



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

**VARIABILIDAD GEOGRÁFICA INTRAESPECÍFICA DE LA TOXICIDAD
DEL VENENO DE *Bothrops colombiensis* (SERPENTES, VIPERIDAE) EN
VENEZUELA**

Asesor:

Adolfo Borges

Co-asesor:

Demetrio Kiriakos

Trabajo de Grado presentado por:

Ruiz Chopite, Carolina de los Ángeles.

Ruiz Chopite, Carolina del Carmen.

Como requisito parcial para optar al título de **Médico Cirujano**

Barcelona, Junio 2009

DEDICATORIA

A Dios por darme la luz para perseverar en un camino oscuro, lleno de obstáculos, evitando mis tropiezos, y ayudándome a levantarme cada vez que cayera. Por darme una familia unida que me brindara el apoyo constante para centrarme en mí meta y poner en mi camino personas que me enseñaron y ayudaron tanto como el Dr. Demetrio Kiriakos y el Dr. Leonardo De Sousa.

A mi madre Carolina, quien fue el ejemplo a seguir en esta profesión, que siempre me ayudo a mantenerme firme en mi resolución de ser médico cirujano, y que me ayudo a recordarme porque elegí esto y que si tenía las herramientas para hacerlo. Te amo mama.

A mi padre Nerio, que no solo me enseñó que no importa el lugar donde naciste o creciste si tienes tus metas claras, con trabajo honesto y duro, todo lo que quieras en la vida lo puedes conseguir. Por ser mi consejero, mi apoyo, mi profesor, mi chofer, mi banquero, mi abogado y mi defensor siempre. Gracias Papi, Te amo.

A mis abuelos Carlos, Carmen, Simona que siempre orgullosos de su nieta me recordaron que si podía hacer esto y me acompañaron en sus oraciones y en sus plegarias toda la carrera. A ti abuelito Antonio que se que aun desde el cielo sé que me acompañas.

A mis hermanos Von, Deysner, Yesicca, Carolina del Cielo y Nerio, que incansablemente me dieron ánimos; ayudándome a reír, y sirviéndome de pañito de lagrimas y en momentos más necesitados sirvieron de admiradores número uno, los amo.

A ti Carolina del Carmen, “mi alma gemela”, mi compañera de vida, de escuela, de cuarto, de carrera, de tesis, de entrenadora y psicóloga, lo fuiste todo. Sin ti mi vida, ni esta tesis hubiesen sido posibles. Te amo hermana.

A mis amigas desde que tengo consciencia: Karina, Corina, Valentina, Sabrina y Daniela. A mis amigas de toda la universidad: Fanny, Monique, María Alejandra y Alma y otros muchos cuyos nombres no cupieran en esta página, que fueron como mi familia y que sin haberlos conocido mi vida no hubiese sido lo mismo. A ti Jesús por ser mi apoyo en estos casi 3 años, aguantándote mi llanto y ayudándome a encontrar amor y felicidad entre tanta tristeza que se ve en esta profesión A todos ustedes GRACIAS.

Carolina de los Ángeles Ruiz Chópite

DEDICATORIA

Primero que nada a la Santísima Trinidad y la Virgen del Carmen por haberme permitido estudiar esta carrera, iluminarme y consolarme en los momentos más difíciles, y sentir su presencia siempre.

A mis padres, por educarme con amor al trabajo, constancia y con su ejemplo, para ser de mí una mejor persona, enseñándome siempre que la felicidad se encuentra con el esfuerzo y la satisfacción que te producen vencer los obstáculos en el camino.

A mi hermana gemela, por su apoyo incondicional en todo momento, la compañía que me brinda desde el vientre materno y por enseñarme que el amor es perdón, servicio y comprensión. Te quiero Mucho Herma.

A mis hermanos Nerio Antonio, Carolina del Cielo, Deysner, Yessica y Von, por darme la alegría que necesitaba, y por motivarme siempre a seguir adelante.

A mi abuelos Carmen, Carlos, Simona y Antonio, por el cariño que recibí de ellos desde el nacimiento, y por estar allí para correr conmigo en cualquier situación, y porque desde el cielo se que intercede por nosotros.

A mis amigas de la consolación, especialmente María Corina, que aun y después de varios años de graduadas, somos como hermanas, y están dispuestas a apoyarme en cada paso de mi vida.

A mis amigas de la universidad, especialmente Fanny Cecilia, por quererme tanto y aguantarme toda la carrera, aun y con todos los defectos que pudiera tener, ser

sincera, inteligentes, humilde, cariñosa y defenderme a “capa y espada”. Te Quiero Ceci.

Gracias a Todas y cada una de la personas que me encontré en el camino, y que fortalecieron mis espíritu, de una u otra manera.

Con mucho Cariño, Carolina del Carmen Ruiz Chopite

AGRADECIMIENTOS

A nuestros asesores, Dr. Demetrio Kiriakos y Dr. Adolfo Borges y Dr. De Sousa por regalarnos su tiempo y sus amplios conocimientos para la elaboración de esta tesis.

A la Universidad de Oriente por ser nuestra casa de estudios y permitirnos desarrollarnos como profesionales y como personas.

Al Centro de Investigaciones Técnicas de Oriente (CITO), particularmente al Centro de Investigaciones en Ciencias de la Salud (CICS) por permitirnos usar sus instalaciones, su tiempo y estar siempre dispuestos a ayudarnos.

Al Dr. Parrilla, de la Universidad de Oriente, Núcleo Bolívar, por la liofilización de los venenos, permitiéndonos así el uso y conservación de éstos.

Al Serpentario de la Universidad de Oriente, por facilitarnos el material biológico para los experimentos, con mucha disposición y de forma gratuita.

Carolina de los Ángeles Ruiz Chopite y Carolina del Carmen Ruiz Chopite

ÍNDICE

DEDICATORIA	ii
DEDICATORIA	iv
AGRADECIMIENTOS	vi
ÍNDICE	vii
LISTA DE TABLAS	ix
LISTA DE FIGURAS	xii
RESUMEN.....	xiv
INTRODUCCIÓN	15
CAPITULO I: EL PROBLEMA.....	23
1.1 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	23
1.2 OBJETIVOS	25
1.2.1 GENERAL	25
1.2.2 ESPECIFICOS	25
1.3 JUSTIFICACION	26
CAPITULO II: MARCO TEORICO	27
2.1 SERPIENTES	27
2.2 FAMILIAS DE SERPIENTES	27
2.3 FAMILIA VIPERIDAE	27
2.4 VENENOS DE SERPIENTES	29
CAPITULO III: MARCO METODOLOGICO	34
3.1 TIPO DE INVESTIGACIÓN	34
3.2 VARIABLES	34
3.2.1 Independientes.....	34
3.2.2 Dependientes	34
3.3 MATERIALES	34
3.4 PROCEDIMIENTO	35
3.4.1 Extracción del veneno.....	35

3.4.2 Determinación de la dosis letal.....	36
3.5 PROCESAMIENTO DE LOS DATOS.....	37
CAPITULO IV: ANALISIS Y PRESENTACION DE RESULTADOS.....	39
4.1 Bothrops colombiensis de Yaracuy.....	39
4.2 Bothrops colombiensis de ARAIRA.....	46
4.3 Bothrops colombiensis de BARLOVENTO.....	54
4.4 Bothrops colombiensis de BARINAS.....	62
4.5 “POOL” DE TODOS LOS EJEMPLARES ESTUDIADOS.....	69
4.6 COMPARACIONES ENTRE EJEMPLARES DE <i>Bothrops colombiensis</i> PROVENIENTES DE YARACUY, ARAIRA, BARLOVENTO, BARINAS Y “POOL”.....	78
4.7 COMPARACIÓN DEL EFECTO PROCOAGULANTE DEL VENENO DE <i>bothrops colombiensis</i> PROVENIENTE DE 4 REGIONES DE VENEZUELA...	83
4.8 COMPARACIÓN DEL EFECTO PROTEOLÍTICO DEL VENENO DE bothrops colombiensis PROVENIENTE DE 4 REGIONES DE VENEZUELA...	86
4.9 DISCUSIÓN.....	88
CAPITULO V: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	93
5.1 CONCLUSIONES.....	93
5.2 RECOMENDACIONES.....	94
BIBLIOGRAFÍA.....	95
ANEXOS.....	102
APÉNDICE.....	106
METADATOS PARA TRABAJOS DE GRADO, TESIS Y ASCENSO:.....	1

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. DATOS PARA EL CÁLCULO DE LA DL ₅₀ DEL VENENO DE <i>Bothrops colombiensis</i> DE YARACUY EN RATONES C57BL/6 (♀). VIP. 60MINUTOS	16
Tabla 2. FRECUENCIA DE MUERTE Y SECUENCIA DE DOSIS, DEL VENENO DE <i>Bothrops colombiensis</i> DE YARACUY EN RATONES C57BL/6 (♀).VIP. 60MINUTOS	17
Tabla 3. MANIFESTACIONES DE TOXICIDAD AGUDA EXPERIMENTAL INDUCIDAS POR EL VENENO DE <i>Bothrops colombiensis</i> DE YARACUY EN RATONES C57BL/6 (♀).VIP. 60MINUTOS	19
Tabla 4. DATOS PARA EL CÁLCULO DE LA DL ₅₀ DEL VENENO DE <i>Bothrops colombiensis</i> DE ARAIRA, MIRANDA, EN RATONES C57BL/6 (♀). VIP. 60MINUTOS	21
Tabla 5. FRECUENCIA DE MUERTE Y SECUENCIA DE DOSIS, DEL VENENO DE <i>Bothrops colombiensis</i> DE ARAIRA, MIRANDA, EN RATONES C57BL/6 (♀). VIP. 60MINUTOS	22
Tabla 6. FRECUENCIA DE MANIFESTACIONES DE TOXICIDAD AGUDA EXPERIMENTAL INDUCIDAS POR EL VENENO DE <i>Bothrops colombiensis</i> DE ARAIRA EN RATONES C57BL/6 (♀), VIP. 60 MINUTOS	24
Tabla 7. DATOS PARA EL CÁLCULO DE LA DL ₅₀ DEL VENENO DE <i>Bothrops colombiensis</i> DE BARLOVENTO, MIRANDA, EN RATONES	26

C57BL/6. VIP. 60MINUTOS	
Tabla 8. FRECUENCIA DE MUERTE Y SECUENCIA DE DOSIS DEL VENENO DE <i>Bothrops colombiensis</i> DE BARLOVENTO, MIRANDA, EN RATONES C57BL/6 (♀), VIP. 60MINUTOS.	28
Tabla 9. FRECUENCIA DE MANIFESTACIONES CLÍNICAS DE TOXICIDAD AGUDA EXPERIMENTAL INDUCIDAS POR EL VENENO DE <i>Bothrops colombiensis</i> DE BARLOVENTO EN RATONES C57BL/6 (♀), VIP. 60 MINUTOS.	30
Tabla 10. DATOS PARA EL CÁLCULO DE LA DL ₅₀ DEL VENENO DE <i>Bothrops colombiensis</i> DE BARINAS EN RATONES C57BL/6 (♀), VIP. 60 MINUTOS.	31
Tabla 11. FRECUENCIA DE MUERTE Y SECUENCIA DE DOSIS DEL VENENO DE <i>Bothrops colombiensis</i> DE BARINAS EN RATONES C57BL/6 (♀), VIP. 60 MINUTOS.	32
Tabla 12. FRECUENCIA DE MANIFESTACIONES CLÍNICAS DE TOXICIDAD AGUDA EXPERIMENTAL INDUCIDAS POR EL VENENO DE <i>Bothrops colombiensis</i> DE BARINAS EN RATONES C57BL/6 (♀), VIP. 60 MINUTOS.	34
Tabla 13. DATOS PARA EL CÁLCULO DE LA DL ₅₀ DEL “POOL” DE VENENOS DE <i>Bothrops colombiensis</i> EN RATONES C57BL/6 (♀), VIP. 60 MINUTOS.	36
Tabla 14. FRECUENCIA DE MUERTE Y SECUENCIA DE DOSIS DEL “POOL” DE VENENOS DE <i>Bothrops colombiensis</i> EN RATONES C57BL/6 (♀). VIP. 60MINUTOS.	37

TABLA 15. COMPARACIÓN DE LAS DOSIS LETALES CINCUENTA (DL50) DE LOS VENENOS DE EJEMPLARES DE <i>Bothrops colombiensis</i> DE VARIAS REGIONES DE VENEZUELA.	41
TABLA 16. COMPARACIÓN DE LAS DOSIS LETALES CINCUENTA (DL50) DE LOS VENENOS DE EJEMPLARES DE <i>Bothrops colombiensis</i> DE VARIAS REGIONES DE VENEZUELA.	43
Tabla 17. TIEMPO PROMEDIO DE APARICIÓN DE LOS SIGNOS INDUCIDOS POR EFECTO DE LA TOXICIDAD AGUDA EXPERIMENTAL DEL VENENO DE <i>Bothrops colombiensis</i> PROVENIENTES DE YARACUY, ARAIRA, BARLOVENTO, BARINAS Y “POOL” EN RATONES C57BL/6 ♀, VIP. 60 MINUTOS.	44
Tabla 18. EFECTO PROCOAGULANTE DEL VENENO DE <i>Bothrops colombiensis</i> PROVENIENTES DE YARACUY, ARAIRA, BARLOVENTO, BARINAS Y “POOL” EN RATONES C57BL/6 (♀) .	45

LISTA DE FIGURAS

Pag.

Figura 1. DETERMINACIÓN DE LA DOSIS LETAL CINCUENTA (DL50) DEL VENENO DE <i>Bothrops colombiensis</i> DE YARACUY EN RATONES C57BL/6 (♀), VIP. 60 MINUTOS.	17
Figura 2. Figura 2. DETERMINACIÓN DE LA DOSIS LETAL CINCUENTA (DL50) DEL VENENO DE <i>Bothrops colombiensis</i> DE ARAIRA, MIRANDA EN RATONES C57BL/6 (♀), VIP. 60 MINUTOS.	23
Figura 3. DETERMINACIÓN DE LA DOSIS LETAL CINCUENTA (DL50) DEL VENENO DE <i>Bothrops colombiensis</i> (BARLOVENTO, MIRANDA) EN RATONES C57BL/6 (♀), VIP. 60 MINUTOS.	28
Figura 4. DETERMINACIÓN DE LA DOSIS LETAL CINCUENTA (DL50) DEL VENENO DE <i>Bothrops colombiensis</i> DE BARINAS EN RATONES C57BL/6 (♀), VIP. 60 MINUTOS.	33
Figura 5. DETERMINACIÓN DE LA DOSIS LETAL CINCUENTA (DL50) DEL “POOL” VENENO DE <i>Bothrops colombiensis</i> EN RATONES C57BL/6 (♀), VIP. 60 MINUTOS.	39
Figura 6. COMPARACIÓN DE LAS DOSIS LETALES CINCUENTA (DL50) DE LOS VENENOS DE EJEMPLARES DE <i>Bothrops colombiensis</i> DE VARIAS REGIONES DE VENEZUELA.	44
Figura 7. MEDIA ARITMETICA DE LOS TIEMPOS DE COAGULACION CON EL VENENO DE <i>BOTHROPS COLOMBIENSIS</i> PROVENIENTES DE YARACUY, ARAIRA, BARLOVENTO, BARINAS Y “POOL” A DIFERENTES DILUCIONES	47
Figura 8. ACTIVIDAD PROTEOLÍTICA DEL VENENO DE <i>Bothrops colombiensis</i> DE Yaracuy y Araira CON DILUCIONES SERIADAS DE VENENO FRESCO.	

Figura 9. MAPA DE LA REPÚBLICA BOLIVARIANA DE VENEZUELA, DONDE SE RESALTAN (EN NARANJA) LOS ESTADOS A LOS QUE PERTENECEN LOS EJEMPLARES ESTUDIADOS

RESUMEN

VARIABILIDAD GEOGRÁFICA INTRAESPECÍFICA DE LA TOXICIDAD DEL VENENO DE *Bothrops colombiensis* (SERPENTES, VIPERIDAE) EN VENEZUELA

Autores: Ruiz C, Carolina de los Ángeles., Ruiz C, Carolina del Carmen., Borges, Adolfo., Kiriakos, Demetrio. **“Variabilidad geográfica intraespecífica de la toxicidad del veneno de *Bothrops colombiensis* (SERPENTES, VIPERIDAE) en Venezuela”**. Universidad de Oriente, Núcleo de Anzoátegui.

Se estudiaron los efectos biológicos y DL_{50} del veneno de ejemplares *Bothrops colombiensis* de distintas zonas geográficas del país en el modelo murido C57BL/6 (♀) inyectados por vía intraperitoneal y para una hora de observación. Se compararon ejemplares adultos femeninos de Barinas, Yaracuy y dos localidades de Miranda (Araira y Barlovento) entre sí y contra un “pool” formado por los cuatro venenos. El veneno más potente fue el procedente de Barinas, seguido por el de Yaracuy, luego el “pool” y finalmente los venenos de Miranda, los cuales, no mostraron diferencia significativa entre los de las dos localidades. La mayor potencia de los venenos se relacionó directamente con un mayor efecto procoagulante del mismo. Las manifestaciones clínicas y el efecto proteolítico fueron similares con todos los venenos. Se concluye que la potencia de los venenos y sus efectos biológicos están directamente relacionados con la procedencia geográfica de *Bothrops colombiensis*.

INTRODUCCIÓN

Hoy en día el envenenamiento ofídico es considerado un importante problema de salud pública en toda América y gran parte del mundo, en virtud del elevado número de casos que se presentan y la gravedad de los mismos (Colimodio y Aguilar, 1993). Se estima que a nivel mundial, cada año más de 2,5 millones de personas son atacadas por serpientes venenosas, resultando alrededor de 120000 muertes en las regiones tropicales de Asia, África y América Latina, aunque solamente son reportadas por la Organización Mundial de la Salud entre 40000 y 50000 muertes al año, afectando principalmente a los trabajadores rurales, sobre todo a campesinos jóvenes que se encuentran en plena actividad productiva (Pirela de las Salas y col, 2006). No obstante las consecuencias del accidente ofídico en estos países han sido subestimadas, nunca verdaderamente registrado en estadísticas de salud y mayormente tratado con metodología inadecuada y procedimientos inefectivos (Rodríguez-Acosta y col, 1998). Venezuela como país tropical, con una herpetofauna importante, no escapa a esta realidad, por otra parte la mayor distribución de serpientes en el mundo se ubica en el suelo tropical y subtropical (Colimodio, 1993)

Las serpientes son vertebrados de cuerpo flexible, alargado y cilíndrico que pertenecen a la clase Reptilia, al orden Squamata y suborden Serpentes (Pérez Ramos, 2000).

