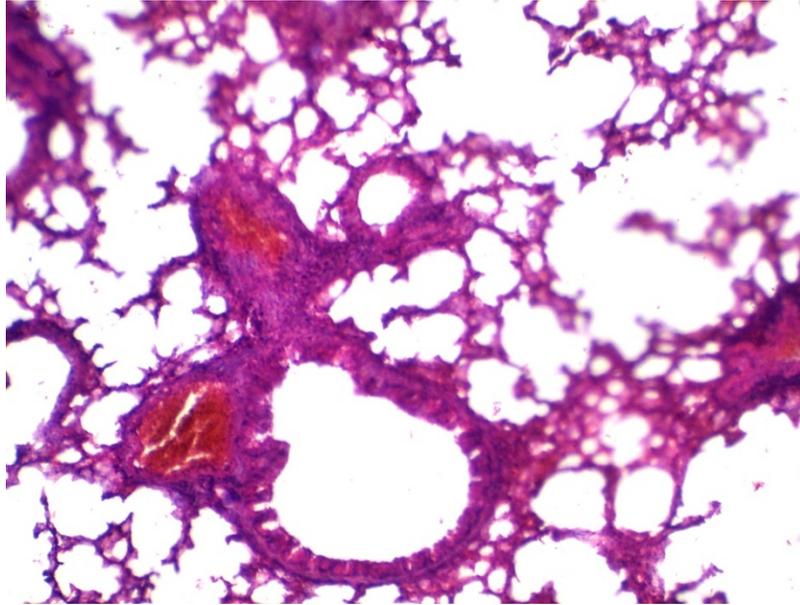
**Figura 16.** Corte transversal de tejido pulmonar de ratón C57BL/6 inyectado con una  $DL_{50}$  del veneno de *Thalassophryne maculosa* teñido con hematoxilina-eosina a 10x.



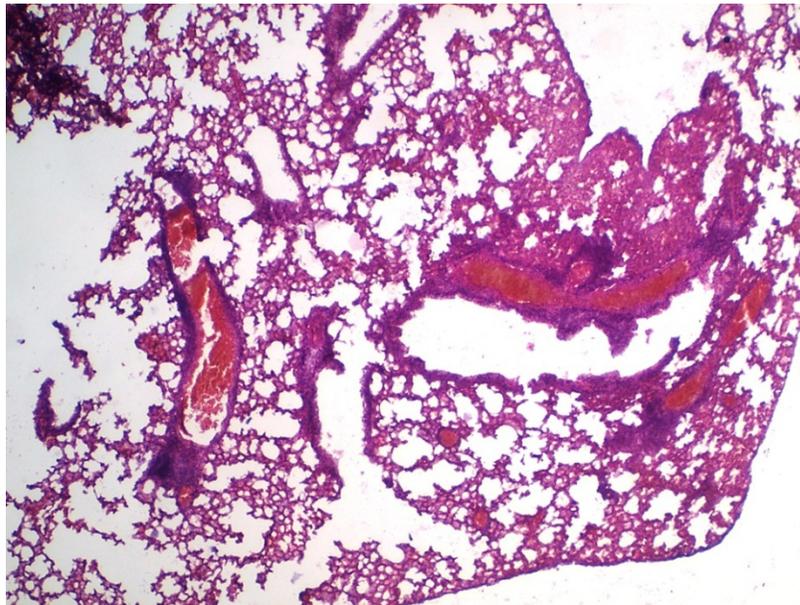
**Figura 17.** Tejido pulmonar de ratón C57BL/6 inyectado con una  $DL_{50}$  del veneno de *Thalassophryne maculosa* teñido con hematoxilina-eosina a 10x.



