



UNIVERSIDAD DE ORIENTE  
NUCLEO DE ANZOATEGUI  
ESCUELA DE CIENCIAS DE LA SALUD  
DEPARTAMENTO DE MEDICINA INTERNA

DOSIS LETAL 50 DEL VENENO DE BOTHROPS VENEZUELENSIS Y  
BOTHROPS COLOMBIENSIS (SERPENTES, VIPERIDAE) EN RATONES  
NMRI Y BALBC

Trabajo presentado por

Br. Méndez A. Ruth M.

C.I. 15.417.858

Br. Moreno R. María F.

C.I. 16.473.565

Como requisito parcial para optar al título de **MÉDICO CIRUJANO**

Barcelona, Marzo de 2009



UNIVERSIDAD DE ORIENTE  
NUCLEO DE ANZOATEGUI  
ESCUELA DE CIENCIAS DE LA SALUD  
DEPARTAMENTO DE MEDICINA INTERNA

DOSIS LETAL 50 DEL VENENO DE BOTHROPS VENEZUELENSIS Y  
BOTHROPS COLOMBIENSIS (SERPENTES, VIPERIDAE) EN RATONES  
NMRI Y BALBC

Tutor  
Prof. Kiriakos Demetrio

Como requisito parcial para optar al título de **MÉDICO CIRUJANO**

Barcelona, Marzo de 2009



UNIVERSIDAD DE ORIENTE  
NUCLEO DE ANZOATEGUI  
ESCUELA DE CIENCIAS DE LA SALUD  
DEPARTAMENTO DE MEDICINA INTERNA

DOSIS LETAL 50 DEL VENENO DE BOTHROPS VENEZUELENSIS Y  
BOTHROPS COLOMBIENSIS (SERPENTES, VIPERIDAE) EN RATONES  
NMRI Y BALBC

Jurado

Prof. D'Sousa, Leonardo

Prof (a). Ovalles, María

Como requisito parcial para optar al título de **MÉDICO CIRUJANO**

Barcelona, Marzo de 2009



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

## **DECLARACIÓN JURADA**

El Trabajo de Grado presentado por los bachilleres **Méndez Acosta, Ruth María C.I: 15.417.858** y **Moreno Romero, María Fernanda C.I: 16.473.565**, titulado: **“DOSIS LETAL 50 DEL VENENO DE *Bothrops colombiensis* Y *Bothrops venezuelensis* (SERPENTES, VIPERIDAE) EN LOS MODELOS MÚRIDOS NMRI Y BALBc”**, ha sido aprobado por el Jurado Evaluador quienes lo han encontrado correcto en su contenido y forma de presentación, asimismo, declaran que los datos presentados son responsabilidad exclusiva de su autor, en fe de lo cual firman:

Prof. D'Sousa, Leonardo

**Presidente**

Prof (a). Ovalles, María

**Miembro Principal**

Prof. Kiriakos, Demetrio

**Segundo Miembro Principal/Asesor**

Dra. María Ovalles

**Presidenta de la Comisión Trabajo de Grado**

**Escuela Ciencias de la Salud**

## **AGRADECIMIENTOS**

A la Universidad de Oriente por abrirnos sus puertas y permitir nuestra formación como profesionales dentro de sus aulas.

Al Serpentario de la Universidad de Oriente, Núcleo Anzoátegui por habernos facilitado el acceso al material biológico necesario para el desarrollo de este trabajo de investigación.

Al Centro de Investigaciones en Ciencias de Salud (CICS) del centro de Investigaciones Tecnológicas de Oriente (CITO) por habernos permitido el uso de sus instalaciones y equipos para la realización de los experimentos de este trabajo.

Al Dr. Demetrio Kiriakos por aceptarnos como tesisistas y guiarnos en la ejecución de este trabajo de investigación, por ser más que un profesor, un amigo, quién nos ofreció parte de su sabiduría en instruir más que a la mente al alma, sintiéndolo como un modelo a seguir en el sentido profesional y humano, por eso y más, nuestro eterno agradecimiento.

Al Dr. Leonardo De Sousa por toda la colaboración brindada durante la realización de este trabajo de investigación, así como por sus consejos y enseñanzas, llenándonos no sólo de conocimientos, sino de experiencias que enriquecen nuestra mente y espíritu, haciéndonos mejores en nuestro desempeño como estudiantes y en un futuro no muy lejano como MÉDICOS.