Las serpientes se agrupan en 19 familias, de las cuales las familias Viperidae y Elapidae son las más peligrosas. Desde el punto de vista médico es de interés agrupar las serpientes de acuerdo a su peligrosidad, tomando en cuenta su tipo de dentición: Aglifas (sin colmillos para inyección del veneno), Opistoglifas (uno o más pares de colmillos acanalados en la parte posterior del maxilar superior), Proteroglifas (par de colmillos inyectoros, fijos en la parte anterior del maxilar superior) y Solenoglifas

(par de fuertes colmillos, curvados, móviles, retráctiles y protráctiles en la parte anterior del maxilar superior) (Colimodio, 1993). Los Elápidos son Proteroglifas y los Vipéridos son Solenoglifas (Pérez Ramos, 2000).

La familia *Viperidae* se subdivide en tres sub-familias de las cuales, la subfamilia *Crotalinae* es la única existente en el continente Americano. Está representada por serpientes de color opaco que poseen como característica común un órgano termoreceptor o foseta loreal que corresponde a un orificio situado entre las narinas y el ojo de la serpiente. Popularmente son conocidas con el nombre de “cuatro narices” (Rodríguez Acosta, 1998).

Las serpientes venenosas en Venezuela pertenecen a varios géneros. Dentro de la familia *Viperidae* (sub-familia *Crotalinae*) encontramos los géneros *Crotalus*, *Lachesis*, *Bothrops*, *Bothriopsis*, *Bothriechis* y *Porthidium*, mientras que en la familia *Elapidae* se encuentran los géneros *Micrurus* y *Leptomicrurus* (Campbell y Lamar, 2004).

Se considera que en el continente sur-americano las serpientes del género *Bothrops* son las de mayor importancia médica, por el número y la gravedad de los accidentes que provocan (Bolaños, 1984). En Venezuela el 75% de los envenenamientos y reacciones tóxicas causadas por animales venenosos son producidos por serpientes, siendo el género *Bothrops* el que provoca mayor número de accidentes ofídicos seguido por el género *Crotalus* (Colimodio y col, 1993).

El género *Bothrops* está representado por serpientes de hábitos nocturnos (salvo excepciones) y terrícolas o arborícolas, que poseen un veneno hemotóxico y citotóxico. En Venezuela, se conocen hasta el presente, diez especies y subespecies de este género, que son conocidas popularmente como “mapanares”, “macaguas” o “cuatro narices” (Lancini, 1986).

La “macagua” o “mapanare terciopelo” (*B. colombiensis*) es la especie más venenosa que se encuentra en nuestro país; ésta posee un veneno altamente hemotóxico y necrosante. Por otra parte, se trata de una serpiente muy agresiva y de gran rapidez en su ataque, puede llegar a medir hasta 1,80 metros de longitud, lo que le permite a estos ejemplares de gran tamaño la capacidad de almacenar grandes cantidades de veneno capaz de matar a más de una persona (Lancini, 1986).

La especie *Bothrops colombiensis* es la serpiente que causa mayor número de accidentes fatales en nuestro país. La distribución geográfica conocida en Venezuela es norte y centro del país, desde el nivel del mar hasta unos 2 500 m de altura. Tiene hábitos nocturnos y se alimenta de roedores. Es muy prolífica y las hembras pueden tener más de 30 hijuelos en un parto. Esta especie es común en los bosques tropicales de Barlovento, Yaracuy y Falcón; tiende a confundirse fácilmente con las hojas. Posee una cabeza triangular y alargada; ojos grises o amarillentos, con pupilas verticales; cuerpo un poco triangular, cola algo corta y puntiaguda. Rostral apenas visible desde arriba, más alta que ancha y de forma trapezoidal. Algunos ejemplares pueden ser amarillentos. El vientre es de color cremoso y poco o muy manchado de gris o negruzco (Lancini, 1986).

Hallowell (1845) la describió por vez primera como *B. colombiensis*, dudando sin embargo, de su validez ya que creyó era muy similar a *Trigonocephalus lanceolatus* (revisado por Campbell y Lamar, 2004). Sandner-Montilla (1979) consideró *B. colombiensis* como sinónimo de *B. lanceolatus*. Dixon y Soini (1986) la creyeron igual a *B. atrox* y cosa similar consideran Lancini y Kornacker en su libro de 1989. Sin embargo, autores muy connotados creen que ésta es la misma mapanare de centro- América, es decir, *B. Asper* (Campbell y Lamar, 2004). De esta forma, la exacta clasificación de nuestra mapanare mas extendida, sigue siendo incierta. El veneno de las serpientes presenta una composición de sustancias tanto simples como complejas, y cuya producción y características específicas varían entre las

diferentes especies conocidas. La toxicidad del veneno se debe a la presencia de diferentes tipos de proteínas (entre ellas enzimas), y su acción letal es atribuida principalmente a las neurotoxinas (Barraviera, 1994).

Los venenos de serpientes son un complejo de enzimas, toxinas y péptidos muy pequeños donde más del 90% del peso seco del veneno consiste en polipéptidos. Estos venenos son una rica fuente de enzimas (peso molecular 13-150 kDa) que forman un 80-95% del veneno en la familia Viperidae y un 25-70% de los venenos de la familia Elapidae. Las hidrolasas digestivas inducen proquinazas, exo- y endopeptidasas, fosfodiesterasas y fosfolipasas. La hialuronidasa, presente en todos los venenos de serpientes, promueve la extensión de otros componentes del veneno a través de los tejidos (Campbell y Lamar, 2004).

Los venenos de la familia Viperidae contienen diversas actividades enzimáticas como son las fosfolipasas, fosfodiesterasas, fosfomonoesterasas, alfa-aminoacidooxidasas, acetilcolinesterasas, enzimas proteolíticas de la serina-proteinasa y varias clases de metaloproteinasas, arginina-esterasa, 5'-nucleotidasa, hialuronidasa y nucleosidasas NAD-dependientes. No todas las enzimas se encuentran presentes en todos los venenos. Entre los péptidos encontrados están las neurotoxinas presinápticas y post-sinápticas. Los canales de potasio son importantes blancos farmacológicos de algunas neurotoxinas, citotoxinas, miotoxinas, cardiotoxinas y los inhibidores de agregación plaquetaria llamados desintegrinas (Markland, 1998).

Esta variabilidad en los venenos no sólo se encuentra entre las especies de una misma familia, sino que se han evidenciado diferencias intra-específicas entre poblaciones de distintas zonas geográficas. Esto trae como consecuencia, que los venenos de las diferentes especies y entre los individuos de una misma especie, pero

de distintas poblaciones, producen distintos efectos locales y sistémicos, requiriendo un tratamiento clínico distinto para cada caso (Pirela y col, 2006).

En lo que respecta a las actividades hemorrágicas y proteolíticas de serpientes suramericanas, ellas existen casi exclusivamente en los venenos botrópicos y lachésicos. (Rodríguez-Acosta y col, 1998; Monterrey, 2000; Aguilar y col, 2001). La cantidad de veneno inyectado determina la severidad de la lesión, pero en todos los casos de accidente ofídico por *Bothrops* se produce necrosis de los tejidos blandos. Además, la acción proteolítica produce aminas y péptidos vasoactivos, tales como: bradiquinina, histamina y serotonina que causan lesión capilar, lo que se traduce en hemorragias petequiales, hematuria, hematemesis, epistaxis y hemorragias viscerales (Toro y col, 1983).

La actividad de los venenos botrópicos tiene efectos citotóxicos y fibrinolíticos, los cuales producen necrosis y hemorragias en tejido muscular y, por supuesto, en otros tejidos (Gutiérrez y col, 1980).

La fosfolipasa A₂ es una enzima comúnmente encontrada en el veneno de las dos familias de serpientes venenosas. Ésta es extremadamente estable y ha sido aislada de una variedad de venenos como los de serpientes, abejas y escorpiones, también del páncreas de mamíferos. Del veneno de *Bothrops asper* fue aislada una fosfolipasa A₂ básica, miotóxica y con actividad anticoagulante, es una fosfolipasa diferente de las que ya han sido aisladas y es conocida como miotoxina I. Parece ser la primera fosfolipasa miotóxica secuenciada que pierde la neurotoxicidad presináptica (Barraviera, 1994)

Las fosfolipasas atacan los fosfolípidos constituyentes de las membranas celulares, conduciendo a la lisis celular. Este efecto se fundamenta en los componentes: Aspartato 49, enzimáticamente activo y Lisina 49, enzimáticamente

inactiva, conocidas como las miotoxinas botrópicas. Estas igual que la crotamina tienen afinidad por los canales de Na^+ dependientes de voltaje (Campbell y Lamar, 2004).

Los venenos usualmente contienen más de un tipo de proteasas, por lo menos cinco tipos diferentes han sido observados electroforéticamente. El veneno de la familia Crotalinae posee una fuerte actividad proteolítica. Estas enzimas han sido identificadas como serino o metaloproteasas. Estudios comparativos de las propiedades inmunológicas de las metaloproteasas (factores hemorrágicos y proteasas inespecíficas), aisladas de los venenos de *Bothrops jararaca*, *B. nnewiedi* y *B. mojen*, mostraron que los factores hemorrágicos contienen determinantes comunes, mientras que las proteasas son inmunológicamente distintas. Los anti-sueros específicos contra los factores hemorrágicos fueron capaces de neutralizar tanto la actividad hemorrágica de homólogos como la actividad de otros factores hemorrágicos (Barraviera, 1994).

Otra actividad reconocida del veneno de las serpientes es la denominada “trombin-like” o “tipo trombina”. Estas enzimas se encuentran presentes en los venenos de las serpientes de los géneros *Agkistrodon*, *Trimeresurus*, *Crotalus* y *Bothrops*. Las enzimas aisladas de los venenos de las serpientes que poseen actividad tipo trombina poseen la capacidad de actuar sobre la molécula de fibrinógeno encontrada en sangre humana, transformándola directamente en fibrina (Barraviera, 1994).

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

Investigaciones efectuadas en varios países con el veneno del género *Bothrops* (Gutiérrez y col, 1980; Rodríguez-Acosta y col, 1993) han demostrado que causa un efecto local caracterizado por dolor, edema, equimosis, flictenas hemorrágicas y necrosis del tejido muscular y la piel. Los daños mencionados son producidos por algunos componentes del veneno como son las miotoxinas, que afectan a las fibras musculares, las que alteran la microvasculatura local y sistémica, así como otras sustancias que provocan edema con incremento de la presión tisular local (Rodríguez Acosta, 1995).

Investigaciones hechas en ratas con batroxobina (hemorragina presente en el veneno botrópico) mostraron "in vitro" una actividad fibrinolítica y un efecto inhibitorio sobre la agregación plaquetaria. El desarrollo de la coagulopatía o hemorragia fue estudiado 2 horas después de la inyección con batroxobina y se encontró que la sangre era incoagulable con bajos niveles de fibrinógeno. La inyección de la hemorragina produjo daños severos al endotelio vascular, músculo esquelético y hemorragias en los riñones, pulmones e hígado (Kamiguti y col, 1991. Revisado en Rodríguez Acosta, 1995).

En Venezuela son múltiples los estudios que se han realizado para determinar las características de los venenos botrópicos, su potencia medida como dosis letal 50 (DL-50) y efectos biológicos (Rodríguez Acosta y col, 1998; Montilla y col, 1998). En el C.I.C.S. se hicieron experimentos, en los cuales se utilizaron 3 especies de *Crotalus* y uno de *Bothrops*, comparando la toxicidad del veneno en especímenes juveniles y adultos, resultando que los especímenes juveniles tenían mayor efecto tóxico y pro-coagulante, mientras que los especímenes adultos tuvieron un mayor efecto proteolítico (Blanco y Rojas, 2005; Valerio, 2006; Baldi y Chalhoub, 2007; Acosta, Cayamo y Graciani, 2008).

Otro experimento donde se comparó un “pool” de veneno de especímenes adultos de *Bothrops colombiensis* de 4 áreas de Venezuela, con uno de juveniles que venían todos de una misma área geográfica (Barlovento), dio como resultado que ambos tenían un efecto tóxico similar (Astudillo y Bejano, 2008). Se cree que esto sea debió a la variabilidad en la procedencia geográfica de dichos especímenes debido a que es probable que la media de la DL 50 de especímenes adultos de diferentes áreas haya promediado una, similar a la DL 50 de los especímenes juveniles provenientes de la misma área.

CAPITULO I: EL PROBLEMA

1.1 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Las serpientes son vertebrados de cuerpo flexible, alargado y cilíndrico que pertenecen a la clase Reptilia, al orden Squamata y suborden Serpentes (Pérez Ramos, 2000).

Las serpientes se agrupan en 19 familias, de las cuales las familias Viperidae y Elapidae son las más peligrosas. Desde el punto de vista médico es de interés agrupar las serpientes de acuerdo a su peligrosidad, tomando en cuenta su tipo de dentición: Aglifas (sin colmillos para inyección del veneno), Opistoglifas (uno o más pares de colmillos acanalados en la parte posterior del maxilar superior), Proteroglifas (par de colmillos inyectoros, fijos en la parte anterior del maxilar superior) y Solenoglifas (par de fuertes colmillos, curvados, móviles, retráctiles y protráctiles en la parte anterior del maxilar superior) (Colimodio, 1993). Los Elápidos son Proteroglifas y los Vipéridos son Solenoglifas (Pérez Ramos, 2000).

La familia *Viperidae* se subdivide en tres sub-familias de las cuales, la subfamilia *Crotalinae* es la única existente en el continente Americano. Está representada por serpientes de color opaco que poseen como característica común un órgano termoreceptor o foseta loreal que corresponde a un orificio situado entre las narinas y el ojo de la serpiente. Popularmente son conocidas con el nombre de “cuatro narices” (Rodríguez Acosta, 1998).

Las serpientes venenosas en Venezuela pertenecen a varios géneros. Dentro de la familia *Viperidae* (sub-familia *Crotalinae*) encontramos los géneros *Crotalus*, *Lachesis*, *Bothrops*, *Bothriopsis*, *Bothriechis* y *Porthidium*, mientras que en la familia

Elapidae se encuentran los géneros *Micrurus* y *Leptomicrurus* (Campbell y Lamar, 2004).

Por lo anteriormente descrito, se espera con este estudio, comparar la variabilidad de la potencia del veneno de la especie de mapanare (*Bothrops colombiensis*) según su procedencia geográfica, ya que ésta se encuentra ampliamente distribuida en nuestro país.

Considerando lo antes expuesto se plantean las siguientes interrogantes
¿Habrán diferencias en cuanto a la potencia del veneno (dosis letal 50) entre los 4 ejemplares femeninos de *Bothrops colombiensis* de diferentes regiones de Venezuela?
¿Cómo se relaciona la dosis letal 50 con los efectos biológicos particulares del veneno?

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 GENERAL

Determinar la variabilidad geográfica intraespecífica en la toxicidad del veneno de *Bothrops colombiensis*, en el modelo múrdo C57bl/6 hembra.

1.2.2 ESPECIFICOS

1. Calcular las dosis letales 50 (DL-50) del veneno de *Bothrops colombiensis* en el modelo múrdo C57bl/6 hembra por vía intraperitoneal y para una hora de observación.
2. Comparar las DL-50 de cada uno de los 4 ejemplares estudiados entre sí y con un pool formado por el veneno de todos.
3. Determinar el efecto procoagulante sobre plasma humano del veneno de ejemplares de *Bothrops colombiensis* de distintas zonas geográficas del país.
4. Determinar el efecto proteolítico, sobre la gelatina de placas radiográficas veladas, del veneno de ejemplares de *Bothrops colombiensis* de distintas zonas geográficas del país.

1.3 JUSTIFICACION

La finalidad de este proyecto, es comparar la variabilidad de la potencia del veneno de la especie de mapanare (*Bothrops colombiensis*) según su distribución geográfica, ya que ésta se encuentra ampliamente distribuida en nuestro país, y por lo tanto, es de gran importancia clínica y epidemiológica. De esta manera se puede contribuir al mejor entendimiento del accidente ofídico y su consecuente manejo médico apropiado.

CAPITULO II: MARCO TEORICO

2.1 SERPIENTES

Las serpientes son vertebrados de cuerpo flexible, alargado y cilíndrico que pertenecen a la clase Reptilia, al orden Squamata y suborden Serpentes (Pérez Ramos, 2000).

2.2 FAMILIAS DE SERPIENTES

Las serpientes se agrupan en 19 familias, de las cuales las familias Viperidae y Elapidae son las más peligrosas. Desde el punto de vista médico es de interés agrupar las serpientes de acuerdo a su peligrosidad, tomando en cuenta su tipo de dentición: Aglifas (sin colmillos para inyección del veneno), Opistoglifas (uno o más pares de colmillos acanalados en la parte posterior del maxilar superior), Proteroglifas (par de colmillos inyectoros, fijos en la parte anterior del maxilar superior) y Solenoglifas (par de fuertes colmillos, curvados, móviles, retráctiles y protráctiles en la parte anterior del maxilar superior) (Colimodio, 1993). Los Elápidos son Proteroglifas y los Vipéridos son Solenoglifas (Pérez Ramos, 2000).

2.3 FAMILIA VIPERIDAE

La familia *Viperidae* se subdivide en tres sub-familias de las cuales, la subfamilia *Crotalinae* es la única existente en el continente Americano. Está representada por serpientes de color opaco que poseen como característica común un órgano termoreceptor o foseta loreal que corresponde a un orificio situado entre las narinas y el ojo de la serpiente. Popularmente son conocidas con el nombre de “cuatro narices” (Rodríguez Acosta, 1998).

Las serpientes venenosas en Venezuela pertenecen a varios géneros. Dentro de la familia *Viperidae* (sub-familia *Crotalinae*) encontramos los géneros *Crotalus*, *Lachesis*, *Bothrops*, *Bothriopsis*, *Bothriechis* y *Porthidium*, mientras que en la familia *Elapidae* se encuentran los géneros *Micrurus* y *Leptomicrurus* (Campbell y Lamar, 2004).

Se considera que en el continente sur-americano las serpientes del género *Bothrops* son las de mayor importancia médica, por el número y la gravedad de los accidentes que provocan (Bolaños, 1984). En Venezuela el 75% de los envenenamientos y reacciones tóxicas causadas por animales venenosos son producidos por serpientes, siendo el género *Bothrops* el que provoca mayor número de accidentes ofídicos seguido por el género *Crotalus* (Colimodio y col, 1993).

El género *Bothrops* está representado por serpientes de hábitos nocturnos (salvo excepciones) y terrícolas o arborícolas, que poseen un veneno hemotóxico y citotóxico. En Venezuela, se conocen hasta el presente, diez especies y subespecies de este género, que son conocidas popularmente como “mapanares”, “macaguas” o “cuatro narices” (Lancini, 1986).