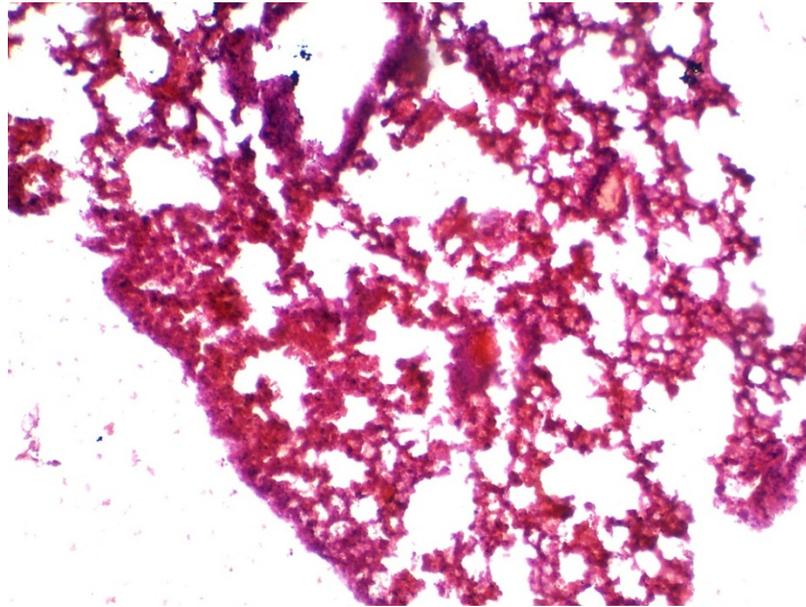
**Figura 18.** Corte transversal de tejido pulmonar de ratón C57BL/6 inyectado con una  $DL_{50}$  del veneno de *Thalassophryne maculosa* teñido con hematoxilina-eosina a 4x.



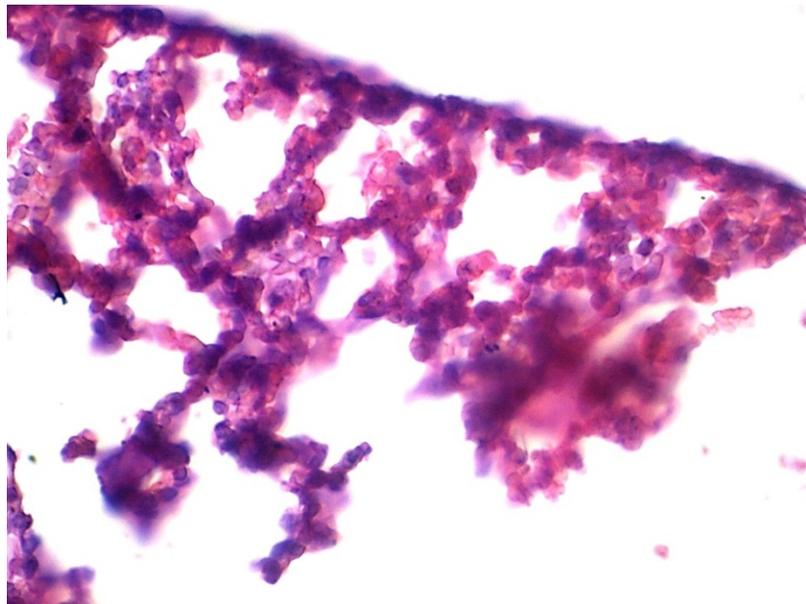
**Figura 19.** Corte transversal de tejido pulmonar de ratón C57BL/6 inyectado con una  $DL_{50}$  del veneno de *Thalassophryne maculosa* teñido con hematoxilina-eosina a 4x.



**Figura 20.** Corte longitudinal de tejido pulmonar de ratón C57BL/6 inyectado con una  $DL_{50}$  del veneno de *Thalassophryne maculosa* teñido con hematoxilina-eosina a 4x.



**Figura 21.** Corte transversal de tejido pulmonar de ratón C57BL/6 inyectado con una  $DL_{50}$  del veneno de *Thalassophryne maculosa* teñido con hematoxilina-eosina a 4x.



**Figura 22.** Corte transversal de tejido pulmonar de ratón C57BL/6 inyectado con una  $DL_{50}$  del veneno de *Thalassophryne maculosa* teñido con hematoxilina-eosina a 10x.