Al Dr. Pedro Parrilla por habernos permitido realizar la liofilización del veneno de las serpientes, en el Laboratorio de Alacranología de la UDO, Núcleo Bolívar.

Y a todos los que de alguna u otra forma contribuyeron con la realización de nuestra tesis.

## DEDICATORIA

A **DIOS** por haberme permitido vivir y por brindarme sabiduría, salud y paciencia para lograr alcanzar con éxito esta meta trazada.

A mis **padres** Armando y Yajaira a quienes les debo todo lo que soy, gracias por enseñarme humildad, bondad y todas aquellas cosas que me hicieron cada día una mejor persona. Su amor incondicional e infinito fue, es y será siempre un pilar fundamental para mí vida. **Mami**, este triunfo es para ti, siempre has sido un ejemplo a seguir, espero llegar a ser algún día una mujer tan completa como tú. **LOS QUIERO....!!!**

A mi **hijo** Gabriel Alejandro por haber llegado a mi vida y llenarla de mucha alegría y amor; por permitirme vivir esta experiencia tan maravillosa de ser madre. **TE AMO.**

A mi **esposo** Johan por ser esa persona incondicional que siempre está a mi lado, por darme fuerza y aliento cuando pensé que ya no podría seguir adelante y por darme todo tu amor. **TE AMO OSO.**

A mi **hermano** Ronmel y **mis sobrinos** Eguibel, Brian y Ronni por apoyarme siempre y llenar mi vida de alegría.

A mi tío **Giovanni**, por ser siempre una persona tan importante e influyente en mi vida. Sé que estas en el cielo con Dios y por eso no puedes estar a mi lado en este momento tan importante. **TE EXTRAÑO.**

A **mama Sunay** por ser un ejemplo a seguir, por tu fuerza tanto humana como espiritual, eras un ángel aquí en la tierra, ahora estas descansando en los brazos de Dios.

A mis amigas **Ana Carolina, Marielis y Marta** por ser esas hermanas que Dios no me dio, gracias por estar a mi lado en los momentos buenos y malos, por hacer más alegre y grato este largo camino que hemos recorrido juntas para alcanzar cada una de nuestras metas.

A **Bertha, Mafer, Airamys, Mayu, Marly, Yasmin** por ser amigas incondicionales y demostrarme su gran corazón y calidad humana.

A personas fundamentales en mi formación como médico: **Dr. KiriaKos, Dr. Orta, Dra. Droz, Dr. Vieira, Dr. Molina, Dr. C. Gómez y la Dra. Cedeño**, mi respeto, cariño y admiración.

A mi compañera de tesis **María Fernanda** por ser mas que una compañera de clases una amiga, por estar presente en todos los momentos importantes de mi vida y tener una calidad humana increíble. Por ayudarme a realizar este proyecto y alcanzar esta meta, para ti mi respeto y admiración amiga.

A todas aquellas personas que de alguna u otra manera han influido en mi vida y contribuyeron a alcanzar esta meta. GRACIAS!!!!

**Ruth M. Méndez A.**

## DEDICATORIA

A **Dios** todo poderoso, por guiarme hacia el camino del bien.

A mis queridos padres, **Julián y Esther** por ser el mejor ejemplo a seguir, por todo el apoyo, el cariño y la comprensión que me ha brindado en la realización de mis metas.

A mis hermanos, **Mariesther, Rafa y Olyme** por su apoyo y amistad incondicional.

A todos mis profesores, en especial al: **Dr. Kiriakos, Dra. Droz y Dr. De Sousa**, por enseñarme y prepararme durante mi carrera de formación como Médico para un futuro lleno de triunfos.

A **Ruth**, mi compañera de tesis, por el apoyo y constancia puesta para realizar con éxito nuestro trabajo de investigación.

A mis **amigos**, personas incondicionales que han compartido conmigo momentos buenos y malos, por ser parte importante en mi vida.