La “macagua” o “mapanare terciopelo” (*B. colombiensis*) es la especie más venenosa que se encuentra en nuestro país; ésta posee un veneno altamente hemotóxico y necrosante. Por otra parte, se trata de una serpiente muy agresiva y de gran rapidez en su ataque, puede llegar a medir hasta 1,80 metros de longitud, lo que le permite a estos ejemplares de gran tamaño la capacidad de almacenar grandes cantidades de veneno capaz de matar a más de una persona (Lancini, 1986).

La especie *Bothrops colombiensis* es la serpiente que causa mayor número de accidentes fatales en nuestro país. La distribución geográfica conocida en Venezuela

es norte y centro del país, desde el nivel del mar hasta unos 2 500 m de altura. Tiene hábitos nocturnos y se alimenta de roedores. Es muy prolífica y las hembras pueden tener más de 30 hijuelos en un parto. Esta especie es común en los bosques tropicales de Barlovento, Yaracuy y Falcón; tiende a confundirse fácilmente con las hojas. Posee una cabeza triangular y alargada; ojos grises o amarillentos, con pupilas verticales; cuerpo un poco triangular, cola algo corta y puntiaguda. Rostral apenas visible desde arriba, más alta que ancha y de forma trapezoidal. Algunos ejemplares pueden ser amarillentos. El vientre es de color cremoso y poco o muy manchado de gris o negruzco (Lancini, 1986).

Hallowell (1845) la describió por vez primera como *B. colombiensis*, dudando sin embargo, de su validez ya que creyó era muy similar a *Trigonocephalus lanceolatus* (revisado por Campbell y Lamar, 2004). Sandner-Montilla (1979) consideró *B. colombiensis* como sinónimo de *B. lanceolatus*. Dixon y Soini (1986) la creyeron igual a *B. atrox* y cosa similar consideran Lancini y Kornacker en su libro de 1989. Sin embargo, autores muy connotados creen que ésta es la misma mapanare de centro- América, es decir, *B. Asper* (Campbell y Lamar, 2004). De esta forma, la exacta clasificación de nuestra mapanare mas extendida, sigue siendo incierta.

El veneno de las serpientes presenta una composición de sustancias tanto simples como complejas, y cuya producción y características específicas varían entre las diferentes especies conocidas. La toxicidad del veneno se debe a la presencia de diferentes tipos de proteínas (entre ellas enzimas), y su acción letal es atribuida principalmente a las neurotoxinas (Barraviera, 1994).

2.4 VENENOS DE SERPIENTES

Los venenos de serpientes son un complejo de enzimas, toxinas y péptidos muy pequeños donde más del 90% del peso seco del veneno consiste en polipéptidos. Estos venenos son una rica fuente de enzimas (peso molecular 13-150 kDa) que

forman un 80-95% del veneno en la familia Viperidae y un 25-70% de los venenos de la familia Elapidae. Las hidrolasas digestivas inducen proquinasas, exo- y endopeptidasas, fosfodiesterasas y fosfolipasas. La hialuronidasa, presente en todos los venenos de serpientes, promueve la extensión de otros componentes del veneno a través de los tejidos (Campbell y Lamar, 2004).

Los venenos de la familia Viperidae contienen diversas actividades enzimáticas como son las fosfolipasas, fosfodiesterasas, fosfomonoesterasas, alfa-aminoacidooxidasas, acetilcolinesterasas, enzimas proteolíticas de la serina-proteinasa y varias clases de metaloproteinasas, arginina-esterasa, 5'-nucleotidasa, hialuronidasa y nucleosidasas NAD-dependientes. No todas las enzimas se encuentran presentes en todos los venenos. Entre los péptidos encontrados están las neurotoxinas presinápticas y post-sinápticas. Los canales de potasio son importantes blancos farmacológicos de algunas neurotoxinas, citotoxinas, miotoxinas, cardiotoxinas y los inhibidores de agregación plaquetaria llamados desintegrinas (Markland, 1998).

Esta variabilidad en los venenos no sólo se encuentra entre las especies de una misma familia, sino que se han evidenciado diferencias intra-específicas entre poblaciones de distintas zonas geográficas. Esto trae como consecuencia, que los venenos de las diferentes especies y entre los individuos de una misma especie, pero de distintas poblaciones, producen distintos efectos locales y sistémicos, requiriendo un tratamiento clínico distinto para cada caso (Pirela y col, 2006).

En lo que respecta a las actividades hemorrágicas y proteolíticas de serpientes suramericanas, ellas existen casi exclusivamente en los venenos botrópicos y lachésicos. (Rodríguez-Acosta y col, 1998; Monterrey, 2000; Aguilar y col, 2001). La cantidad de veneno inyectado determina la severidad de la lesión, pero en todos los casos de accidente ofídico por *Bothrops* se produce necrosis de los tejidos

blandos. Además, la acción proteolítica produce aminas y péptidos vasoactivos, tales como: bradiquinina, histamina y serotonina que causan lesión capilar, lo que se traduce en hemorragias petequiales, hematuria, hematemesis, epistaxis y hemorragias viscerales (Toro y col, 1983).

La actividad de los venenos botrópicos tiene efectos citotóxicos y fibrinolíticos, los cuales producen necrosis y hemorragias en tejido muscular y, por supuesto, en otros tejidos (Gutiérrez y col, 1980).

La fosfolipasa A₂ es una enzima comúnmente encontrada en el veneno de las dos familias de serpientes venenosas. Ésta es extremadamente estable y ha sido aislada de una variedad de venenos como los de serpientes, abejas y escorpiones, también del páncreas de mamíferos. Del veneno de *Bothrops asper* fue aislada una fosfolipasa A₂ básica, miotóxica y con actividad anticoagulante, es una fosfolipasa diferente de las que ya han sido aisladas y es conocida como miotoxina I. Parece ser la primera fosfolipasa miotóxica secuenciada que pierde la neurotoxicidad presináptica (Barraviera, 1994)

Las fosfolipasas atacan los fosfolípidos constituyentes de las membranas celulares, conduciendo a la lisis celular. Este efecto se fundamenta en los componentes: Aspartato 49, enzimáticamente activo y Lisina 49, enzimáticamente inactiva, conocidas como las miotoxinas botrópicas. Estas igual que la crotamina tienen afinidad por los canales de Na⁺ dependientes de voltaje (Campbell y Lamar, 2004).

Los venenos usualmente contienen más de un tipo de proteasas, por lo menos cinco tipos diferentes han sido observados electroforéticamente. El veneno de la familia Crotalinae posee una fuerte actividad proteolítica. Estas enzimas han sido identificadas como serino o metaloproteasas. Estudios comparativos de las

propiedades inmunológicas de las metaloproteasas (factores hemorrágicos y proteasas inespecíficas), aisladas de los venenos de *Bothrops jararaca*, *B. nnewiedi* y *B. mojen*, mostraron que los factores hemorrágicos contienen determinantes comunes, mientras que las proteasas son inmunológicamente distintas. Los anti-sueros específicos contra los factores hemorrágicos fueron capaces de neutralizar tanto la actividad hemorrágica de homólogos como la actividad de otros factores hemorrágicos (Barraviera, 1994).

Otra actividad reconocida del veneno de las serpientes es la denominada “trombin-like” o “tipo trombina”. Estas enzimas se encuentran presentes en los venenos de las serpientes de los géneros *Agkistrodon*, *Trimeresurus*, *Crotalus* y *Bothrops*. Las enzimas aisladas de los venenos de las serpientes que poseen actividad tipo trombina poseen la capacidad de actuar sobre la molécula de fibrinógeno encontrada en sangre humana, transformándola directamente en fibrina (Barraviera, 1994).

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

Investigaciones efectuadas en varios países con el veneno del género *Bothrops* (Gutiérrez y col, 1980; Rodríguez-Acosta y col, 1993) han demostrado que causa un efecto local caracterizado por dolor, edema, equimosis, flictenas hemorrágicas y necrosis del tejido muscular y la piel. Los daños mencionados son producidos por algunos componentes del veneno como son las miotoxinas, que afectan a las fibras musculares, las que alteran la microvasculatura local y sistémica, así como otras sustancias que provocan edema con incremento de la presión tisular local (Rodríguez Acosta, 1995).

Investigaciones hechas en ratas con batroxobina (hemorragina presente en el veneno botrópico) mostraron "in vitro" una actividad fibrinolítica y un efecto inhibitorio sobre la agregación plaquetaria. El desarrollo de la coagulopatía o hemorragia fue estudiado 2 horas después de la inyección con batroxobina y se encontró que la sangre era incoagulable con bajos niveles de fibrinógeno. La inyección de la hemorragina produjo daños severos al endotelio vascular, músculo esquelético y hemorragias en los riñones, pulmones e hígado (Kamiguti y col, 1991. Revisado en Rodríguez Acosta, 1995).

En Venezuela son múltiples los estudios que se han realizado para determinar las características de los venenos botrópicos, su potencia medida como dosis letal 50 (DL-50) y efectos biológicos (Rodríguez Acosta y col, 1998; Montilla y col, 1998). En el C.I.C.S. se hicieron experimentos, en los cuales se utilizaron 3 especies de *Crotalus* y uno de *Bothrops*, comparando la toxicidad del veneno en especímenes juveniles y adultos, resultando que los especímenes juveniles tenían mayor efecto tóxico y pro-coagulante, mientras que los especímenes adultos tuvieron un mayor efecto proteolítico (Blanco y Rojas, 2005; Valerio, 2006; Baldi y Chalhoub, 2007; Acosta, Cayamo y Graciani, 2008).

Otro experimento donde se comparó un "pool" de veneno de especímenes adultos de *Bothrops colombiensis* de 4 áreas de Venezuela, con uno de juveniles que venían todos de una misma área geográfica (Barlovento), dio como resultado que ambos tenían un efecto tóxico similar (Astudillo y Bejano, 2008). Se cree que esto sea debido a la variabilidad en la procedencia geográfica de dichos especímenes debido a que es probable que la media de la DL 50 de especímenes adultos de diferentes áreas haya promediado una, similar a la DL 50 de los especímenes juveniles provenientes de la misma área.

CAPITULO III: MARCO METODOLOGICO

3.1 TIPO DE INVESTIGACIÓN

La investigación fue de tipo comparativa-investigativa. En el presente trabajo se determinó la DL-50 y manifestaciones clínicas del veneno de varios ejemplares de la especie *Bothrops colombiensis* en el modelo múrido C57bl/6 (♀) por vía intraperitoneal para una hora de observación y se compararon entre sí y con el “pool” de todas ellas.

3.2 VARIABLES

3.2.1 Independientes

- El modelo múrido C57bl/6 hembra
- El veneno de varios ejemplares de *B. colombiensis*.

3.2.2 Dependientes

- La susceptibilidad de este modelo múrido al veneno de los diferentes ejemplares de la especie *Bothrops colombiensis*.
- Los efectos biológicos del veneno.

3.3 MATERIALES

Veneno de 4 ejemplares hembra adultas de la especie *Bothrops colombiensis* provenientes de diferentes regiones del país (Barinas, Yaracuy y 2 localidades de Miranda - Araitha y Barlovento-) y un preparado en forma de “pool” con los venenos de éstas.

Ratones negros hembra de la cepa múrida C57BL/6.

Incubadora Biocasa®, modelo INCOX.116.

Cristalería de laboratorio (microjeringas de 50 microlitros de capacidad, vasos de precipitado, tubos de ensayo, micropipetas graduadas de volumen variable, jeringas de 10 y 20 cc, piceta plástica, microgoteros, tubos Eppendorf®).

Liofilizador Labconco®, modelo Freezone 4.5.

Balanza digital Denver Instrument®, modelo XS-310.D.

Cloroformo.

Centrífuga.

Solución fisiológica.

Baño de maría.

Papel Parafilm®.

Refrigerador marca Whirpool de -20°C.

Gancho para serpientes.

3.4 PROCEDIMIENTO

3.4.1 Extracción del veneno.

El ordeño del veneno de cada uno de los ejemplares de mapanare, se realizó en el serpentario de la Universidad de Oriente, Núcleo de Anzoátegui. Las serpientes se extrajeron de su terrario con un gancho en forma de “S” en la punta. Luego se procedió a tomar el animal con el dedo pulgar en un lado, el índice sobre la cabeza y el dedo medio sujetando el otro lado de la cabeza en forma tal que se imposibilita que la culebra gire y muerda. Se tomó 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 ésta mordiera al plástico naturalmente, mientras que se le realizaron suaves masajes sobre las glándulas productoras de veneno, las cuales se encuentran en la parte postero-lateral de la cabeza, y así dejamos en el recipiente una pequeña cantidad de veneno. Posteriormente el veneno extraído se colocó en tubos de ensayo y refrigerado a -20°C para su uso. El tratamiento inicial consistió en

desecharlo al frío (Liofilizador Labconco®) y antes de su utilización se calculó la concentración de proteínas mediante lectura de absorbancia en espectrofotómetro (Jenway®, modelo 6405 UV/vis) a una longitud de onda de 280 nm, asumiendo que 1 unidad de absorbancia (a esta longitud) representa una concentración de $1\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$. Alícuotas de 200 μL de veneno se almacenaron a -20°C hasta el momento de su uso para evaluar su actividad biológica en el modelo múrdo (De Sousa y col, 2009).

3.4.2 Determinación de la dosis letal.

La dosis letal 50 medida como la potencia de una sustancia toxica, se define como aquella cantidad de veneno necesaria para causar la muerte a la mitad de los ratones inyectados con el veneno de las mapanares, la cual se determinó por el método secuencial de aumentar y disminuir la dosis de Dixon y Mood (1948) modificado por Sevcik, (1987). El veneno se inyectó con una microjeringa de 50 microlitros (Hamilton®) utilizando la vía intraperitoneal (VIP) en ratones C57BL/6 hembras, previamente pesados en la balanza digital (Denver Instrument®, modelo XS-310.D). Para iniciar el experimento, al primer ratón se le administró una dosis inicial X_1 escogida arbitrariamente y se observó la respuesta en un tiempo definido (una hora).

Si el primer ratón respondió con la muerte, el segundo recibió una dosis calculada como $X_2 = \text{anti-log}(\log X_1 - d)$ donde d es un factor arbitrario constante ($d=0,05$). Si por el contrario el primer ratón sobrevivía, al segundo múrdo se le administraba una dosis calculada como $X_2 = \text{anti-log}(\log X_1 + d)$. Se continuó con el experimento hasta encontrar el primer fenómeno vida – muerte o muerte – vida que fue el punto de inflexión a partir del cual comenzó la corrida válida para el experimento. La dosis siguiente de cada 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 (+) indica muerte, (0) indica sobrevivencia y (*), la dosis que fue administrada al siguiente ratón definido como punto final. La corrida válida se consideró completa al obtener tres ciclos de muerte – no muerte.

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

Los signos clínicos, consecuencia del efecto de la toxicidad aguda experimental inducida por la inyección intraperitoneal del veneno de los ejemplares de *Bothrops colombiensis* en ratones C57BL/6, se observó durante una hora de experimentación y se registraron cronológicamente en un formato preexistente (Anexo N° 1). También se uso un ratón control al cual se le administraron 50 microlitros de solución fisiológica.

3.5 PROCESAMIENTO DE LOS DATOS.

a.- Se utilizó el programa Microsoft® Excel 2003 para automatizar los cálculos y elaborar la gráfica de la DL-50.

b.- 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% usando para el procesamiento de los datos el método estadístico no paramétrico del programa V-8.2 (Sevcik, 1987) Laboratorio de Neurofarmacología Celular, Centro de Biofísica y Bioquímica, IVIC, Miranda.

Las diferencias entre los cálculos de la DL-50 de ambas especies fueron probadas por la técnica de análisis de varianza de Kurskall-Wallis. Se tomó un nivel de significancia $p < 0,05$.

CAPITULO IV: ANALISIS Y PRESENTACION DE RESULTADOS

4.1 Bothrops colombiensis de Yaracuy

En la tabla 1 se presenta los datos necesarios para el cálculo de la DL_{50} del veneno de *Bothrops colombiensis* proveniente de Yaracuy, en ratones C57BL/6 (♀), inyectados por VIP y observados durante 60 minutos. El total de ratones usados para este propósito fue de $n=13$ [corrida (válida + no válida) + siguiente animal (punto final)]. El primer punto de inflexión se ubicó en el segundo ratón (R_2). A partir de este punto se consideró la corrida secuencial válida para la determinación de la DL_{50} y de los efectos de toxicidad aguda experimental del veneno de esta especie.

La corrida válida, para calcular la DL_{50} , fue desde R_2 hasta $R_{12} + R_{13}$ (punto final) [$n=12$] y para evaluar los signos de toxicidad aguda experimental, desde R_2 hasta R_{12} [$n=11$]. La cantidad de veneno utilizado en la experiencia fue de $4.077,3 \mu\text{g}$ (4,08 mg).

La frecuencia de muerte causada por la administración del veneno en ratones se presenta en la tabla 2. Para este veneno la mayor frecuencia de muerte (83,3 %, $n=5$) ocurrió con la dosis B ($15,85 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$). Con la dosis C ($17,78 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$) la frecuencia fue 16,7% ($n = 1$). Cuando se administró la dosis A ($14,13 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$) todos los ratones sobrevivieron.

Tabla 1. DATOS PARA EL CÁLCULO DE LA DL₅₀ DEL VENENO DE *Bothrops colombiensis* DE YARACUY EN RATONES C57BL/6 (♀), ADMINISTRADO POR VIP, PARA UNA HORA DE OBSERVACIÓN.

RATÓN (n)	PESO (g)	DOSIS (Anti-Log)	DOSIS ($\mu\text{g} \cdot \text{gr}^{-1}$)	DOSIS TOTAL (μg)	VOLUMEN (μl)	MUERTE (minutos)	
CORRIDA NO VÁLIDA							
1	20,66	A:	1,15	14,13	291,9	12,7	-
				Sub-total	291,9		
CORRIDA VÁLIDA							
2	22,22	B:	1,20	15,85	352,2	15,3	†: 45
3	22,08	A:	1,15	14,13	312,0	13,5	-
4	21,48	B:	1,20	15,85	340,5	14,8	†: 27
5	20,62	A:	1,15	14,13	291,4	12,6	-
6	23,00	B:	1,20	15,85	364,6	15,8	†: 47
7	20,76	A:	1,15	14,13	293,3	12,7	-
8	21,14	B:	1,20	15,85	335,1	14,5	-
9	22,02	C:	1,25	17,78	391,6	16,9	†: 26
10	20,50	B:	1,20	15,85	324,9	14,1	†: 30
11	25,70	A:	1,15	14,13	363,1	15,7	-
12	26,29	B:	1,20	15,85	416,7	18,0	†: 31
				Sub-total	3.785,4		
				Total	4.077,3		
SIGUIENTE ANIMAL							
13		A:	1,15	14,13			⊗

Ratones válidos: $R_2 \rightarrow R_{12} + R_{13}$

A: *Anti-Log* 1,15 = 14,12537545 \approx 14,13

B : *Anti-Log* 1,20 = 15,84893192 \approx 15,85

C: *Anti-Log* 1,25 = 17,78279410 \approx 17,78

†: Ratón con *exitus letalis*

- : Vivo

⊗: Punto final

Tabla 2. FRECUENCIA DE MUERTE Y SECUENCIA DE DOSIS ADMINISTRADAS, POR VIP, DEL VENENO DE *Bothrops colombiensis* DE YARACUY EN RATONES C57BL/6 (♀).