## Discusión

Según Fonseca y Lopes-Ferreira (2000), las manos o los pies son las zonas más comúnmente afectadas en las víctimas cuando son traspasados por espinas conectadas a glándulas venenosas del pez. Los síntomas de envenenamiento son muy evidentes, incluyendo edema local, eritema y dolor severo seguido por una intensa necrosis y una respuesta de curación notablemente ineficiente. Este problema de la curación ineficiente es muy importante para la evolución y el tratamiento del accidente, tomando en cuenta que no existe un tratamiento específico disponible para esta afección (Lopes-Ferreira y col., 2000; Haddad Junior y col., 2003). De acuerdo con esto, el avance de los síntomas, puede tomar semanas o incluso meses para una recuperación completa (Fonseca y Lopes-Ferreira 2000).

El modelo de ratón utilizado en este trabajo fue la cepa C57BL/6, ya que posee mayor sensibilidad a la acción del veneno de vertebrados e invertebrados (De Sousa y col., 2009, 2010; De Sousa, 2011).

Se evidencia ausencia de actividad antimicrobiana *in vitro* del veneno de *T. maculosa*; al igual que en los extractos acuosos obtenidos de otras especies marinas como el invertebrado, pepino de mar, *Brandothuria impatiens* (Echinodermata, Holothuroidea) (Hernández y Fariñas, 2005). En futuras investigaciones debería probarse la actividad del veneno o sus toxinas sobre otros microorganismos patógenos como hongos o protozoarios.

La actividad proteolítica observada en el veneno de *T. maculosa*, también se ha evidenciado en otros peces como *Notesthes robusta* (Hahn y O'Connor, 2000), *Scorpaena plumieri* (Carrizo y col., 2005), *Pterios volitans* (Balasubashini y col., 2006) y en las rayas *Potamotrygon* cf. *scobina* y *Potamotrygon* gr. *orbignyi*. En todos

estos vertebrados marinos tal actividad ha sido relativamente leve; sin embargo, se ha demostrado que la interacción del veneno con el mucus epidérmico, incrementa significativamente la actividad necrosante, lo que pudiera indicar que las proteínas presentes en el mucus, potencian el efecto tóxico del veneno (Magalhães y col., 2006).

Al igual que otras especies del género *Thalassophryne*, como *T. nattereri*, se puede evidenciar actividad hemolítica leve (López y col., 1998). Otros organismos marino que también poseen actividad hemolítica sus secreciones, como parte de su mecanismo de defensa, son las esponjas *Niphates erecta* (Porifera, Demospongiae), cuya actividad lítica se debe a la presencia tanto de saponinas como de hemolisinas (López y col., 2011), quedando por dilucidar el agente responsable de dicha actividad en el veneno de *T. maculosa*.

En este estudio, los ratones C57BL/6 inyectados con una DL<sub>50</sub> del veneno de *T. maculosa*, mostraron diversos cambios histopatológicos en el tejido cardiopulmonar en comparación con los controles. Las alteraciones fueron más evidentes en algunos de los componentes celulares y en la arquitectura general del tejido.

Lopes-Ferreira y colaboradores (1998, 2001), observaron que el veneno de *T. nattereri* induce daño directo a la membrana plasmática del músculo esquelético con trombosis y otras alteraciones en la microvasculatura de los ratones, sin inducir hemorragia. Los análisis del músculo cremáster mostraron que el veneno provoca una alteración peculiar de la microcirculación con congestión vascular intensa, trombosis en las vénulas y constricciones transitorias focales en las arteriolas. En contraste con otros modelos de mionecrosis, en el que la microvasculatura no se ve afectada, la fagocitosis de material necrótico está muy avanzada a las 24 h, y no se observan restos de células musculares necróticas después de 1 semana (Harris y col., 1975; Gutiérrez y col., 1991; Morini y col., 1998)

Lopes-Ferreira y colaboradores. (2001) realizaron el análisis histológico de la lesión causada por el veneno de *T. nattereri*. Demostraron la presencia de edema, mionecrosis, hiperemia y congestión en las venas y vénulas, presencia de trombos, además de poco infiltrado celular inflamatorio; también señalaron alteraciones de la membrana plasmática y prominente desorganización miofibrilar, incluyendo la desaparición de la línea Z en el músculo gastrocnemio.