**María F. Moreno R.**

## ÍNDICE

DECLARACIÓN JURADA .....	iv
AGRADECIMIENTOS .....	v
DEDICATORIA .....	vii
ÍNDICE .....	x
RESUMEN.....	xii
INTRODUCCIÓN .....	13
CAPITULO: EL PROBLEMA .....	16
1.1 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA .....	16
1.2 OBJETIVOS .....	18
1.2.1 Objetivo General .....	18
1.2.2 Objetivos Específicos.....	18
CAPITULO II: MARCO TEORICO .....	19
2.1 Crotalinae .....	19
2.2 Consecuencias del Síndrome de Envenenamiento Ofídico.....	20
2.3 Neurotoxinas .....	24
CAPITULO III: MARCO METODOLOGÍCO .....	26
3.1 Tipo de Investigación .....	26
3.2 Variables .....	26
3.3 Materiales.....	27
3.4 Procedimiento .....	28
CAPITULO IV: ANALISIS Y PRESENTACION DE RESULTADOS .....	31
4.1 RESULTADOS.....	31
4.2 DISCUSION .....	50
CAPITULO V: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES .....	59
5.1 CONCLUSIONES .....	59
5.2 RECOMENDACIONES.....	60

METADATOS PARA TRABAJOS DE GRADO, TESIS Y ASCENSO:..... 1

## RESUMEN

**Dosis letal 50 del veneno de *Bothrops venezuelensis* y *Bothrops colombiensis* (Serpentes, Viperidae) en ratones NMRI y BALBc. Méndez A, Ruth M; Moreno R, María F y Kiriakos, Demetrio. Universidad de Oriente, Núcleo de Anzoátegui. 2009.**

Se determinó la DL-50 del veneno de ejemplares adultos de *Bothrops venezuelensis* y *Bothrops colombiensis* (serpientes pertenecientes al género de mayor importancia médica en el continente sur-americano) en los modelos múridos NMRI y BALBc por vía intraperitoneal y para una hora de observación. La DL-50 del veneno de *B. colombiensis* fue mayor (DL-50 = 17,90 mgKg<sup>-1</sup> de ratón BALBc y 16,82 mgKg<sup>-1</sup> de ratón NMRI); por lo que el veneno de *B. venezuelensis* es significativamente más potente (DL-50 = 14,99 mgKg<sup>-1</sup> de ratón BALBc y 15,96 mgKg<sup>-1</sup> de ratón NMRI). No se encontraron diferencias significativas al evaluar la sensibilidad al veneno de ambas especies de los modelos múridos en estudio. Las manifestaciones clínicas inducidas por el veneno de ambas serpientes fueron similares en ambas cepas de ratón presentándose en un 100% manifestaciones como taquipnea, hipoactividad y postración y no encontrándose diferencias importantes en la frecuencia de aparición y síntomas entre ambas cepas de ratón. Se determinó que la cepa de ratón que ameritó mayor gasto de ambos venenos fue NMRI y la cepa cuyo consumo de veneno fue menor fue BALBc. Al comparar estos resultados con estudios previos realizados en la cepa C57bl/6; se sugiere que esta última, es la cepa de ratón más adecuada para investigaciones de esta índole.

## INTRODUCCIÓN

El accidente ofídico representa un importante problema de salud pública en las zonas tropicales y subtropicales del mundo. Se estima que a lo largo del mundo, cada año más de 2,5 millones de personas son atacadas por serpientes venenosas resultando en alrededor de 120 000 muertes en las regiones tropicales de Asia, África y América Latina, afectando con mayor frecuencia a la población de trabajadores rurales, sobre todo a campesinos jóvenes que se encuentran en plena actividad productiva (Pirela y col, 2006). Sin embargo, existe un importante subregistro de esta patología, según estadísticas reportadas por la Organización Mundial de la Salud cada año mueren en el planeta entre cuarenta y cincuenta mil personas, víctimas del envenenamiento provocado por la mordedura de serpientes venenosas, a pesar de los recursos terapéuticos de la medicina actual (Lancini, 1986).

De acuerdo a los datos proporcionados por la Dirección de Epidemiología y Análisis Estratégico (DEAE) del Ministerio del Poder Popular para la Salud (MPPS) de Venezuela, dividida por entidades federales, se estimó que en el país para el lapso entre 1999-2004 se presentaron entre 6 000 y poco más de 7 000 casos anuales de envenenamiento ofídico, siendo el estado Zulia la entidad federal con mayor tasa de morbilidad y en la que las mordeduras por serpientes de cascabel son muy frecuentes.

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 mayor número de accidentes ofídicos provoca seguido por el género *Crotalus* (Colimodio y col, 1993).

Las serpientes son animales que pertenecen al Filo de los cordados, es decir, que poseen columna dorsal y simetría bilateral. Forman parte del grupo de los Vertebrados por tener un endoesqueleto y un cráneo que envuelve al encéfalo. Están ubicadas en la Clase de los Reptiles por tener un corazón con tres cavidades, respiración pulmonar y temperatura corporal variable (poiquilotermos) y se les ha incluido dentro del Orden de los Escamosos porque tienen el cuerpo totalmente cubierto de escamas epidérmicas (Lancini, 1986).