ANTI-LOG DOSIS ($\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ DE RATON)			
RATÓN	1,15 (14,13 $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$) DOSIS A	1,20 (15,85 $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$) DOSIS B	1,25 (17,78 $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$) DOSIS C
CORRIDA NO VÁLIDA			
1	-		
CORRIDA VÁLIDA			
2		†: 45	
3	-		
4		†: 27	
5	-		
6		†: 47	
7	-		
8		-	
9			†: 26
10		†: 30	
11	-		
12		†: 31	
SIGUIENTE ANIMAL			
13	-		
FRECUENCIA DE MUERTE (†)			
DATOS DE LA	0	5	1
CORRIDA VÁLIDA	(0%)	(83,3%)	(16,7%)
n = 6 (100%)			

†: indica muerte.

-: indica sobrevivencia

⊗: indica siguiente animal (punto final del experimento)

La DL_{50} del veneno administrado de *Bothrops colombiensis* proveniente de Yaracuy, en ratones hembra C57BL/6 por VIP y para 60 minutos de observación, se presenta en la figura 1, donde se puede observar una mediana (DL_{50}) de 14,99 (14,99 – 15,85)mg . Kg⁻¹ de ratón. El Índice de Variabilidad (IV) fue de 5,74.

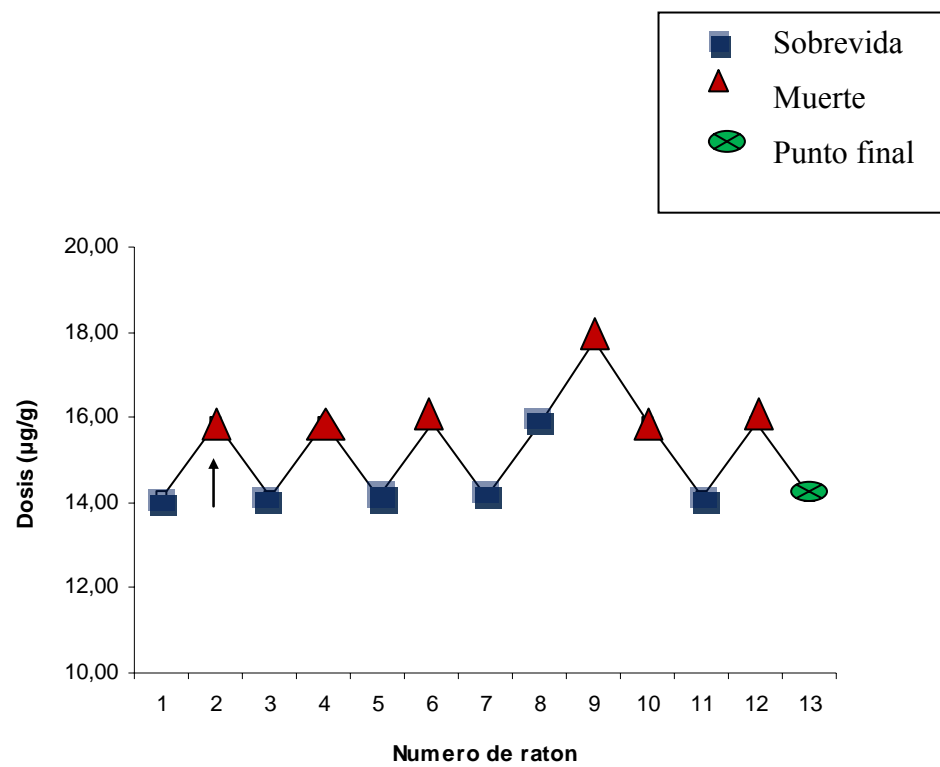


Figura 1. DETERMINACIÓN DE LA DOSIS LETAL CINCUENTA (DL50) DEL VENENO DE *Bothrops colombiensis* DE YARACUY EN RATONES C57BL/6 (♀). VIP. 60MIN.

Ratones hembra cepa C57BL/6 con pesos entre 20,50 y 26,29 g fueron inyectados por VIP con el veneno de *Bothrops colombiensis* de Yaracuy. Los animales fueron observados por 60 minutos. La flecha indica el punto de inflexión e inicio de los datos válidos para el cálculo de la DL₅₀. Los resultados se presentan como La mediana y sus límites para un 95% de confianza (entre paréntesis):

DL₅₀ vip, 60 minutos = 14,99 (14,99 - 15,85) µg/g de ratón

En la tabla 3 se presenta la frecuencia de los signos clínicos inducidos por efecto de toxicidad aguda experimental del veneno de *Bothrops colombiensis* proveniente de Yaracuy en ratones C57BL/6. En el 100% de los casos, correspondientes a la corrida válida, se observó: taquipnea, alteraciones de la respiración y posición antálgica. En el 55% observamos bradipnea/ apnea. En el 46% distensión abdominal. Seguidamente, el 36% presentó convulsiones y con menor frecuencia, temblores generalizados (27%).

4.2 *Bothrops colombiensis* de ARAIRA

En la tabla 4 se presentan los datos necesarios para el cálculo de la DL_{50} del veneno de *Bothrops colombiensis* (ARAIRA), en ratones hembra, C57BL/6, inyectados por VIP y observadas durante 60 minutos.

El total de ratones usados para la determinación de la DL_{50} fue de $n = 17$. El punto de inflexión se ubicó en R_5 . A partir de este punto se consideró la corrida secuencial válida para la determinación de la DL_{50} y de los efectos de toxicidad aguda experimental del veneno de *Bothrops colombiensis* proveniente de Araira.

La corrida válida para calcular la DL_{50} fue desde R_5 hasta $R_{16} + R_{17}$ (punto final) [$n = 13$]. Para evaluar los signos de toxicidad aguda experimental desde R_5 hasta R_{16} [$n = 12$].

La cantidad de veneno utilizado fue de 6.994,8 μg (6,99 mg), de los cuales, 5.385,9 μg (5,39mg) correspondió al utilizado en la corrida válida.

La frecuencia de muerte causada por la administración del veneno en la cepa C57BL/6, se representa en la tabla 5. La mayor frecuencia de muerte [57,1 %. ($n= 4$)] ocurrió con la dosis D (19,95 $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$). Con la E (22,39 $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$) fue 28,6% ($n= 2$) y con la C (17,78 $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$) fue 14,3% ($n= 1$). Cuando se administró la dosis A (14,13 $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$) y B (15,85 $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$) todos los ratones sobrevivieron.

Tabla 4. DATOS PARA EL CÁLCULO DE LA DL₅₀ DEL VENENO DE *Bothrops colombiensis* DE ARAIRA, MIRANDA, EN RATONES C57BL/6 (♀), VIP. 60MINUTOS.

RATÓN (n)	PESO (g)	DOSIS (Anti-Log)	DOSIS ($\mu\text{g} \cdot \text{gr}^{-1}$)	DOSIS TOTAL (μg)	VOLUMEN (μl)	MUERTE (minutos)	
CORRIDA NO VÁLIDA							
1	25,23	A:	1,15	14,13	356,5	16,9	-
2	23,85	B:	1,20	15,85	378,0	17,9	-
3	24,21	C:	1,25	17,78	430,5	20,4	-
4	22,25	D:	1,30	19,95	443,9	21,0	-
				Sub-total	1.608,9		
CORRIDA VÁLIDA							
5	22,10	E:	1,35	22,39	494,8	23,5	†: 35
6	26,89	D:	1,30	19,95	536,5	25,5	-
7	24,30	E:	1,35	22,39	544,1	25,8	†: 37
8	18,64	D:	1,30	19,95	371,9	17,7	†: 28
9	28,53	C:	1,25	17,78	507,6	24,1	-
10	20,56	D:	1,30	19,95	410,2	19,5	†: 30
11	22,20	C:	1,25	17,78	394,7	18,7	-
12	25,60	D:	1,30	19,95	510,8	24,3	†: 30
13	22,67	C:	1,25	17,78	403,1	19,1	†: 25
14	23,78	B:	1,20	15,85	376,9	17,9	-
15	21,06	C:	1,25	17,78	374,4	17,8	-
16	23,10	D:	1,30	19,95	460,9	21,8	†: 30
				Sub-total	5.385,9		
				Total	6.994,8		
SIGUIENTE ANIMAL							
17		C:	1,25	17,78			⊗

Ratones válidos: $R_5 \rightarrow R_{16} + R_{17}$

A: *Anti-Log* 1,15 = 14,12537545 \approx 14,13

B : *Anti-Log* 1,20 = 15,84893192 \approx 15,85

C: *Anti-Log* 1,25 = 17,78279410 \approx 17,78

†: Ratón con *exitus letales*; -: Vivo; ⊗: Punto final

D: *Anti-Log* 1,30 = 19,95262315 \approx 19,95

A: *Anti-Log* 1,35 = 22,38721139 \approx 22,39

Tabla 5. FRECUENCIA DE MUERTE Y SECUENCIA DE DOSIS ADMINISTRADAS DEL VENENO DE *Bothrops colombiensis* DE ARAIRA, MIRANDA, EN RATONES C57BL/6 (♀). VIP. 60 MINUTOS.

RATÓN	<i>Anti-log</i> Dosis ($\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ de ratón)				
	1,15 (14,13 $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$) DOSIS A	1,20 (15,85 $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$) DOSIS B	1,25 (17,78 $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$) DOSIS C	1,30 (19,95 $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$) DOSIS D	1,35 (22,39 $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$) DOSIS E
CORRIDA NO VÁLIDA					
1	-				
2		-			
3			-		
4				-	
CORRIDA VÁLIDA					
5					†: 30
6				+	
7					†: 37
8				†: 28	
9			+		
10				†: 30	
11			+		
12				†: 30	
13			†: 25		
14		-			
15			-		
16				†: 33	
SIGUIENTE ANIMAL					
17			⊗		
FRECUENCIA DE MUERTE [†]			1	4	2
DATOS CORRIDA VÁLIDA			(14,3 %)	(57,1 %)	(28,6 %)
n = 7 (100%)					

†: indica muerte.

-: indica sobrevivencia

⊗: indica siguiente animal (punto final del experimento)

La DL_{50} para 60 minutos de observación, del veneno de *Bothrops colombiensis* de Araira, administrado por VIP en ratones hembra C57BL/6, fue de 18,87 (17,90 – 20,08) $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ de ratón (Ver figura 2). El IV fue de 11,55%.

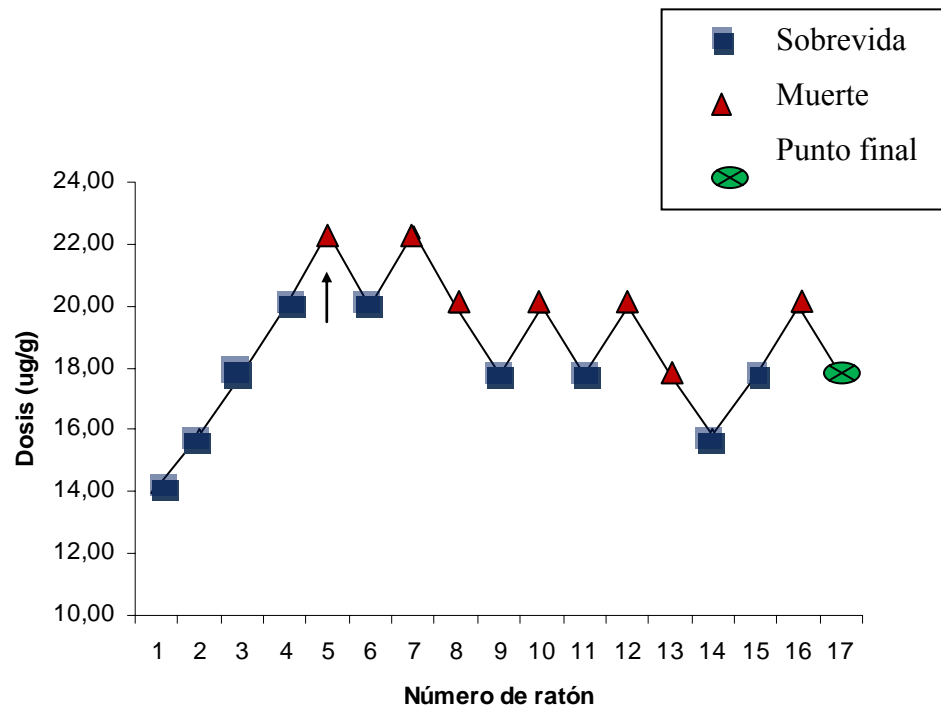


Figura 2. DETERMINACIÓN DE LA DOSIS LETAL CINCUENTA (DL50) DEL VENENO DE *Bothrops colombiensis* DE ARAIRA, MIRANDA POR VIP EN RATONES DE LA CEPA C57BL/6 (♀).

Ratones hembra cepa C57BL/6 con pesos entre 20,50 y 26,29 g fueron inyectados por vip con el veneno de *Bothrops colombiensis* (Yaracuy). Los animales fueron observados por 60 minutos. La flecha indica el punto de inflexión e inicio de los datos válidos para el cálculo de la DL₅₀. Los resultados se presentan como la mediana y sus límites para un 95% de confianza (entre paréntesis):

DL₅₀ vip, 60 minutos = 18,87 (17,90 - 20,08) µg . g de ratón

En la tabla 6 se presenta la frecuencia de los signos clínicos inducidos por efecto de toxicidad aguda experimental del veneno de *Bothrops colombiensis* proveniente de Araira inyectado por VIP en ratones C57BL/6 y observados por 60min.

En el 100% de los casos, correspondientes a la corrida válida, se observó taquipnea, alteraciones de la respiración y posición antálgica. En el 83% distensión abdominal y bradipnea/apnea. Seguidamente, en el 58% ocurrieron hipotonía del tren anterior y posterior y convulsiones y con menor frecuencia, temblores generalizados (25%).

Tabla 6. FRECUENCIA DE MANIFESTACIONES DE TOXICIDAD AGUDA EXPERIMENTAL INDUCIDAS POR EL VENENO DE *Bothrops colombiensis* DE ARAIRA ADMINISTRADO POR VIP EN RATONES C57BL/6 (♀). VIP.60MINUTOS.

CONDICIÓN	MUERTOS							VIVOS					TOTAL	
SIGNO DE TOXICIDAD	R ₅	R ₇	R ₈	R ₁₀	R ₁₂	R ₁₃	R ₁₆	R ₆	R ₉	R ₁₁	R ₁₄	R ₁₅	N	%
MARCHA ATAXICA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	0
DISTENSION ABDOMINAL	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	10	83
CONVULSIONES	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	7	58
DEFECACIÓN	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	0
TAQUIPNEA	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	12	100
BRADIPNEA/ APNEA	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	10	83
OTRAS ALTERACIONES RESPIRATORIAS	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	12	100
POSICIÓN ANTÁLGICA	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	12	100
TEMBLORES GENERALIZADOS	-	-	+	-	-	-	-	+	-	+	-	-	3	25
HIPOTONIA DEL TREN ANTERIOR Y/O POSTERIOR	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	7	58

4.3 *Bothrops colombiensis* de BARLOVENTO

En la tabla 7 se presenta los datos necesarios para el cálculo de la DL_{50} del veneno de *Bothrops colombiensis* de Barlovento, en ratones C57BL/6 (♀), inyectados por VIP y 60 minutos.

El total de roedores usados para la determinación de la DL_{50} fue de $n=15$. El punto de inflexión se ubicó en R_4 . A partir de este punto se consideró la corrida secuencial válida para la determinación de la DL_{50} y los efectos de toxicidad aguda experimental del veneno de esta especie.

La corrida válida, para calcular la DL_{50} , fue desde R_4 hasta $R_{14} + R_{15}$ (punto final) [$n=12$]; y, para evaluar los signos de toxicidad aguda experimental, desde R_4 hasta R_{14} [$n=11$]. La cantidad de veneno utilizado en la experiencia fue de 4.878,85 μg (4,88 g).

La frecuencia de muerte causada por la administración intraperitoneal del veneno estos ratones se presenta en la tabla 8. Para este veneno la mayor frecuencia de muerte (83,3 %, $n=5$) ocurrió con la dosis D (19,95 $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$). Con la dosis E (22,39 $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$) la frecuencia fue 16,7% ($n=1$). Cuando se administró la dosis A (14,13 $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$), B (15,85 $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$) y C (19,95 $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$) todos los ratones sobrevivieron.

Tabla 7. DATOS PARA EL CÁLCULO DE LA DL₅₀ DEL VENENO DE *Bothrops colombiensis* DE BARLOVENTO, MIRANDA, EN RATONES C57BL/6. VIP. 60MINUTOS.

RATÓN (n)	PESO (g)	DOSIS (Anti-Log)	DOSIS ($\mu\text{g} \cdot \text{gr}^{-1}$)	DOSIS TOTAL (μg)	VOLUMEN (μl)	MUERTE (minutos)	
CORRIDA NO VÁLIDA							
1	27,45	A:	1,15	14,13	387,87	15	-
2	18,33	B:	1,20	15,85	290,53	11	-
3	18,99	C:	1,25	17,78	337,64	13	-
				Sub-total	1.016,04		
CORRIDA VÁLIDA							
4	17,53	D:	1,30	19,95	349,72	14	†: 30
5	15,73	C:	1,25	17,78	279,67	11	.
6	13,78	D:	1,30	19,95	274,91	11	†: 29
7	20,96	C:	1,25	17,78	372,67	14	-
8	17,65	D:	1,30	19,95	352,12	14	-
9	19,87	E:	1,35	22,39	444,89	17	†: 56
10	16,03	D:	1,30	19,95	319,80	12	†: 54
11	15,54	C:	1,25	17,78	276,30	11	-
12	23,07	D:	1,30	19,95	460,02	18	†: 47
13	18,22	C:	1,25	17,78	323,95	13	-
14	20,53	D:	1,30	19,95	409,57	16	†: 56
				Sub-total	3.862,81		
				Total	4.878,85		
SIGUIENTE ANIMAL							
15		C:	1,25	17,78			⊗

Ratones válidos: $R_4 \rightarrow R_{14} + R_{15}$

†: Ratón con *exitus letales*; -: Vivo; ⊗: Punto final

A: *Anti-Log* 1,15 = 14,12537545 \approx 14,13

D: *Anti-Log* 1,30 = 19,95262315 \approx 19,95

B : *Anti-Log* 1,20 = 15,84893192 \approx 15,85

A: *Anti-Log* 1,35 = 22,38721139 \approx 22,39

C: *Anti-Log* 1,25 = 17,78279410 \approx 17,78

Tabla 8. FRECUENCIA DE MUERTE Y SECUENCIA DE DOSIS DEL VENENO DE *Bothrops colombiensis* DE BARLOVENTO, MIRANDA, EN RATONES C57BL/6 (♀). VIP. 60MINUTOS.