Los cambios histológicos a nivel cardiovascular en ratones de la cepa C57BL/6 se han estudiado con el veneno de otras especies de vertebrados e invertebrados. Albornoz y colaboradores. (2008) demostraron en los ratones C57BL/6, inyectados con una  $DL_{50}$  del veneno del escorpión *Tityus nororientalis*, cambios en la estructura microscópica del miocardio, con amplias áreas de tejido cardíaco sustituidas por sincitio tisular con ausencia total de elementos histológicos compatibles con la normalidad del mismo. Por su parte, Laucho y López (2011), con una  $DL_{50}$  del veneno de *Tityus nororientalis*, observaron alteraciones histológicas en tejido pulmonar de ratones NMRI, BALBc y C57BL/6. Los ratones de la cepa NMRI desarrollaron alteraciones histológicas del tejido pulmonar, que consistieron en dilatación vascular con leve infiltrado inflamatorio perivascular, leve congestión bronquiolar, escaso infiltrado intraalveolar y ligero engrosamiento de la pared alveolar.

Es importante resaltar que estos cambios histológicos son totalmente diferentes a los evidenciados con el veneno de *T. maculosa*, indicando que este posee en apariencia un mecanismo de acción tisular diferente a estos invertebrados.

## **CAPÍTULO V**

### **CONCLUSIONES**

1. El veneno de *Thalassophryne maculosa* no presenta actividad antimicrobiana sobre las 12 cepas de bacterias evaluadas (Gram negativas o positivas).
2. El veneno crudo de *T. maculosa* presento actividad hemolítica y proteolítica expresada en la placa radiológica hasta una dilución de 1:64.
3. Se observaron ocho manifestaciones clínicas inducidas por el veneno de *T. maculosa* en ratones C57BL/6; con aparición gradual en el curso temporal de toxicidad aguda. Los signos inmediatos de toxicidad aguda fueron hiperactividad seguida de taquipnea, entre 10 y 20 minutos se evidenció hipoactividad, distensión abdominal; posteriormente signos de toxicidad grave caracterizados por bradipnea alternada con apnea hasta finalmente la muerte de los animales.
4. En el tejido cardiaco de los ratones C57BL/6 inyectados con una DL<sub>50</sub> del veneno de *T. maculosa*, los cambios histológicos más significativos fueron infiltrado inflamatorio neutrofílico (agudo) intepretado como miocarditis hemorrágica. Degeneración y acúmulo de material hialino en el intersticio intermiofibrilar y pericarditis fibrinosa
5. En tejido pulmonar de los ratones C57BL/6 inyectados con una DL<sub>50</sub> de veneno *T. maculosa* los cambios histológicos más significativos fueron edema y hemorragia intraalveolar, intersticial con la formación de membrana hialina que conlleva a síndrome de dificultad respiratoria aguda, sacos alveolares distendidos con ruptura de tabiques alveolares y formación de enfisema pulmonar y áreas de colapso alveolar (focos de atelectasia).

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Albornoz, E.; Cedeño, O. y Pereira, M. 2008. Cambios histopatológicos agudos causados por el veneno de *Tityus nororientalis* (Scorpiones: Buthidae) en miocardio de ratones NMRI, BALBc y C57BL/6. Trabajo de Grado, Escuela de Ciencias de la Salud, Núcleo de Anzoátegui, Universidad de Oriente, Barcelona.
- Alcalá O., Mendoza G., Navarro N. 2010. Actividad biológica in vitro y dosis letal cincuenta del veneno de *Thalassophryne maculosa* (Pisces, Batrachoididae). Trabajo de Grado, Escuela de Ciencias de la Salud, Núcleo de Anzoátegui, Universidad de Oriente, Barcelona.
- Balasubashini M., Karthigayan S, Somasundaram ST. Balasubramanian T, Viswanathan P, Menon .VP. 2006. *In vivo* and *in vitro* characterization of the biochemical and pathological changes induced by lionfish *Pterios volitans* venom in mice. *Toxicology Mechanisms and Methods*, 16(9): 525-531
- Bauer A., Kirby J. 1966. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *American Journal of Clinical Pathology*. 45:493-496.
- Boccalon Y., Gamero D., Romero D. 2004. Antecedentes de envenenamientos por especies marinas en los pescadores de las costas del estado Anzoátegui, y playas aledañas de Sucre, julio-diciembre de 2003. Trabajo de Grado, Escuela de Medicina, Núcleo de Anzoátegui, Universidad de Oriente, Barcelona.