A nivel mundial se han identificado alrededor de 3 000 especies, que han sido agrupadas científicamente en diecinueve familias, de las cuales, únicamente tres se consideran venenosas, encontrándose en este grupo alrededor de 700 especies y subespecies (Campbell y Lamar, 2004).

De las casi tres mil especies de serpientes existentes en el mundo, aproximadamente 700 son conocidas como venenosas y clasificadas de acuerdo con sus características morfológicas, comprendidas en cinco familias: Crotalidae, Viperidae, Elapidae, Hydrophiidae y Colubridae (Barraviera, 1994). Cabe destacar que la mayoría de los autores consideran a los hidrófidos una subfamilia de Elapidae (Hydrophinae), a los crotálidos una sub-familia de Viperidae (Crotalinae) y que en la familia Colubridae las serpientes venenosas son opistoglifas, las cuales, en general, son poco peligrosas para el humano (Campbell y Lamar, 2004).

Hasta hace poco en Venezuela se conocían 142 especies y subespecies de serpientes, agrupadas en 7 familias, encontrándose distribuidas en toda la geografía nacional. De estas siete familias solamente dos son venenosas: Elapidae y Viperidae, existiendo algunos colúbridos levemente venenosos también. El número de serpientes venenosas es de veinticinco (25) especies y subespecies (Lancini y Kornacker, 1989).

La distribución geográfica de las serpientes está relacionada con su comportamiento bio-ecológico. Así las de los géneros *Bothrops* y *Lachesis* se ubican en regiones húmedas del piso tropical y subtropical, piedemontes, márgenes de ríos y quebradas. Son serpientes agresivas y provocan accidentes graves (Lancini, 1979); mientras que *Crotalus* y *Micrurus* se encuentran preferiblemente en sabanas, piedemontes y regiones xerófilas (Rodríguez-Acosta y col, 1998).

En nuestro país las serpientes de las familias Elapidae (serpientes de coral) y Viperidae (serpientes de cascabel, mapanares y cuaima) representan un número minoritario entre los ofidios del país, pero muchas de éstas son de alta peligrosidad (Lancini, 1986).

## CAPITULO: EL PROBLEMA

### 1.1 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

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. Los daños mencionados son producidos por algunos componentes del veneno como son las miotoxinas, que afectan a las fibras musculares, las hemorráginas que alteran la microvasculatura local y sistémica, así como otras sustancias que provocan edema con incremento de la presión tisular local (Rodríguez-Acosta, 1995).

Por otra parte los venenos estudiados se pueden dividir en 3 grupos: a) muy edematizantes (*B. jararaca* y *B. jararacussu*), b) medianamente edematizantes (*B. neuwiediidiporus* y *B. alternatus*) y c) con escasa actividad edematizante (*Crotalus durissus terrifucus*) (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).

Las metaloproteinasas son los factores responsables de hemorragia que amenazan la vida debido a la hemorragia sistémica espontánea que provoca el envenenamiento por serpientes de la familia Viperidae. Ellas pueden contener desintegrinas y dominios de cisteína nck (ej. lararkagina del veneno de la *B. jararaca*) (Campbell y Lamar, 2004).

Los estudios de los mecanismos locales del tejido dañado causado por el veneno de *B. asper* han demostrado que los inhibidores de la metaloproteinasa como el batimastat pueden prevenir algunos daños de tejidos locales (Escalante y col, 2000. Revisado en Campbell y Lamar, 2004).

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). Investigadores de nuestra universidad de igual forma se han dedicado a la realización de este tipo de estudios utilizando para ello la cepa de ratón C57bl/6 (Blanco y Rojas, 2005; Astudillo y Bejarano, 2008) la cual a pesar de poseer características que facilitan su evaluación bajo condiciones de laboratorio presentan baja accesibilidad y son difíciles de criar y mantener. Es por ello que en este trabajo fueron planteadas las siguientes interrogantes: ¿Cuán variables pueden ser los resultados que por años se han obtenido utilizando la cepa de ratón C57bl/6, al emplear cepas diferentes cuyas condiciones de crianza, mantenimiento y alimentación son mucho más accesibles, como lo son las cepas NMRI y BALBc? y ¿Serán igual de susceptibles estos ratones al veneno de las serpientes?