RATÓN	<i>Anti-log</i> Dosis ($\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ de ratón)				
	1,15 (14,13 $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$) DOSIS A	1,20 (15,85 $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$) DOSIS B	1,25 (17,78 $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$) DOSIS C	1,30 (19,95 $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$) DOSIS D	1,35 (22,39 $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$) DOSIS E
	CORRIDA NO VÁLIDA				
1	-				
2		-			
3			-		
	CORRIDA VÁLIDA				
4				†: 30	
5			-		
6				†: 29	
7			-		
8				-	
9					†: 56
10				†: 54	
11			-		
12				†: 47	
13			-		
14				†: 56	
	SIGUIENTE ANIMAL				
16			⊗		
FRECUENCIA DE MUERTE [†]					
DATOS CORRIDA VÁLIDA					
			0	5	1
			(0,0 %)	(83,3 %)	(16,7 %)
n = 6 (100%)					

†: indica muerte.

-: indica sobrevivencia

⊗: indica siguiente animal (punto final del experimento)

La DL_{50} del veneno de *Bothrops colombiensis* de Barlovento, administrado por vía intraperitoneal en ratones hembra C57BL/6 y para 60min de observación, se presenta en la figura 3, donde se puede observar una mediana (DL_{50}) de 18,86 (18,86 – 19,95) $mg \cdot kg^{-1}$ de ratón. El índice de variabilidad (IV) fue de 5,78.

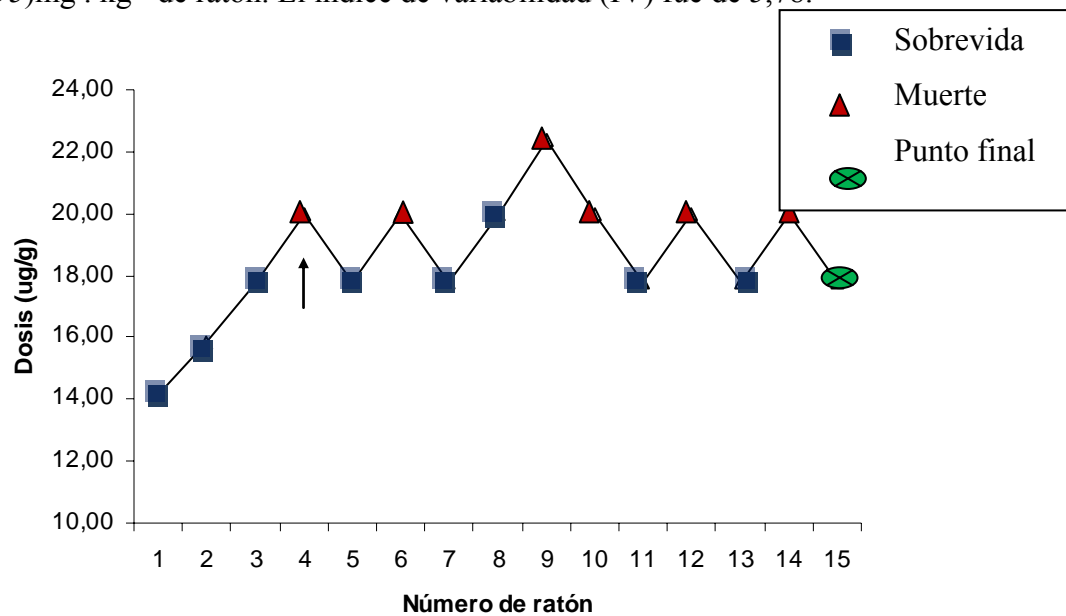


Figura 3. DETERMINACIÓN DE LA DOSIS LETAL CINCUENTA (DL50) DEL VENENO DE *Bothrops colombiensis* (BARLOVENTO, MIRANDA) POR VIP EN RATONES DE LA CEPA C57BL/6.

Ratones hembra cepa C57BL/6 con pesos entre 13,78 y 27,45 g fueron inyectados por vip con el veneno de *Bothrops colombiensis* (Barlovento). Los animales fueron observados por 60 minutos. La flecha indica el punto de inflexión e inicio de los datos válidos para el cálculo de la DL₅₀. Los resultados se presentan como la mediana y sus límites para un 95% de confianza (entre paréntesis):

DL₅₀ vip, 60 minutos = 18,86 (18,86 - 19,95) µg . g de ratón

En la tabla 9 se presenta la frecuencia de los signos clínicos de toxicidad aguda experimental inducidos por efecto del veneno de *Bothrops colombiensis* proveniente de Barlovento en ratones C57BL/6 (♀).

En el 100% de los casos, correspondientes a la corrida válida, se observó taquipnea y otras alteraciones de la respiración. En el 82% distensión abdominal y bradipnea/apnea. Seguidamente, el 55% de los ratones presentó convulsiones. Con menor frecuencia, posición antálgica y temblores generalizados en el 46% y defecación en el 36% de los roedores.

Tabla 9. FRECUENCIA DE MANIFESTACIONES CLÍNICAS DE TOXICIDAD AGUDA EXPERIMENTAL INDUCIDAS POR EL VENENO DE *Bothrops colombiensis* DE BARLOVENTO EN RATONES C57BL/6 (♀). VIP. 60MINUTOS

CONDICIÓN		MUERTOS						VIVOS					TOTAL	
SIGNO	DE	R ₄	R ₆	R ₉	R ₁₀	R ₁₂	R ₁₄	R ₅	R ₇	R ₈	R ₁₁	R ₁₃	N	%
MARCHA ATAXICA														
		-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	8	73
DISTENSION														
ABDOMINAL														
		-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	9	82
CONVULSIONES														
		+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	6	55
DEFECACIÓN														
		+	+	-	-	-	+	-	+	-	-	-	4	36
TAQUIPNEA,														
		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	11	100
BRADIPNEA/APNEA														
		+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	9	82
OTRAS														
ALTERACIONES														
RESPIRATORIAS														
POSICIÓN														
ANTÁLGICA														
		-	-	+	+	+	-	-	+	-	-	+	5	46
TEMBLORES														
GENERALIZADOS														
		-	-	-	+	+	+	-	-	+	+	-	5	46
HIPOTONIA DEL														
TREN ANTERIOR Y/O														
		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	0
POSTERIOR														

4.4 *Bothrops colombiensis* de BARINAS

En la tabla 10 se presenta los datos necesarios para el cálculo de la DL_{50} del veneno de *Bothrops colombiensis* de Barinas, en ratones C57BL/6 (♀), inyectados por VIP y observados durante 60 minutos.

El total de ratones usados para la determinación de la DL_{50} fue de $n=16$. El punto de inflexión se ubicó en R_3 . A partir de este punto se consideró la corrida secuencial válida para la determinación de la DL_{50} y los signos de toxicidad aguda experimental del veneno de esta especie.

La corrida válida, para calcular la DL_{50} , fue desde R_3 hasta $R_{15} + R_{16}$ (punto final) [$n=14$] y para evaluar los signos de toxicidad aguda experimental, desde R_3 hasta R_{15} [$n=13$]. La cantidad de veneno utilizado en la experiencia fue de 3.408,50 μg (3,41 mg).

La frecuencia de muerte causada por la administración de este veneno a los ratones se presenta en la tabla 11. Para este caso la mayor frecuencia de muerte (66,7 %, $n=4$) ocurrió con la dosis B (12,59 $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$). Con la dosis A (14,13 $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$) la frecuencia fue 33,3% ($n=2$). Cuando se administró la dosis C (11,22 $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$) todos los ratones sobrevivieron.

Tabla 10. DATOS PARA EL CÁLCULO DE LA DL_{50} DEL VENENO DE *Bothrops colombiensis* DE BARINAS EN RATONES C57BL/6 (♀), VIP. 60MINUTOS.

RATÓN (n)	PESO (g)	DOSIS (Anti-Log)	DOSIS ($\mu\text{g} \cdot \text{gr}^{-1}$)	DOSIS TOTAL (μg)	VOLUMEN (μl)	MUERTE (minutos)	
CORRIDA NO VÁLIDA							
1	16,99	A:	1,15	14,13	240,07	12	†: 26
2	17,54	B:	1,10	12,59	220,83	11	†: 56
				Sub-total	460,90		
CORRIDA VÁLIDA							
3	18,82	C:	1,05	11,22	211,16	11	-
4	16,12	B:	1,10	12,59	202,95	10	†: 32
5	16,24	C:	1,05	11,22	182,21	9	-
6	19,03	B:	1,10	12,59	239,59	12	†: 17
7	19,45	C:	1,05	11,22	218,23	11	-
8	20,29	B:	1,10	12,59	255,45	13	-
9	18,59	A:	1,15	14,13	262,68	13	†: 28
10	18,51	B:	1,10	12,59	233,04	12	†: 35
11	19,89	C:	1,05	11,22	233,17	11	-
12	16,78	B:	1,10	12,59	211,26	11	-
13	17,32	A:	1,15	14,13	244,73	12	†: 43
14	18,59	B:	1,10	12,59	234,04	12	†: 37
15	19,52	C:	1,05	11,22	219,09	11	-
				Sub-total	2.947,60		
				Total	3.408,50		
SIGUIENTE ANIMAL							
16		B:	1,10	12,59			⊗

Ratones válidos: $R_3 \rightarrow R_{15} + R_{16}$

A: *Anti-Log* 1,15 = 14,12537545 \approx 14,13

B: *Anti-Log* 1,10 = 12,58925412 \approx 12,59

C: *Anti-Log* 1,05 = 11,22018454 \approx 11,22

†: Ratón con *exitus letalis*

-: Vivo

⊗: Punto final

Tabla 11. FRECUENCIA DE MUERTE Y SECUENCIA DE DOSIS DEL VENENO DE *Bothrops colombiensis* DE BARINAS EN RATONES C57BL/6 (♀). VIP. 60MINUTOS.

ANTI-LOG DOSIS ($\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ DE RATON)			
RATÓN	1,05 (11,22 $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$) DOSIS C	1,10 (12,59 $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$) DOSIS B	1,15 (14,13 $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$) DOSIS A
CORRIDA NO VÁLIDA			
1			†: 26
2		†: 46	
CORRIDA VÁLIDA			
3	-		
4	-	†: 32	
5	-		
6		†: 17	
7	-		
8		-	
9			†: 28
10		†: 35	
11	-		
12		-	
13			†: 37
14		†: 31	
15	-		
SIGUIENTE ANIMAL			
16		⊗	
FRECUENCIA DE MUERTE [†]			
DATOS DE LA CORRIDA VÁLIDA	0 (0,0%)	4 (66,7%)	2 (33,3%)
n = 6 (100%)			

†: indica muerte.

-: indica sobrevivencia

⊗: indica siguiente animal (punto final del experimento)

La DL_{50} del veneno de *Bothrops colombiensis* de Barinas, administrado por vía intraperitoneal en ratones hembra C57BL/6 y observados por 60min, se presenta en la figura 3, donde se puede observar que la misma fue de 12,59 (11,91 – 12,59)mg . kg⁻¹ de ratón.

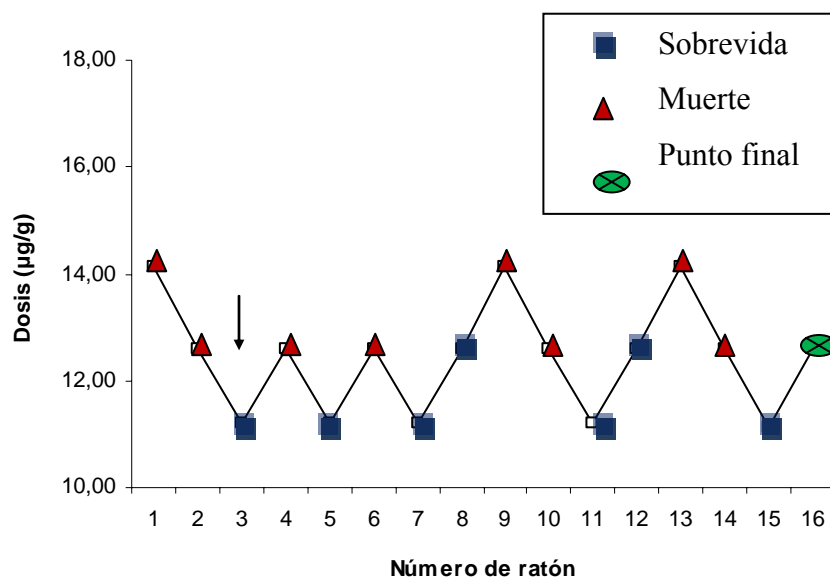


Figura 4. DETERMINACIÓN DE LA DOSIS LETAL CINCUENTA (DL50) DEL VENENO DE *Bothrops colombiensis* DE BARINAS EN RATONES C57BL/6 (♀). VIP. 60MINUTOS.

Ratones hembra cepa C57BL/6 con pesos entre 16,78 y 20,29 g fueron inyectados por vip con el veneno de *Bothrops colombiensis* (Barinas). Los animales fueron observados por 60 minutos. La flecha indica el punto de inflexión e inicio de los datos válidos para el cálculo de la DL₅₀. Los resultados se presentan como LA mediana y sus límites para un 95% de confianza (entre paréntesis):

DL₅₀ vip, 60 minutos = 12,59 (11,91 - 12,59) µg . g de ratón

En la tabla 12 se presenta la frecuencia de los signos clínicos de toxicidad aguda experimental inducidos por efecto del veneno de *Bothrops colombiensis* proveniente de Barinas inyectado en ratones C57BL/6 (♀).

En el 100% de los casos, correspondientes a la corrida válida, se observó: taquipnea y alteraciones de la respiración. El 77% presentó bradipnea/apnea. En el 62% posición antálgica. Seguidamente, el 55% y 54% presentó convulsiones y distensión abdominal, respectivamente. Con menor frecuencia, temblores generalizados en el 39% y marcha atáxica en el 31%. Por último, defecación en el 23% de los ejemplares múridos.

4.5 “POOL” DE TODOS LOS EJEMPLARES ESTUDIADOS

En la tabla 13 se presenta los datos necesarios para el cálculo de la DL_{50} del pool de veneno de *Bothrops colombiensis* de los ejemplares estudiados, en ratones C57BL/6, observados durante 60 minutos.

El total de ratones usados para la determinación de la DL_{50} fue de $n=17$. El primer punto de inflexión se ubicó en R_3 . A partir de este punto se consideró la corrida válida para la determinación de la DL_{50} y de los efectos de toxicidad aguda experimental del veneno de esta especie.

La corrida válida, para calcular la DL_{50} , fue desde R_3 hasta $R_{16} + R_{17}$ (punto final) [$n=15$] y para evaluar los signos de toxicidad aguda experimental, desde R_3 hasta R_{16} [$n=14$]. La cantidad de veneno utilizado en la experiencia fue de 5.742,97 μg (5,74 mg).

La frecuencia de muerte causada por la administración intraperitoneal del veneno en estos ratones se presenta en la tabla 14. Para el “pool” de venenos la mayor frecuencia de muerte (66,7 %, $n=4$) ocurrió con la dosis B (12,59 $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$). Con la dosis A (14,13 $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$) la frecuencia fue 33,3% ($n=2$). Cuando se administró la dosis C (11,22 $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$) todos los ratones sobrevivieron.

Tabla 13. DATOS PARA EL CÁLCULO DE LA DL₅₀ DEL “POOL” DE VENENOS DE *Bothrops colombiensis* EN RATONES C57BL/6 (♀). VIP. 60MINUTOS.

RATÓN (n)	PESO (g)	DOSIS (Anti-Log)	DOSIS ($\mu\text{g} \cdot \text{gr}^{-1}$)	DOSIS TOTAL (μg)	VOLUMEN (μl)	MUERTE (minutos)	
CORRIDA NO VÁLIDA							
1	21,20	A:	1,15	14,13	299,56	17	-
2	18,38	B:	1,20	15,85	291,32	17	-
				Sub-total	590,88		
CORRIDA VÁLIDA							
3	20,20	C:	1,25	17,78	359,21	21	†: 57
4	18,35	B:	1,20	15,85	290,82	17	-
5	18,09	C:	1,25	17,78	321,60	19	-
6	16,92	D:	1,30	19,95	337,55	20	†: 52
7	20,92	C:	1,25	17,78	371,96	22	-
8	16,02	D:	1,30	19,95	319,60	19	-
9	20,16	E:	1,35	22,39	451,38	26	†: 21
10	20,52	D:	1,30	19,95	409,37	24	†: 33
11	23,16	C:	1,25	17,78	511,80	24	†: 55
12	23,01	B:	1,20	15,85	364,70	21	-
13	19,75	C:	1,25	17,78	351,20	20	†: 50
14	20,52	B:	1,20	15,85	325,20	19	-
15	18,95	C:	1,25	17,78	336,90	20	-
16	20,09	D:	1,30	19,95	400,80	23	†: 52
				Sub-total	5.152,09		
				Total	5.742,97		
SIGUIENTE ANIMAL							
17		C:	1,25	17,78			⊗

Ratones válidos: $R_3 \rightarrow R_{16} + R_{17}$

A: *Anti-Log* 1,15 = 14,12537545 \approx 14,13

B: *Anti-Log* 1,20 = 15,84893192 \approx 15,85

C: *Anti-Log* 1,25 = 17,78279410 \approx 17,78

D: *Anti-Log* 1,30 = 19,95262315 \approx 19,95

E: *Anti-Log* 1,35 = 22,38721139 \approx 22,39

†: Ratón con *exitus letalis*

-: Vivo

⊗: Punto final

Tabla 14. FRECUENCIA DE MUERTE Y SECUENCIA DE DOSIS DEL “POOL” DE VENENOS DE *Bothrops colombiensis* EN RATONES C57BL/6 (♀). VIP. 60MINUTOS.

RATÓN	<i>Anti-log Dosis</i> ($\mu\text{g} \otimes \text{g}^{-1}$ de ratón)				
	1,15 (14,13 $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$) DOSIS A	1,20 (15,85 $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$) DOSIS B	1,25 (17,78 $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$) DOSIS C	1,30 (19,95 $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$) DOSIS D	1,35 (22,39 $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$) DOSIS E
CORRIDA NO VÁLIDA					
1	-				
2		-			
CORRIDA VÁLIDA					
3			†: 57		
4		-			
5			-		
6				†: 52	
7			-		
8				-	
9					†: 51
10				†: 43	
11			†: 55		
12		0			
13			†: 50		
14		0			
15			-		
16				†: 52	
SIGUIENTE ANIMAL					
17			\otimes		
FRECUENCIA DE MUERTE [†]					
DATOS CORRIDA VÁLIDA					
		0	3	3	1
		(0,0 %)	(42,9%)	(42,9%)	(14,2 %)
n = 7 (100%)					

†: indica muerte.