- Carrijo L., Andrich F., De Lima M., Cordeiro M., Richardson M., Figueredo S. 2005. Biological properties of the venom from the scorpionfish (*Scorpaena plumieri*) and purification of a gelatinolytic protease. *Toxicon*, 45: 843-850.
- De Sousa L. 2011. Mapa de toxicidad del veneno de algunos escorpiones (Buthidae, Chactidae) del nororiente venezolano. Trabajo de Ascenso a Profesor Titular. Escuela de Ciencias de la Salud, Núcleo de Anzoátegui, Universidad de Oriente, Barcelona.
- De Sousa L., Parrilla-Álvarez P., Pérez Di Gaeta P., Romero L., Quiroga M. 2009. Evaluación de la actividad biológica del veneno de *Tityus gonzalespongai* (Scorpiones, Buthidae) en el modelo C57BL/6. *Saber*, 21:50-62.
- De Sousa L., Borges A., Vásquez-Suárez A., Op den Camp H., Chadee-Burgos R., Romero-Bellorín M., De Sousa-Insana L., Pino-García O. 2010. Differences in venom toxicity and antigenicity between females and males of the scorpion *Tityus nororientalis* (Buthidae). *Journal of Venom Research*, 1: 61-70.
- Dixon W., Mood A. 1948. A method for obtaining and analyzing sensitivity data. *Journal of the American Statistical Association*, 43:109-126.
- Fry B., Roelants K., Champagne D., Scheib H., Tyndall J, King G., Nevalainen T., Norman J., Lewis R, Norton R, Renjifo C., Rodríguez de la Vega R. 2009. The toxicogenomic multiverse: Convergent recruitment of proteins into animal venoms. *Annual Review of Genomics and Human Genetics*, 10: 483-511
- Goudey-Perrière F., Perrière C. 1998. Pharmacological properties of fish venoms. *C. R. Seances Soc Biol Fil.*, 192: 503-48

- Gutiérrez J., Benítez-Guerra I., Benítez-Guerra G. 2004. Envenenamiento por rayas de agua dulce. *Revista de la Facultad de Medicina*, 27: 131-134.
- Haddad Junior V. 2003. Animais aquáticos de importância médica no Brasil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 36(5): 591-597.
- Haddad Junior V., Pardal P., Cardoso JL., Martins I. 2003. The venomous toadfish *Thalassophryne nattereri* (Niquim or Miquim): Report of 43 injuries provoked in fishermen os Salinópolis (Pará State) and Aracaju (Sergipe State), Brazil. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 45(4): 221-223.
- Hernández G., Fariñas M. 2005. Propiedades biológicas de extractos acuosos de órganos de Cuvier, piel y músculo de *Brandothuria impatiens* (Forsk., 1776) (Echinodermata: Holothuroidea). *Saber*, 17:118-124.
- Hodgson W. 1997. Pharmacological action of Australian animal venoms. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, 24: 10-17
- Huang SY., Pérez JC. 1980. Comparative study on hemorrhagic and proteolytic activities of snake venoms. *Toxicon*, 18: 421-426.
- Junghanss T., Bodio M. 2006. Medically important venomous animals: Biology, prevention, first aid, and clinical management. *Clinical Infectious Diseases*, 43:1309-1317
- Laucho J., López R. 2011. Cambios histológicos agudos causados por el veneno de *Tityus nororientalis* (Scorpiones, Buthidae) en pulmones de ratones NMRI, BALBc y C57BL/6. Trabajo de Grado, Escuela de Ciencias de la Salud, Núcleo de Anzoátegui, Universidad de Oriente, Barcelona.