## 1.2 OBJETIVOS

### 1.2.1 Objetivo General

- Determinar la DL-50 del veneno de *Bothrops venezuelensis* y *Bothrops colombiensis* en los modelos múridos NMRI y BALBc y comparar la DL-50 y las manifestaciones clínicas con las previamente establecidas en el modelo múrido C57bl/6.

### 1.2.2 Objetivos Específicos

- 1 Calcular la DL-50 del veneno de *Bothrops venezuelensis* y *Bothrops colombiensis* en los modelos múridos NMRI y BALBc por vía intraperitoneal y para una hora de observación.
- 2 Comparar las DL-50 y las manifestaciones clínicas del veneno de *Bothrops venezuelensis* y *Bothrops colombiensis* en estos modelos múridos con las previamente establecidas en el modelo C57bl/6.
- 3 Cotejar la variabilidad en los resultados de los experimentos de DL-50 establecidas en estos tres modelos múridos.
- 4 Determinar cuál de los modelos múridos (NMRI, BALBc, C57bl/6) resulta el más apropiado para seguir realizando estos estudios.

## CAPITULO II: MARCO TEORICO

### 2.1 Crotalinae

La Sub-familia Crotalinae está representada por serpientes de colores opacos que poseen como característica común un órgano termoreceptor o foseta loreal, el cual, corresponde a un orificio situado entre las narinas y el ojo de la serpiente; son solenoglifas, es decir, presentan un par de colmillos retráctiles inoculadores de veneno, hacia la parte anterior del maxilar (Rodríguez-Acosta, 1995). En su mayoría son ovovivíparas y de hábitos diversos; se encuentran más de 80 especies distribuidas en América, Europa, Asia y África (Lancini, 1986). En Venezuela pertenecen a esta sub-familia las serpientes llamadas coloquialmente “mapanares o macaguas”, “cascabeles” y “cuaimas”, las cuales se agrupan en seis géneros: *Bothrops*, *Bothriechis*, *Bothroiopsis*, *Porthidium*, *Crotalus* y *Lachesis* (Rodríguez-Acosta, 1995).

El género *Bothrops* está representado por serpientes de hábitos nocturnos (salvo excepciones) y terrícolas o arborícolas, que poseen un veneno hemotóxico. 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 “guayacan” o “mapanare terciopelo” (*Bothrops 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. *Bothrops colombiensis* es la serpiente que causa el mayor número de accidentes fatales en nuestro país. 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 (Lancini, 1986).

Otra especie, *Bothrops venezuelensis* es de hábitos nocturnos y prefiere vivir en los bosques húmedos subtropicales de la Cordillera de la Costa, se alimenta especialmente de roedores, lagartos y ranas (Lancini, 1986).

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 polipeptidos. 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. Las hialuronidasas, presentes en todos los venenos de serpientes, promueven la extensión de otros componentes del veneno a través de los tejidos (Campbell y Lamar, 2004).

## **2.2 Consecuencias del Síndrome de Envenenamiento Ofídico**

Las consecuencias del síndrome de envenenamiento ofídico en diversos países han sido subestimadas, nunca verdaderamente registradas en estadísticas de salud y mayormente tratadas con metodologías pasadas de moda y procedimientos inefectivos. La severidad de este envenenamiento y la mortalidad no despreciable entre las víctimas, que no sólo son del tercer mundo, sino que incluye a países industrializados como Estados Unidos y Australia, ha provocado en los últimos años,

un acentuado interés en investigar este síndrome y los efectos de los venenos ofídicos (Rodríguez-Acosta, 1995).

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 enzimas y proteínas, y su acción letal es atribuida principalmente a las neurotoxinas (Barraviera, 1994).

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).

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 NAD nucleosidasas. 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 en la actividad de las neurotoxinas, citotoxinas, miotoxinas, cardiotoxinas y los inhibidores de agregación plaquetaria llamados desintegrinas (Markland, 1998).

En lo que respecta a las actividades hemorrágicas y proteolíticas de serpientes suramericanas (Monterrey, 2000), ellas existen casi exclusivamente en los venenos botrópicos y lachésicos. Sin embargo, en los últimos años, se han comenzado a

describir estas actividades en algunas especies de crótalos venezolanos (Rodríguez-Acosta y col, 1998; 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 componentes citotóxicos y fibrinolíticos, los cuales producen necrosis y hemorragias en tejido nervioso y por supuesto, en otros tejidos (Gutiérrez y col, 1980).