-: indica sobrevivencia

⊗: indica siguiente animal (punto final del experimento)

La DL_{50} por VIP y para 60 minutos de observación del “pool” de veneno de todos los ejemplares de *Bothrops colombiensis*, en ratones hembra C57BL/6, se presenta en la figura 5. Se expresa como la mediana y sus límites de confianza al 95% y resultó ser: $DL_{50} = 17,90$ ($17,78 - 18,87$) $mg \cdot kg^{-1}$ de ratón. El índice de variabilidad (IV) fue de 6,09.

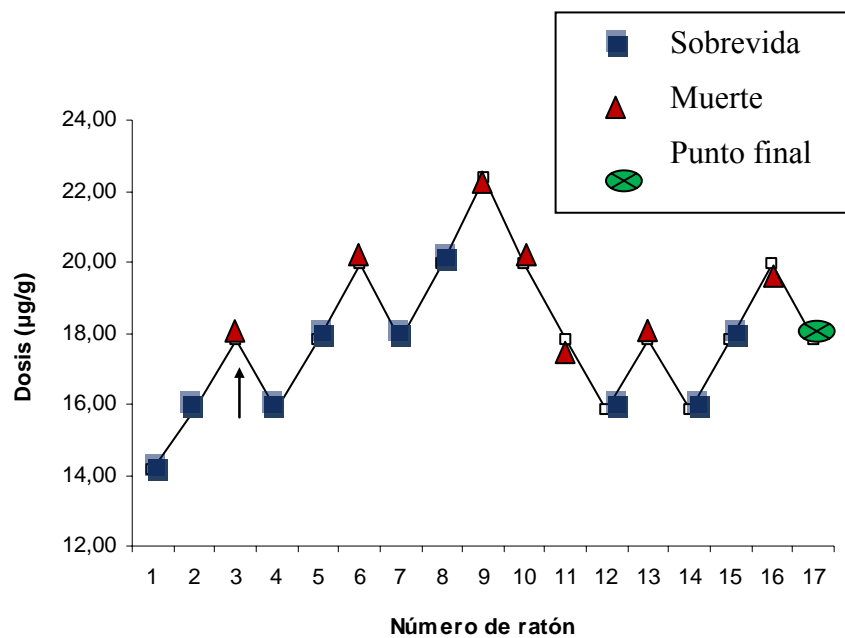


Figura 5. DETERMINACIÓN DE LA DOSIS LETAL CINCUENTA (DL50) DEL “POOL” VENENO DE *Bothrops colombiensis* EN RATONES C57BL/6 (♀). VIP. 60MINUTOS.

Ratones hembra cepa C57BL/6 con pesos entre 16,02 y 23,16 g fueron inyectados por vip con el veneno de *Bothrops colombiensis* (Pool de Venenos). Los animales fueron observados por 60 minutos. La flecha indica el punto de inflexión e inicio de los datos válidos para el cálculo de la DL₅₀. Los resultados se presentan como LA mediana y sus límites para un 95% de confianza (entre paréntesis):

DL₅₀ vip, 60 minutos = 17,90 (17,78 - 18,87) µg . g de ratón

En la tabla 15 se presenta la frecuencia de los signos clínicos de toxicidad aguda experimental inducidos por efecto del “pool” de veneno de *Bothrops colombiensis*, inyectado en ratones C57BL/6 (♀) por VIP y para 60min de observación.

En el 100% de los casos, correspondientes a la corrida válida, se observó: taquipnea, otras alteraciones de la respiración, temblores generalizados e hipotonía del tren anterior y/o posterior. En el 57% distensión abdominal. Seguidamente, el 50% presentó convulsiones, posición antálgica y bradipnea/apnea. Con menor frecuencia temblores generalizados (39%) y marcha atáxica (31%). Por último defecación y marcha atáxica ocurrieron en el 36% y 29% de los ejemplares múridos, respectivamente.

Tabla 15. FRECUENCIA DE MANIFESTACIONES DE TOXICIDAD AGUDA EXPERIMENTAL INDUCIDO POR EL “POOL” DE LOS VENENOS DE *Bothrops colombiensis* EN RATONES C57BL/6 (♀), VIP. 60 MINUTOS.

CONDICIÓN DE TOXICIDAD	MUERTOS							VIVOS							TOTAL	
	R ₃	R ₆	R ₉	R ₁₀	R ₁₁	R ₁₃	R ₁₆	R ₄	R ₅	R ₇	R ₈	R ₁₂	R ₁₄	R ₁₅	N	%
MARCHA ATAXICA																
	+	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	+	-	+	5	36
DISTENSION ABDOMINAL																
	+	+	-	+	-	-	-	+	+	-	+	-	+	+	8	57
CONVULSIONES																
	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	7	50
DEFECACIÓN																
	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-	+	-	-	4	29
TAQUIPNEA																
	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	14	100
BRADIPNEA/APNEA																
	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	7	50
OTRAS ALTERACIONES RESPIRATORIAS																
	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	14	100
POSICIÓN ANTÁLGICA																
	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+	+	-	-	-	7	50
TEMBLORES GENERALIZADOS																
	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	14	100
HIPOTONIA DEL TREN ANTERIOR Y/O POSTERIOR																
	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	14	100

4.6 COMPARACIONES ENTRE EJEMPLARES DE *Bothrops colombiensis* PROVENIENTES DE YARACUY, ARAIRA, BARLOVENTO, BARINAS Y “POOL”

La tabla 16 muestra la comparación de las DL_{50} del veneno de *Bothrops colombiensis* de varias regiones de Venezuela, en los ratones C57BL/6 (♀). Los resultados demuestran que la DL_{50} del veneno de *Bothrops colombiensis* proveniente de Barinas (DL_{50} vip, 60 minutos = 12,59 (11,91 – 12,59) mg . Kg⁻¹ de ratón) es significativamente menor que la DL_{50} del veneno proveniente de Yaracuy (DL_{50} vip, 60 minutos = 14,99 (14,99 – 15,85) mg . Kg⁻¹ de ratón) y éste, a su vez, más potente que el veneno de los ejemplares de Miranda [Barlovento : DL_{50} vip, 60 minutos = 18,86 (18,86 – 19,95) mg . Kg⁻¹ de ratón y Araira : DL_{50} vip, 60 minutos = 18,87 (17,90 – 20,08) mg . Kg⁻¹ de ratón]. La DL_{50} del pool [DL_{50} vip, 60 minutos = 17,90 (17,78 – 18,87) mg . Kg⁻¹ de ratón] es similar estadísticamente a las de los ejemplares de Miranda.

TABLA 16. COMPARACIÓN DE LAS DOSIS LETALES CINCUENTA (DL50) DE LOS VENENOS DE EJEMPLARES DE *Bothrops colombiensis* DE VARIAS REGIONES DE VENEZUELA.

REGIONES	DL 50 ($\mu\text{g} \cdot \text{g}$ de ratón)		
BARINAS	12,59 (11,91 - 12,59)	P < 0,001	P < 0,001
YARACUY	14,99 (14,99 - 15,85)		
“POOL”	17,90 (17,78 - 18,87)		
BARLOVENTO (MIRANDA)	18,86 (18,86 - 19,95)		P > 0,05
ARAIRA (MIRANDA)	18,87 (17,90 - 20,08)		

En la tabla 17 se presenta el tiempo promedio de aparición de los signos de toxicidad aguda experimental inducidos por efecto del veneno de *Bothrops colombiensis* provenientes de Yaracuy, Araira, Barlovento, Barinas y el pool de todas las anteriores administrado por vía intraperitoneal en ejemplares múridos C57BL/6 femeninos.

La marcha atáxica apareció más precozmente con el veneno de Barinas (4,5 minutos). Tardíamente con el “Pool” y Barlovento, a los 15 y 17,25 minutos, respectivamente y no se manifestó con el veneno de Araira.

La distensión abdominal fue observada a los 13,2; 5,6; 10; 7,1 y 15,9 minutos luego de inyectar el veneno de *Bothrops colombiensis* proveniente de Yaracuy, Araira, Barlovento, Barinas y el “pool” de todos los ejemplares, respectivamente. A diferencia de ésta, las convulsiones fueron un signo clínico de aparición más tardía con la administración del veneno de *Bothrops colombiensis* proveniente de Yaracuy,

Araira, Barlovento, Barinas y el “pool” de todos los ejemplares, con un tiempo de 24; 26,42; 32,8; 26,7 y 41 minutos, respectivamente.

La defecación apareció a los 32; 7; 11,5; 12,7 y 18,8 minutos luego de inyectar el veneno de *Bothrops colombiensis* proveniente de Yaracuy, Araira, Barlovento, Barinas y el pool de todos los ejemplares, respectivamente.

La taquipnea apareció a los 4,9; 3,5; 3,1; 4 y 2,3 minutos luego de inocular el veneno de *Bothrops colombiensis* proveniente de Yaracuy, Barlovento, Barinas y el pool de todos los ejemplares, respectivamente. Mientras que los ratones presentaron bradipnea/apnea ocurrieron a los 30,8; 31,8; 56; 31,5 y 45 minutos respectivamente. Otras alteraciones de la respiración fueron observadas en todos los ejemplares múridos inyectados con el veneno de *Bothrops colombiensis* con un promedio de tiempo de aparición de 20,36; 12,67; 11,7; 17,4 y 21 minutos de las regiones Yaracuy, Araira, Barlovento, Barinas y el pool de todos, respectivamente.

La posición antálgica fue otro de los signos clínicos observados a los 7,5; 3,8; 11,6; 7 y 13,3 minutos luego de inocular el veneno de *Bothrops colombiensis* proveniente de Yaracuy, Barlovento, Barinas y el pool de todos los ejemplares, respectivamente.

A los 35,3; 10,7; 3,2; 18,4 y 14,8 minutos aparecieron temblores generalizados en los ejemplares múridos inoculados con el veneno de *Bothrops colombiensis* proveniente de Yaracuy, Barlovento, Barinas y el pool de todos los ejemplares, respectivamente

La hipotonía del tren anterior y/o posterior se observó sólo en los ratones C57BL/6 femeninos inoculados con el veneno de Araira y el pool de todos los

ejemplares de *Bothrops colombiensis* con un promedio de tiempo de aparición a los 17 y 59 minutos, respectivamente.

Tabla 17. TIEMPO PROMEDIO DE APARICIÓN DE LOS SIGNOS DE LA TOXICIDAD AGUDA EXPERIMENTAL INDUCIDA POR EL VENENO DE *Bothrops colombiensis* PROVENIENTES DE YARACUY, ARAIRA, BARLOVENTO, BARINAS Y POOL EN RATONES C57BL/6 (♀)

MANIFESTACIONES CLÍNICAS	PROMEDIO DE TIEMPO DE APARICIÓN DE LOS SINTOMAS (MINUTOS)				
	YARACUY	ARAIRA (MIRANDA)	BARLOVENTO (MIRANDA)	BARINAS	TODOS
MARCHA ATÁXICA	-	-	17,25	4,5	15
DISTENSIÓN ABDOMINAL	13,2	5,6	10	7,1	15,9
CONVULSIONES	24	26,42	32,3	26,7	41
DEFECACIÓN	32	7	11,5	12,7	18,8
TAQUIPNEA	4,9	3,5	3,1	4	2,3
, BRADIPNEA/APNEA	30,83	31,8	56	31,5	45
OTRAS ALTERACIONES DE LA RESPIRACIÓN	20,36	12,67	11,7	17,4	21
POSICIÓN ANTÁLGICA	7,5	3,8	11,6	7	13,3
TEMBLORES GENERALIZADOS	35,3	10,7	3,2	18,4	14,8
HIPOTONÍA TREN ANTERIOR Y/O POSTERIOR	-	17	-	-	23,1

Las locaciones están ubicadas en el mismo orden en que se realizaron los experimentos

4.7 COMPARACIÓN DEL EFECTO PROCOAGULANTE DEL VENENO DE *Bothrops colombiensis* PROVENIENTE DE 4 REGIONES DE VENEZUELA

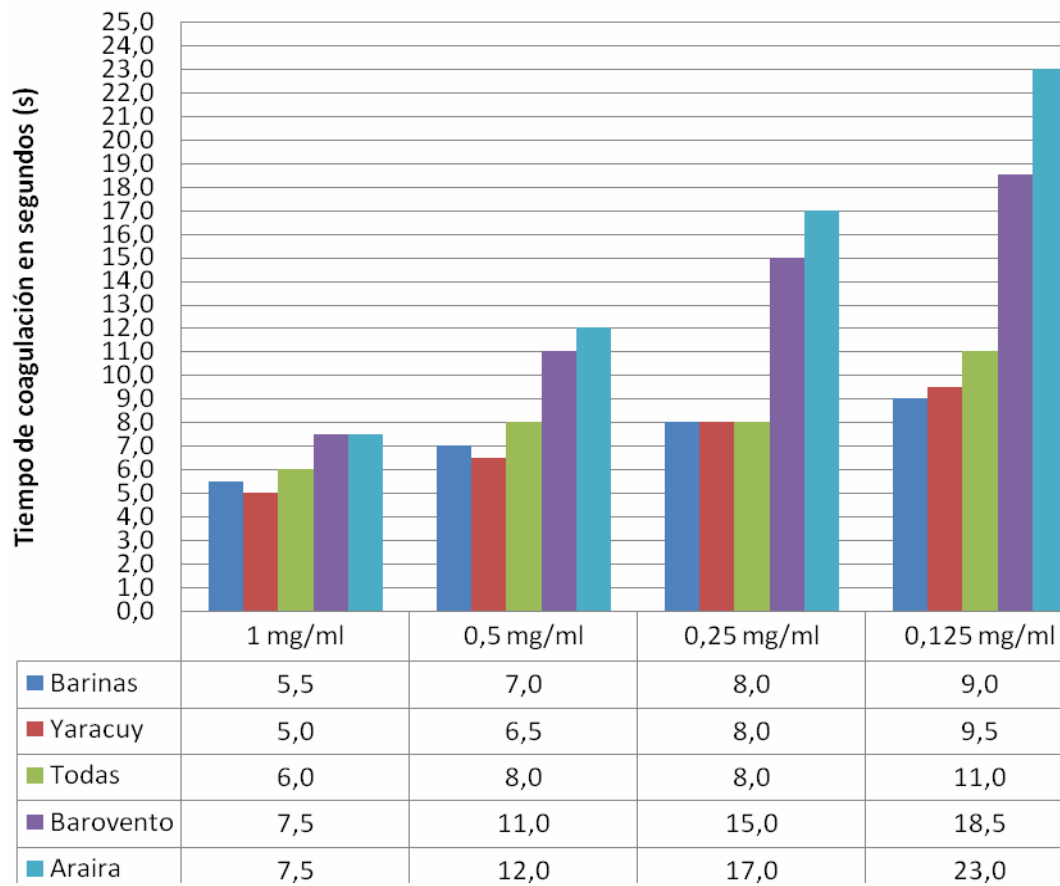
En el segundo experimento se determinó el efecto procoagulante del veneno de *Bothrops colombiensis* proveniente de Yaracuy, Araira, Barlovento, Barinas y el Pool sobre el plasma humano. Dicha actividad se cuantificó midiendo el tiempo en el cual 100µl del veneno a diferentes diluciones, coagulan 200µl de plasma. Cada experimento fue repetido dos veces y se promediaron los tiempos (tabla 18).

Se observó que el efecto procoagulante inducido por el veneno de *Bothrops colombiensis* sobre el plasma humano fue dosis dependiente en todas las preparaciones del veneno observando un aumento progresivo del tiempo de coagulación con las sucesivas diluciones del veneno. Los venenos de Barinas y Yaracuy mostraron el mayor poder coagulante con 9' y 9,5' a la mínima concentración, respectivamente. Mientras que los de Barlovento y Araira resultaron los menos procoagulantes (18,5' y 23', respectivamente). El "pool" de todos los venenos coaguló el plasma en 11', es decir, se ubico entre los dos grupos extremos acercándose más a los venenos de mayor poder coagulante.

Tabla 18. EFECTO PROCOAGULANTE DEL VENENO DE *Bothrops colombiensis* PROVENIENTES DE YARACUY, ARAIRA, BARLOVENTO, BARINAS Y "POOL"

DILUCIÓN	1mg/ mL			0,5mg/mL			0,25mg/mL			0,125mg/mL		
	A	B	<u>X</u>	A	B	<u>X</u>	A	B	<u>X</u>	A	B	<u>X</u>
LOCALIDAD												
BARINAS	5s	6s	5,5s	7s	7s	7s	9s	7s	8s	10s	8s	9s
YARACUY	5s	5s	5s	7s	6s	6,5s	8s	8s	8s	10s	9s	9,5s
TODAS	6s	6s	6s	8s	8s	8s	8s	8s	8s	11s	11s	11s
BARLOVENTO	8s	7s	7,5s	11s	11s	11s	15s	15s	15s	18s	19s	18,5s
ARAIRA	7s	8s	7,5s	12s	12s	12s	17s	17s	17s	23s	23s	23s

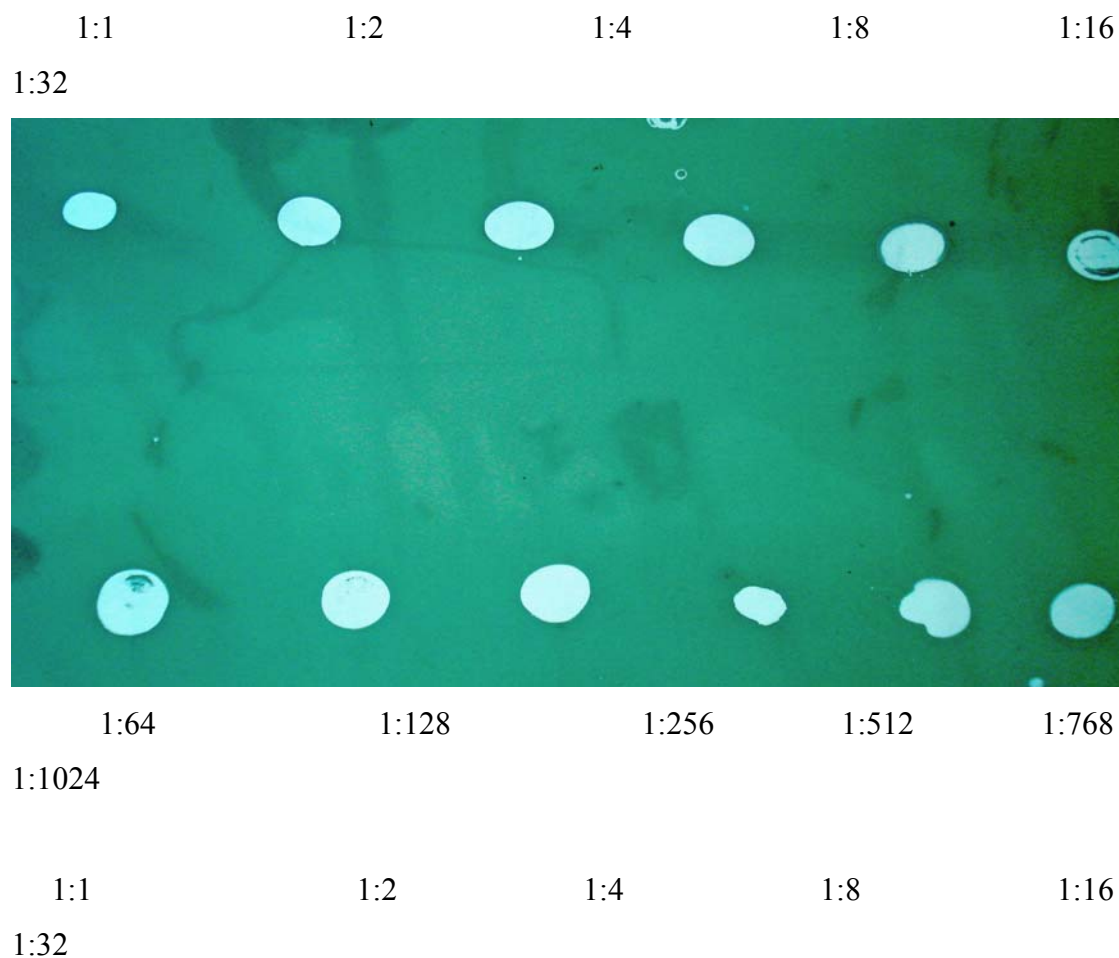
Figura 7. MEDIA ARITMETICA DE LOS TIEMPOS DE COAGULACION CON EL VENENO DE *BOTHROPS COLOMBIENSIS* PROVENIENTES DE YARACUY, ARAIRA, BARLOVENTO, BARINAS Y "POOL" A DIFERENTES DILUCIONES



4.8 COMPARACIÓN DEL EFECTO PROTEOLÍTICO DEL VENENO DE *bothrops colombiensis* PROVENIENTE DE 4 REGIONES DE VENEZUELA

La actividad proteolítica del veneno de *Bothrops colombiensis* proveniente de cuatro regiones de Venezuela se estudió con diluciones sucesivas del veneno, colocadas sobre radiografías veladas a fin de evidenciar la digestión de la capa de gel proteico contenida en éstas.