- Lima LA., Ferreira M. 2000. Estudos clínico e experimental sobre o envenenamento causado pelo peixe *Thalassophryne nattereri* (niquim). Investigação clínica, laboratorial e terapéutica clínica. Anais Brasileiros de Dermatologia, 75(4): 435-443.
- Lopes-Ferreira M., Moura-da-Silva AM, Piran-Soares AA, Angulo Y., Lomonte B, Gutiérrez JM., Farsky S. 2002. Hemostatic effects induced by *Thalassophryne nattereri* fish venom: a model of endothelium-mediated blood flow impairment. Toxicon, 40(8): 1141-1147
- López L., Fariñas M., Amaro M. 2011. Evaluación de la actividad hemaglutinante y hemolítica de las esponjas marinas *Niphates erecta* (Duchassaing y Michelotti, 1864) y *Callyspongia vaginalis* (Lamarck, 1814). Saber, 23:113-119.
- Loyo J., Lugo L., Cazorla D., Acosta ME. 2008. Envenenamiento por pez escorpión (*Scorpaena plumieri*) en una comunidad pesquera y turística de la Península de Paraguaná, estado Falcón, Venezuela: Aspectos clínicos, epidemiológicos y tratamiento. Investigación Clínica, 49(3):299-307.
- Magalhães KW, Lima C, Piran-Soares AA, Marques E, Hiruma-Lima C, Lopes-Ferreira M. 2006. Biological and biochemical properties of the Brazilian *Potamotrygon stingrays*: *Potamotrygon cf. scobina* and *Potamotrygon gr. orbigny*. Toxicon 47: 575-583
- Machado-Allison A., Rodríguez-Acosta A. 1997. Animales venenosos y ponzo osos de Venezuela. Caracas: Editora LITOPAR, CDCH, Universidad Central de Venezuela; p 45-111.

Sevcik C. 1987.  $DL_{50}$  determinations: Objections to the method of Beccari as modified by Molinengo. *Toxicon*, 25:779-783.

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

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

<b>Título</b>	<b>ACTIVIDAD BIOLÓGICA <i>IN VITRO</i> E <i>IN VIVO</i> DEL VENENO DE <i>Thalassophryne maculosa</i> (PISCES, BATRACHOIDIDAE)</b>
<b>Subtítulo</b>	

### Autor(es):

<b>Apellidos y Nombres</b>	<b>Código CVLAC / e-mail</b>	
González Romero, Carlos Andrés	<b>CVLAC</b>	19.346.722
	<b>e-mail</b>	cargonzalez_26_08@hotmail.com
Sulbaran Castillo, Xiomara del Valle	<b>CVLAC</b>	18.786.360
	<b>e-mail</b>	xiocass@hotmail.com
Surga Tovar, Félix José	<b>CVLAC</b>	18.905.640
	<b>e-mail</b>	fjst007@hotmail.com

### Palabras o frases claves:

*Thalassophryne maculosa*, toxicología, veneno, toxicidad aguda, histopatología, tejido cardio-pulmonar, hemólisis, ratones C57BL/6