En la figura 7 se muestran los ejemplos del experimento. No se evidencia diferencia importante en cuanto a la actividad proteolítica de los venenos, ya que la degradación del gel fue similar para todos los ejemplares estudiados.



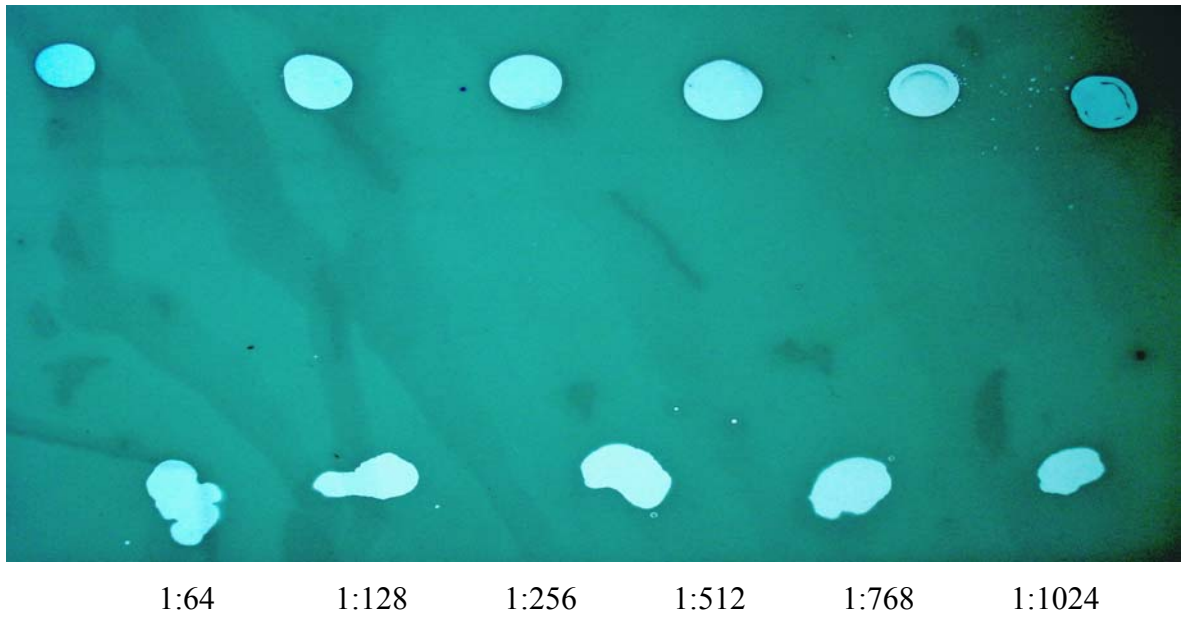


Figura 7. ACTIVIDAD PROTEOLÍTICA DEL VENENO DE *Bothrops colombiensis* DE ARAIRA Y YARACUY CON DILUCIONES SERIADAS DE VENENO FRESCO.

4.9 DISCUSIÓN

Estudios indican que los venenos de diferentes poblaciones de ofidios difieren en las concentraciones de sus componentes, como los llevados a cabo por Jiménez-Porras (1964) en poblaciones de *Bothrops atrox* y *B. nummifer* (hoy *Atropoides nummifer*) donde observaron diferencias intraespecíficas. Posteriormente, el mismo autor describe variaciones en el contenido de crotamina con respecto al área geográfica (Jiménez-Porras 1970).

Las diferencias en cuanto a los componentes de los venenos no sólo cambian con respecto a las especies, subespecies y área geográfica sino también con el estadio ontogénico, dieta y estación del año en la que es recolectado el veneno (Toro y col 1999). Como describen Lomonte y col (1983) en *Crotalus durissus durissus* cuyos ejemplares recién nacidos tienen mayor efecto neurotóxico y miotóxico, en tanto los ejemplares adultos presentan un veneno de acción local y hemorrágica, sin neurotoxicidad evidente. Otro estudio interesante es el de Mackessy y col (2003) quienes describen cambios en la composición del veneno de *Crotalus oreganus concolor* y lo relacionan con el cambio de la dieta en los periodos ontogénicos; en esta subespecie las juveniles se alimentaban principalmente de presas ectotérmicas y las adultas de presas endotérmicas. Los ejemplares juveniles se alimentaban principalmente de anfibios, como las ranas que son animales de sangre fría cuya muerte es lenta y los adultos se alimentaban de roedores cuya muerte es más rápida, lo que puede ser una de las explicaciones de los cambios en las potencias y componentes de ambos venenos. Otra explicación es que la cantidad de veneno que inyectan las serpientes corresponde a su tamaño, es decir, las jóvenes inyectan pequeñas cantidades ya que los animales son de menor tamaño, por lo tanto, necesitan un veneno más potente (Mackessy y col, 2003).

Como los venenos de las serpientes poseen una composición variable, también existen diferencias importantes en las actividades enzimáticas y en los efectos locales y sistémicos no sólo entre distintas especies de la misma familia, sino también diferencias intraespecíficas entre poblaciones de distintas áreas geográficas (Remuzgo y col., 2000). Como consecuencia, los venenos de las diferentes especies y entre individuos de la misma especie, pero de distintas poblaciones, producen diferentes efectos locales y sistémicos, por lo que se requiere de un tratamiento clínico diferente para cada caso (Málaga y col., 2001).

En nuestros experimentos se encontró que sí existen diferencias entre la potencia del veneno (DL 50) de los ejemplares femeninos adultos de *Bothrops colombiensis* de diferentes regiones de Venezuela. Existe una diferencia significativa entre la DL 50 de Barinas (KW=12,59) y Yaracuy (KW=14,99), siendo la primera mucho más potente que la segunda. A su vez el veneno de Yaracuy (KW=14,99) fue significativamente más potente que el del “pool” (KW=17,78), el de Barlovento (KW=18,86) y Araira (KW=18,87). La potencia entre los venenos de Araira y Barlovento fue similar, y esto probablemente se puede explicar debido a la cercanía geográfica de ambas regiones (Estado Miranda).



Figura 9. Mapa de la República Bolivariana de Venezuela, donde se resaltan (en naranja) los estados a los que pertenecen los ejemplares estudiados

Los signos de toxicidad aguda experimental inducida por el veneno de *Bothrops colombiensis* en ratones C57BL/6, administrado VIP y para 60 minutos de observación fueron diversas sin embargo, ya que la totalidad de los ratones de la corrida válida fueron inyectados con dosis cercanas a la DL 50, no hubo diferencia significativa en la mayoría de los signos y, en los casos en los que se presentaron pequeñas variaciones, éstas no permiten hacer un factor común que ayude a distinguir la toxicidad y/o efectos biológicos de los venenos de las diferentes localidades.

La distención abdominal fue una manifestación clínica común de toxicidad aguda de todos los venenos empleados, aunque, con mayor proporción con los venenos de Araitha y Barlovento, en un 83% y 82%, respectivamente con un tiempo promedio de aparición de 5,6 y 10 minutos, respectivamente. Seguramente este efecto no es más que la manifestación de la irritación peritoneal inducida por el veneno.

Las convulsiones fueron síntoma premonitorio de muerte con la mayoría de los venenos y por lo tanto, una manifestación clínica tardía con los venenos de Araitha, Barlovento y el “pool”, sólo los ratones que murieron presentaron este síntoma. Con el veneno de Yaracuy el tiempo promedio de aparición fue menor, 24 minutos y con el de Araitha y Barinas ocurrieron en un tiempo promedio similar 26,4 y 26,7 minutos respectivamente. El veneno del ejemplar barloventeño produjo convulsiones con un tiempo levemente mayor (32,3 min) pero, en general, podemos decir que no hubo diferencias importantes.

En lo referente a los efectos biológicos, se pudo constatar que hay una relación directa entre el poder coagulante de los venenos y su toxicidad aguda. Así, los venenos más potentes (Barinas y Yaracuy) coagulan el plasma mucho más rápidamente (aunque tal diferencia no es significativa) que los provenientes de Miranda (Araitha y Barlovento), cuya DL 50 es mayor. Estos resultados concuerdan con todos los estudios previamente realizados en el CICS. Al comparar veneno de

adultos con el de juveniles de *B. venezuelensis*. Blanco y Rojas (2005) encontraron que el veneno de juveniles era más potente y mas procoagulantes que el de adultos, mientras que el veneno de éstos es mas proteolítico. En forma muy similar, los venenos de cascabeles juveniles de las subespecies *Crotalus durissus cumanensis* (Baldi y Chalhoub, 2007), *C. d. vegrandis* (Valerio, 2007) y *C. d. pifanorum* (Acosta, Cayano y Graziani, 2008) resultaron más potentes (DL 50) que los de sus contrapartes adultos y este hallazgo se relacionó con un efecto coagulante mayor de los venenos juveniles.

Astudillo y Bejarano (2008), trabajando con un “pool” de venenos de cinco ejemplares adultos que incluían los mismos ejemplares hembra de nuestro estudio y un macho proveniente de Anzoátegui (Sabana de Uchire), compararon éste con un “pool” de veneno obtenido de diez ejemplares juveniles provenientes de Barlovento (Miranda) no logrando demostrar diferencia significativa en sus potencias. Interesantemente, tampoco hubo diferencia en el efecto procoagulante. Este hallazgo los llevó a hipotetizar que podría haber diferencias importantes en la potencias de los venenos de mapanares provenientes de diferentes regiones y que por casualidad, la mezcla de éstos pudo promediar el de los juveniles de una de dichas regiones. Nuestros resultados confirman, sin lugar a dudas, dicho planteamiento y resaltan una vez más, la relevancia de los estudios sobre la gran variabilidad de los venenos.

Es pertinente referir el trabajo recientemente publicado por Calvete y col (2008) en el cual se realizaron cromatografías (en formato tipo HPLC) de venenos provenientes de los mismos ejemplares de *B. colombiensis* analizados en este trabajo. Esta publicación muestra que los venenos provenientes de las cuatro poblaciones analizadas contienen, sin duda, componentes compartidos pero presentes en diferente concentración. Estas diferencias en composición entre poblaciones prevalentes en diferentes áreas endémicas pueden explicar, al menos parcialmente, la diferente actividad biológica de los venenos aquí presentada. Estudios en curso llevados a cabo

en este laboratorio tienen como objeto aislar e identificar los componentes tóxicos responsables de esta variación intra-específica en el veneno de *B. colombiensis* y permitir la preparación de antígenos más representativos de nuestra ofidiofauna a los fines de la preparación de antivenenos más efectivos.

CAPITULO V: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1 CONCLUSIONES

- Existe una clara diferencia en la potencia de los venenos de *Bothrops colombiensis* de los distintos estados estudiados.
- El veneno más potente es el del estado Barinas seguido por el de Yaracuy y finalmente los venenos de Miranda.
- Es evidente la mayor contribución del efecto procoagulante de los venenos a la potencia de los mismos, por encima, del efecto proteolítico.

5.2 RECOMENDACIONES

1. Es recomendable para la preparación de los “pool” de venenos usar venenos liofilizados para ser mezclados en proporciones homogéneas para así evitar el predominio del ejemplar que produzca más veneno por ordeño.
2. Promover la producción regional de antiveninas ofídicas para lograr mayor especificidad y, por tanto, efectividad de las mismas.
3. Repetir los estudios de variabilidad ontogénica del veneno de *B. colombiensis* usando suficientes adultos y juveniles de la misma área geográfica.
4. Mantener la utilización del método de Dixon y Mood (1948) modificado por Sevcik (1987) para el cálculo de la DL_{50} ya que permite ahorrar tiempo de experimentación y material biológico.
5. Divulgar los resultados de este estudio y otros similares con el propósito de instruir principalmente al personal de salud sobre la letalidad de los venenos en cuestión y según ello tomar una conducta terapéutica adecuada.

BIBLIOGRAFÍA

1. Acosta, L.; Cayamo, Y. y Graziani, D. **Efectos biológicos y DL₅₀ del veneno de *Crotalus durissus pifanorum* (Serpentes, Viperidae); estudio comparativo entre ejemplares juveniles y adultos.** Trabajo de grado (no publicado). Anzoátegui: Departamento de Medicina Interna, Universidad de Oriente, 2008.
2. Astudillo, Y. y Bejarano, M. **Efectos Biológicos y Dosis Letal Cincuenta (DL 50) del Veneno de *Bothrops colombiensis* (Serpentes, Viperidae); estudio comparativo entre ejemplares juveniles y adultos.** Trabajo de grado (no publicado). Anzoátegui: Departamento de Medicina Interna, Universidad de Oriente, 2008.
3. Baldi, P. y Chalhoud, Y. **Efectos biológicos y DL₅₀ del veneno de *Crotalus durissus cumanensis*, estudio comparativo entre ejemplares juveniles y adultos.** Trabajo de grado (no publicado). Anzoátegui: Departamento de Medicina Interna, Universidad de Oriente, 2007.
4. Barraviera, B. **Accidentes por serpentes dos gêneros “*Crotalus*” e “*Micrurus*”.** En: Barraviera, B. Venenos animais: Uma visão integrada (1ª ed). Río de Janeiro: Ed Publicacoes Cientificas, 1994: 261 - 279 pp.
5. Bolaños, R. **Serpientes, Venenos y Ofidismo en Centroamérica.** San José CR: Editorial de la Universidad de Costa Rica, 1984: 15 - 16 pp.
6. Calvete J, Borges A, Segura A, y col. Snake venomics and antivenomics of *Bothrops colombiensis*, a medically important pitviper of the *Bothrops atrox*-

asper complex endemic to Venezuela: contributing to its taxonomy and snakebite management. **JPROT** 2009; 72: 227-240.

7. Campbell, J. A. y Lamar, W. W. **The Venomous Reptiles of Latin America**. New York: Comstock Publishing Associates, 1989: 105 - 107, 158 - 160, 189 - 192, 339 - 346, 374 - 376 pp.
8. Campbell, J. A. y Lamar, W. W. **The Venomous Reptiles of the Western Hemisphere** (2 tomos). Cornell University Press, Ithaca and London, 2004: Volumen I: 1 - 751, Volumen II: 752 - 1365.
9. Caraballo, A.; Navarro, J.; Sánchez, E.; Pérez J. C. and Rodríguez - Acosta A. Epidemiological and Clinical Aspects of Snakebites in Bolivar State, Venezuela. **RFM** 2004; 27(1): 25 - 28.
10. Cazorla, M.; Salazar, D. y Quijada, D. **Efectos biológicos y DL₅₀ del veneno de *Crotalus durissus ruruima* en tres modelos muridos**. Trabajo de grado (no publicado). Anzoátegui: Departamento de Medicina Interna, Universidad de Oriente, 2009.
11. Colimodio, H. y Aguilar, M. Envenenamiento Ofidico en Venezuela. **Med. Crit Venez.** 1993; 8(1): 23 - 32 pp.
12. De Sousa, L.; Vásquez, D.; Salazar, D.; Valecillos, R.; Rojas, M.; Parrilla - Álvarez, P. y Quiroga, M. Mortalidad en humanos por envenenamientos causados por invertebrados y vertebrados en el Estado Monagas, Venezuela. **Invest. Clín.** 2005; 46(3): 241 - 254.

13. Dixon, W. J. y Mood, A. M. A Method for a Obtaining and Analyzing Sensivity Data. **J. Am. Statis. Ass.** 1948; 43: 109 - 126.
14. Dixon, J y P. Soini. The reptiles of the upper Amazon Basin, Iquitos regions, Perú 2d ed. Milwaukee Public Museum. 1986; 155pp
15. Dos Santos, M. C.; Ferreira, L. C. L.; Dias Da Silva, W.; De Fátima, M. y Furtado, D. Caracterización de las actividades biológicas de los venenos “amarillo” y “blanco” de *Crotalus durissus ruruima* comparados con el veneno de *Crotalus durissus terrificus*. Poder neutralizante de los antivenenos frente a los venenos de *Crotalus durissus ruruima*. **Toxicon** 1993; 31(11): 1459 - 1469.
16. Furnaletto, R.; Rolim - Rosa, S.; Siles-Villarroel, R. y Zelante, F. Contribuição ao estudo da determinação da DL₅₀ de venenos botrópicos inoculados por vía venosa em camundongos – *Mus musculus*-Linnaes. **Mem. Inst. Butantan** 1973; 37: 109 - 122.
17. Gutiérrez, J. M. Comprendiendo los venenos de serpientes: 50 años de investigaciones en América Latina. **Rev. Biol. Trop.** 2002; 50(2): 377 - 394.
18. Grillo, R. O.; Scannone, H. y Parra, N. Enzymatic activities and other characteristics of *Crotalus durissus cumanensis* venom. **Toxicon** 1974; 12: 297 - 302.
19. Hernández, M.; Finol, J. H. y López, J. C. Alteraciones ultraestructurales de tejido cardíaco tratado con veneno crudo de serpiente de cascabel (*Crotalus durissus cumanensis*). **RFM** 2005; 28(1): 12 - 16.