## HOJA DE METADATOS PARA TESIS Y TRABAJOS DE ASCENSO – 2/5

### Líneas y sublíneas de investigación:

Área	Subárea
Escuela de Ciencias de la Salud	Medicina
	Farmacología
	Toxinología

### Resumen (abstract):

Ejemplares del pez sapo *Thalassophryne maculosa* fueron capturados en aguas someras del Parque Nacional La Restinga, estado Nueva Esparta, Venezuela. El veneno se obtuvo por ordeño manual de las espinas dorsales y operculares. La actividad proteolítica se determinó por digestión de gelatinasa en placa radiográfica, la hemolítica en placas de agar sangre y la antibacteriana por el método de difusión en discos, utilizando cepas Gram negativas y positivas, certificadas. La  $DL_{50}$  del veneno, para una hora de experimentación, fue determinada por el método secuencial de Dixon y Mood. Se escogió al azar, cuatro ratones hembra de la cepa C57BL/6. Se administró por vía intraperitoneal una  $DL_{50}$  de veneno de *Thalassophryne maculosa* equivalente a  $70,8 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  de ratón. Luego fueron evaluados durante sesenta minutos, obteniendo una frecuencia de sobrevivencia de 50% ( $n = 2$ ). El veneno de *Thalassophryne maculosa* no presenta actividad antimicrobiana sobre 12 cepas de bacterias tanto Gram negativas como positivas, pero sí posee actividad hemolítica expresada en la placa de agar sangre y proteolítica en la placa radiográfica evidenciada hasta una dilución de 1:64. Luego de la administración de una  $DL_{50}$  del veneno, equivalente a  $70,80 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  de ratón, se observaron ocho manifestaciones clínicas inducidas por el veneno de *Thalassophryne maculosa* en ratones C57BL/6, con aparición gradual en el curso temporal de toxicidad aguda. Los signos inmediatos de toxicidad aguda fueron hiperactividad seguida de taquipnea, entre 10 y 20 minutos se evidenció hipoactividad, distensión abdominal; posteriormente signos de toxicidad grave caracterizados por bradipnea alternada con apnea hasta finalmente la muerte de los animales. En el tejido cardíaco de los ratones C57BL/6 inyectados con una  $DL_{50}$  del veneno de *Thalassophryne maculosa* los cambios histológicos más significativos fueron infiltrado inflamatorio neutrofilico (agudo) interpretado como miocarditis hemorrágica, degeneración y acúmulo de material hialino en el intersticio intermiofibrilar y pericarditis fibrinosa. En tejido pulmonar los cambios histológicos más significativos fueron edema y hemorragia intraalveolar, intersticial con la formación de membrana hialina, que conlleva a síndrome de dificultad respiratoria aguda, sacos alveolares distendidos con ruptura de tabiques alveolares y formación de enfisema pulmonar y áreas de colapso alveolar (focos de atelectasia).

## HOJA DE METADATOS PARA TESIS Y TRABAJOS DE ASCENSO – 3/5

### Contribuidores:

Apellidos y Nombres	ROL / Código CVLAC / e-mail	
Irene Rodríguez	ROL	CA <input type="checkbox"/> AS <input type="checkbox"/> TU <input type="checkbox"/> JU <input checked="" type="checkbox"/>
	CVLAC	8.318.941
	e-mail	irelab_bna@hotmail.com
Mercedes Matos Pérez	ROL	CA <input type="checkbox"/> AS <input type="checkbox"/> TU <input type="checkbox"/> JU <input checked="" type="checkbox"/>
	CVLAC	8.032.140
	e-mail	mmatosb@cantv.net
Aleikar José Vásquez-Suárez	ROL	CA <input type="checkbox"/> AS <input type="checkbox"/> TU <input checked="" type="checkbox"/> JU <input type="checkbox"/>
	CVLAC	12.672.563
	e-mail	valeikar@yahoo.es
Leonardo De Sousa	ROL	CA <input type="checkbox"/> AS <input type="checkbox"/> TU <input checked="" type="checkbox"/> JU <input type="checkbox"/>
	CVLAC	14.214.493
	e-mail	leonardodesousa@yahoo.com

### Fecha de discusión y aprobación:

Año	Mes	Día
2013	06	21

**Lenguaje:** SPA: X

**HOJA DE METADATOS PARA TESIS Y TRABAJOS DE ASCENSO – 4/5****Archivo(s):**

<b>Nombre de archivo</b>	<b>Tipo MIME</b>
sistemanerviosocentral.tityus.doc	Application/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 Farmacología, Toxinología  
Departamento de Ciencias Fisiológicas

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

Universidad de Oriente, Núcleo de Anzoátegui

## HOJA DE METADATOS PARA TESIS Y TRABAJOS DE ASCENSO – 5/5

### 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 para otros fines con el consentimiento del Consejo de Núcleo respectivo, quien deberá participarlo previamente al Consejo Universitario, para su autorización”.

Carlos Andrés González Romero	Xiomara del Valle Sulbaran Castillo	Félix José Surga Tovar	
<b>AUTOR</b>	<b>AUTOR</b>	<b>AUTOR</b>	
Aleikar Vásquez Suárez	Leonardo De Sousa	Irene Rodríguez	Mercedes Matos Pérez
<b>TUTOR</b>	<b>TUTOR</b>	<b>JURADO</b>	<b>JURADO</b>

---

Profa. Rosibel Villegas

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

**POR LA SUBCOMISIÓN DE TESIS**