20. Hurtado, A.; Montaña, L. y Rodríguez, F. **Comparación de la actividad biológica y DL₅₀ del veneno de *Tityus nororientalis* (Scorpiones, Buthidae) en ratones albinos de las cepas NMRI y BALB^c.** Trabajo de grado (no publicado). Anzoátegui: Departamento de Ciencias Fisiológicas, Universidad de Oriente, 2008.
21. Kiriakos, D. **Envenenamiento Ofídico en el Hospital Universitario Luís Razetti en el período 1989 - 1992.** Tesis de Post - Grado (no publicado). Anzoátegui: Universidad de Oriente, 1993.
22. Lancini, A. R. **Serpientes de Venezuela** (2^a ed). Caracas: Ernesto Armitano Editor, 1986: 262 pp.
23. Lancini, A. R. y Kornacker, P. M. **Die Schlangen von Venezuela.** Caracas: Verlag Armitano Editores, 1989: 381 pp.
24. López - Lozano, J. L.; Nogueira, M. D. N. y Muniz, E. G. Comparação da potência de antivenenos na neutralização do veneno de *Bothrops atrox*. In: XLI Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, 2005, Florianópolis. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, 2005; 38: 63 - 64.
25. Markland, F. Snake venom and the hemostatic system. **Toxicon** 1998; 45(8): 1024 - 1036.
26. Montilla, J. Hiperinmunización de ovinos contra el veneno de la especie *Crotalus durissus cumanensis* del estado Zulia, Venezuela. **Rev. Cient. FCV - LUZ** 1999; IX(5): 390 - 393.

27. Moreno, M. y Méndez, R. **Dosis letal 50 del veneno de *Bothrops venezuelensis* y *Bothrops colombiensis* (Serpentes, Viperidae) en los modelos múridos NMRI y BALB´c.** Trabajo de grado (no publicado). Anzoátegui: Departamento de Medicina Interna, Universidad de Oriente, 2009.
28. Pirela, R., López - Jonsthorp, J. C. y Hernández, J. L. Caracterización toxicológica del veneno total de la serpiente de cascabel *Crotalus durissus cumanensis* (Viperidae) presente en la localidad de Porshoure, Guajira venezolana. **RC** 2006; 16(3): 232 - 238.
29. Rádis - Baptista, G.; Oguiura, N.; Hayashi, M. A. F.; Camargo, M. E.; Grego, K. F.; Oliveira, E. B. y Yaman, T. Nucleotide sequence of crotoamine isoform precursors from a single South American rattlesnake (*Crotalus durissus terrificus*). **Toxicon** 1999; 37:973 - 984.
30. Rodríguez - Acosta, A. **Los Venenos y el Síndrome de Envenenamiento Ofídico.** Caracas: Instituto de Medicina Tropical, Sección de Inmunohistoquímica, Universidad Central de Venezuela, 1995: 5 - 10 pp.
31. Rodríguez - Acosta, A., Orihuela, R. y Mondolfi, A. **El Accidente Ofídico en Venezuela.** Caracas: Venediciones, 1998: 106.
32. Roodt, A.; Estévez - Ramírez, J.; Paniagua - Solís, J.; Litwin, S.; Carvajal - Saucedo, A.; Dolab, J., Robles - Ortíz, L. y Alagón, A. Toxicidad de venenos de serpientes de importancia médica en México. **Gac. Méd. México** 2000; 141(1): 13 - 18.

33. Ross, M. **Pharmacodynamics mechanisms of drug action and the relationship between drug concentrations and effect.** In: Hardman, J., Limbird, L., Molinoff, P. y Ruddon, R. Goodman and Gilman the pharmacological basics of therapeutics. Ninth Edition, New York: Mac Graw - Hill, 1996: 29 - 41 pp.
34. Salazar, M. y Fuenmayor Y. **Dosis letal 50 del veneno de *Crotalus durissus cumanensis* y *Crotalus durissus vegrandis* (Serpentes, Viperidae) en los modelos murinos NMRI y BALB/c.** Trabajo de grado (no publicado). Anzoátegui: Departamento de Medicina Interna, Universidad de Oriente, 2009.
35. Saldarriaga, M. M.; Otero, R.; Núñez, V. y Torres, M. F. Variaciones Ontogénicas y Geográficas en los efectos tóxicos y en las características inmunoquímicas del veneno de serpientes del grupo *Bothrops atrox* del Meta y Antioquia. **Iatreia** 2000; 13 (2): 90.
36. Sandner - Montilla, F. **Manual de las Serpientes Ponzonas de Venezuela.** Caracas: Gema, 1965: 108.
37. Sandner – Montilla F. La necesaria revalidación de *Bothrops lanceolatus* (Lacépède 1789) y el paso a sinonimia de *Bothrops colombiensis* (Hallowell 1845). *Memorias Científicas de Ofidiología.* 1979; 13: 1-7.
38. Saravia, P.; Rojas, E.; Arce, V.; Guevara, C.; López, J.; Chaves, E.; Rojas, G. y Gutiérrez, J. M. Geographic and ontogenic variability in the venoms of the neotropical rattlesnake *Crotalus durissus*: Pathophysiological and therapeutic implications. **Rev. Biol. Trop.** 2002; 50(1): 340 - 345.

39. Sevcik, C. DL-50 determinations: Objections to the method of Beccari as modified by Molinengo. **Toxicon** 1987; 25(7): 779 - 783.

40. Valerio, M. **Comparación de los efectos biológicos del veneno de ejemplares juveniles y adultos de *Crotalus durissus vegrandis*. Klauber, 1941 (Serpentes, Viperidae). Modalidad Investigación.** Trabajo de grado (no publicado). Sucre: Departamento de Biología, Universidad de Oriente, 2007.

41. Valledor, A. **Envenenamientos por animales. Animales venenosos y urticantes del mundo.** Madrid: Ediciones Díaz de Santos, 1994: 342.

42. Varanda, E. A. y Soares, M. J. **Bioquímica de Venenos de Serpentes.** En: Barraviera, B. Venenos animais: Uma visão integrada (1ª ed). Río de Janeiro: Ed Publicacoes Cientificas, 1994: 205 - 219 pp.

ANEXOS



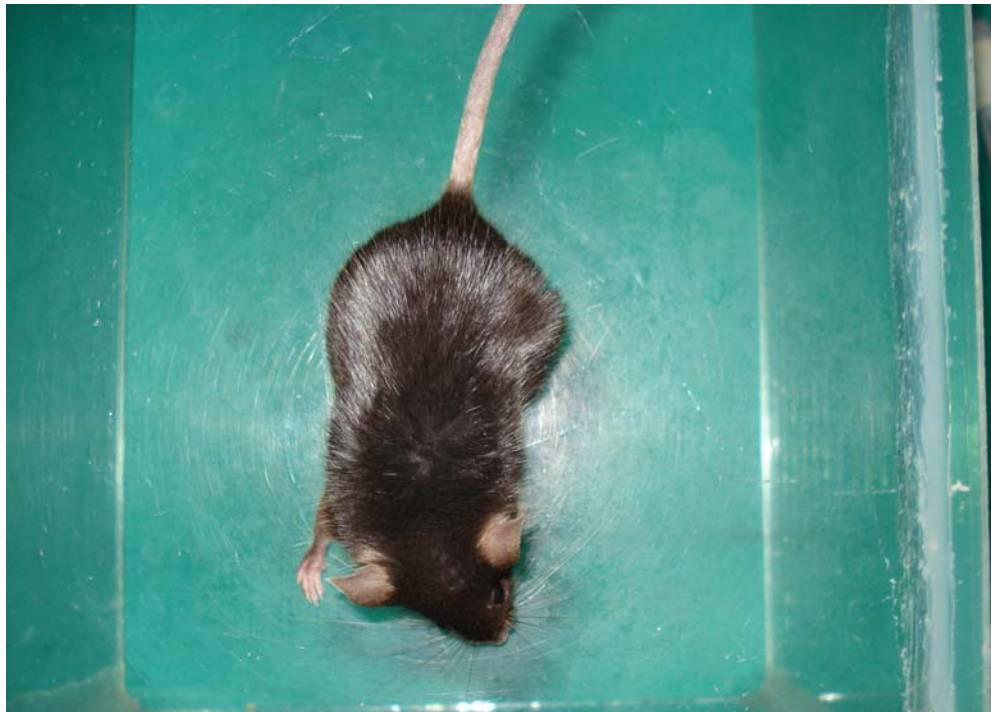
Bothrops colombiensis proveniente de Yaracuy



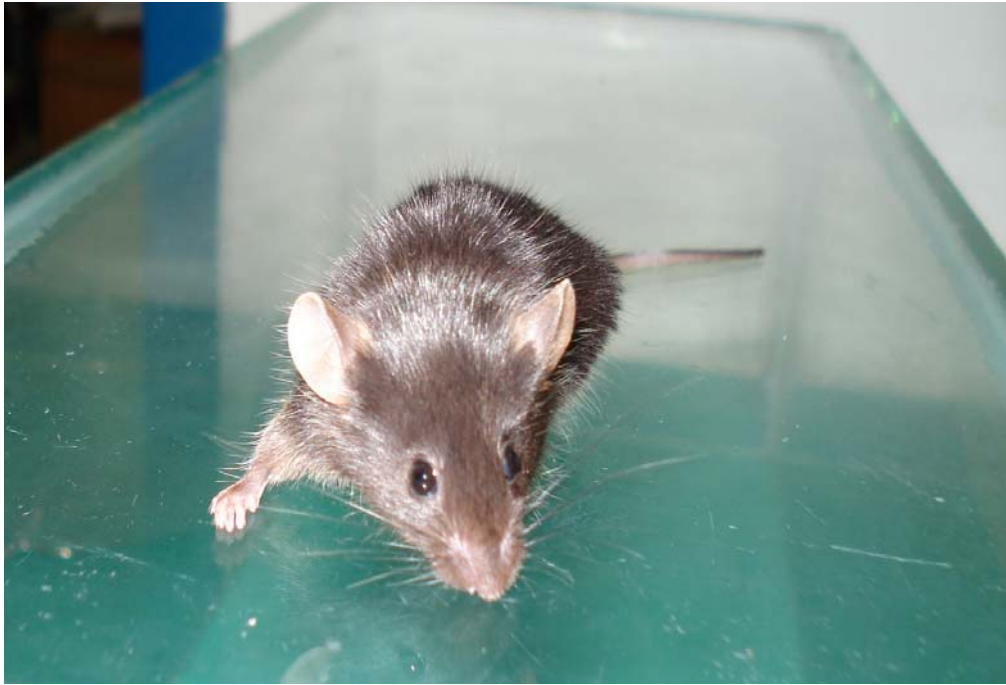
Bothrops colombiensis de Araira



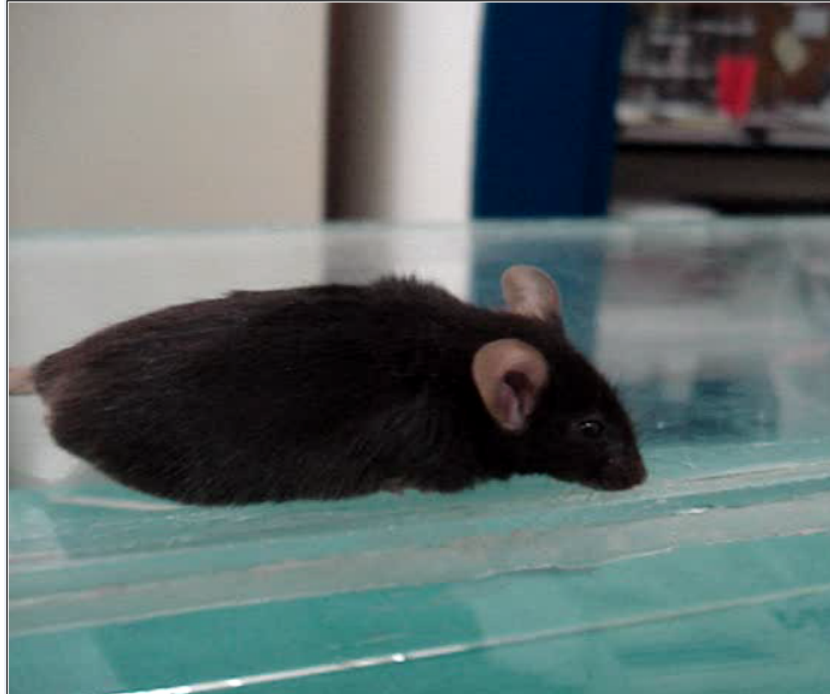
Inyección de veneno, vía intraperitoneal, en ratones C57bl/6 macho



Hipotonía del tren posterior



Marcha atáxica



Posición antálgica

APÉNDICE



UNIVERSIDAD DE ORIENTE
NÚCLEO DE ANZOÁTEGUI
ESCUELA DE MEDICINA
CENTRO DE INVESTIGACIONES EN CIENCIAS DE LA SALUD (CICS)
LABORATORIO DE TOXINOLOGÍA

FICHA DE RESULTADOS

DL₅₀ MÉTODO:

EXPERIMENTO:

VENENO (ESPECIE, SEXO):

ANIMAL EXPERIMENTAL:

(Número del animal, peso, vía de inyección)

CÁLCULO DE DOSIS:

Factor	Dosis (volumen)
<input type="text"/>	<input type="text"/>

Tabla de Resultados:

Tiempo	Manifestaciones clínicas
01.	
02.	
03.	
04.	
05.	
06.	
07.	
08.	
09.	
10.	

<i>11.</i>	
<i>12.</i>	
<i>13.</i>	

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

TÍTULO	“VARIABILIDAD GEOGRÁFICA INTRAESPECÍFICA DE LA TOXICIDAD DEL VENENO DE <i>Bothrops colombiensis</i> (SERPENTES, VIPERIDAE) EN VENEZUELA”
SUBTÍTULO	

AUTOR (ES):

APELLIDOS Y NOMBRES	CÓDIGO CULAC / E MAIL
Ruiz Chopite, Carolina de los Ángeles	CVLAC: V-17. 360.758 E MAIL: carolinadelosangelesruiz@gmail.com
Ruiz Chopite, Carolina del Carmen	CVLAC: V-17. 360.759 E MAIL: carolinadelcarmenruiz@hotmail.com
	CVLAC: E MAIL:
	CVLAC: E MAIL:

PALÁBRAS O FRASES CLAVES:

Veneno, toxicidad, serpientes, variabilidad intraespecifica, viperidae, taquipnea, dosis letal cincuenta, *Bothrops colombiensis*, Venezuela. _____

METADATOS PARA TRABAJOS DE GRADO, TESIS Y ASCENSO:

ÀREA	SUBÀREA
Escuela de Ciencias de la Salud	Medicina

RESUMEN (ABSTRACT):

Se estudiaron los efectos biológicos y DL₅₀ del veneno de ejemplares *Bothrops colombiensis* de distintas zonas geográficas del país en el modelo murido C57BL/6 (♀) inyectados por vía intraperitoneal y para una hora de observación. Se compararon ejemplares adultos femeninos de Barinas, Yaracuy y dos localidades de Miranda (Araira y Barlovento) entre sí y contra un “pool” formado por los cuatro venenos. El veneno más potente fue el procedente de Barinas, seguido por el de Yaracuy, luego el “pool” y finalmente los venenos de Miranda, los cuales, no mostraron diferencia significativa entre los de las dos localidades. La mayor potencia de los venenos se relacionó directamente con un mayor efecto procoagulante del mismo. Las manifestaciones clínicas y el efecto proteolítico fueron similares con todos los venenos. Se concluye que la potencia de los venenos y sus efectos biológicos están directamente relacionados con la procedencia geográfica de *Bothrops colombiensis*.

METADATOS PARA TRABAJOS DE GRADO, TESIS Y ASCENSO:

CONTRIBUIDORES:

APELLIDOS Y NOMBRES	ROL / CÓDIGO CVLAC / E_MAIL				
Kiriakos, Demetrio	ROL	CA X	AS	TU	JU X
	CVLAC:	V-5.698.723			
	E_MAIL	kiriakosch@cantv.net			
	E_MAIL				
Borges, Adolfo	ROL	CA	AS X	TU	JU X
	CVLAC:	V- 5.302.194			
	E_MAIL	borges.adolfo@gmail.com			
	E_MAIL				
De Sousa, Leonardo	ROL	CA	AS	TU	JU X
	CVLAC:	V-14.214.493			
	E_MAIL	leonardodesousa@yahoo.com			
	E_MAIL				
González, Raúl	ROL	CA	AS	TU	JU X
	CVLAC:	V- 8.316.719			
	E_MAIL	raulog@cantv.net			
	E_MAIL				

FECHA DE DISCUSIÓN Y APROBACIÓN:

2009	07	30
AÑO	MES	DÍA

LENGUAJE. SPA

METADATOS PARA TRABAJOS DE GRADO, TESIS Y ASCENSO:

ARCHIVO (S):

NOMBRE DE ARCHIVO	TIPO MIME
TESIS.Venenobothrops.doc	APPLICATION/MWORD

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: Centro de Investigación en Ciencias de la Salud____ (OPCIONAL)

TEMPORAL: _____ (OPCIONAL)

TÍTULO O GRADO ASOCIADO CON EL TRABAJO:

Médico Cirujano_____

NIVEL ASOCIADO CON EL TRABAJO:

Pre-Grado_____

ÁREA DE ESTUDIO:

Departamento de Medicina_____

INSTITUCIÓN:

Universidad de Oriente – Núcleo de Anzoátegui_____

METADATOS PARA TRABAJOS DE GRADO, TESIS Y ASCENSO:

DERECHOS

De acuerdo con el artículo 44 del reglamento de trabajo de grado: _____

“Los trabajos de grado son de exclusiva propiedad de la Universidad de Oriente y sólo podrán ser utilizados a otros fines con el consentimiento del consejo de núcleo respectivo, quien lo participará al Consejo Universitario”. _____

Ruiz C., Carolina A.

AUTOR

Ruiz C., Carolina C.

AUTOR

De Sousa, Leonardo

JURADO

González, Raúl

JURADO

Borges, Adolfo

ASESOR

Kiriakos, Demetrio

CO-ASESOR

Dra. María Ovalles.

Coordinador de la Comisión de Trabajo de Grado

POR LA SUBCOMISION DE TESIS