El veneno contiene sólo una pequeña cantidad de aminoácidos libres. También están presentes varios péptidos ricos en prolina que potencian su acción sobre la bradiginina. Una secuencia de tres péptidos potenciadores de la bradiginina fueron identificados en el veneno de *Agkistrodon halys blomhoffii* y uno de esos péptidos fue aislado del veneno de *Bothrops jararaca* por Ferreira y col (Revisado en Barraviera, 1994). La fosfolipasa A<sub>2</sub> es una enzima comúnmente encontrada en el veneno de las familias Hydrophidae, Elapidae, Viperidae y Crotalidae. Es una enzima 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 A<sub>2</sub> 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. La crotamina y las miotoxinas tienen afinidad por los canales de  $\text{Na}^+$  dependientes de voltaje (Campbell y Lamar, 2004).

Algunas serpientes Viperidae contienen enzimas de tipo hemorraginas tales como: batroxobina de *Bothrops asper*, *B. marajoensis* y *B. moojeni*; reptilasa de *B. atrox* y mutasa de *Lachesis muta* (Kamiguti y col, 1991. Revisado en Rodríguez-Acosta, 1998).

Los venenos usualmente contienen más de un tipo de proteasas, por lo menos cinco tipos diferentes han sido observados electroforéticamente. El veneno de la subfamilia 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), 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).

### 2.3 Neurotoxinas

Las neurotoxinas son componentes clásicos del veneno, que afectan particularmente la unión neuromuscular y producen una parálisis flácida. Sin embargo, no todas las neurotoxinas tienen el mismo sitio ni modo de acción o producen similares efectos clínicos (Rodríguez-Acosta, 1995).

De acuerdo al sitio de acción pueden ser neurotoxinas presinápticas de la unión neuromuscular, que afectan el axón terminal, por un mecanismo no entendido totalmente. Producen ruptura de vesículas sinápticas, daño al axón terminal y cese de la descarga de acetilcolina, bloqueando completamente la transmisión neuromuscular. Esto causa parálisis flácida de los músculos afectados. Sin embargo, el proceso no es instantáneo. Inicialmente causa una descarga de acetilcolina, con algunas contracciones musculares, raramente notadas clínicamente, antes de pasar a destruir vesículas y bloquear la descarga de este neurotransmisor. Estas neurotoxinas han sido descritas en serpientes americanas, como *Crotalus* spp (crotoxina, crotamina), *Micrurus* spp (alpha y beta-neurotoxina) y *Lachesis* spp. Además en serpientes de otras áreas geográficas como los elápidos en Australia (notexina, taipoxina, textilotoxina y  $\beta$ -bungarotoxina). Todas ellas probablemente relacionadas a la familia de las fosfolipasas, aunque altamente evolucionadas y algunas veces con múltiples componentes (Rodríguez-Acosta, 1995).

La primera neurotoxina de serpiente que alguna vez se aisló fue la crotoxina, proveniente del veneno del *Crotalus durissus terrificus*. La crotoxina consiste en un

componente B básico (fosfolipasa) de 12 kDa, y uno ácido, componente A (crotapotina) de 10 kDa (Campbell y Lamar, 2004).

Estas toxinas tienen una acción trifásica, donde inicialmente hacen inhibición, luego facilitación y finalmente, bloqueo de la liberación de acetilcolina (Marlas y Bon, 1982. Revisado en Campbell y Lamar, 2004).

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).

## CAPITULO III: MARCO METODOLOGÍCO

### 3.1 Tipo de Investigación

La investigación fue de tipo comparativa-investigativa. En el presente trabajo se determinaron la DL-50 y manifestaciones clínicas del veneno de especies *Bothrops venezuelensis* y *Bothrops colombiensis* en los modelos múridos NMRI y BALBc por vía intraperitoneal para una hora de observación y se compararon con las previamente establecidas en el modelo múrido C57bl/6.

### 3.2 Variables

**Independientes:** - Los modelos múridos NMRI y BALBc.

- Los venenos de las especies *Bothrops venezuelensis* y *Bothrops colombiensis*.

**Dependientes:** La susceptibilidad de cada uno de los modelos múridos al veneno de ambas especies de serpientes.

### 3.3 Materiales

- Veneno de las especies *Bothrops venezuelensis* y *Bothrops colombiensis* preparado en forma de “pool” con cinco ejemplares de *B. colombiensis* (1 macho y 4 hembras) y siete ejemplares de *B. venezuelensis* (3 machos y 4 hembras), todos adultos.
- Ratones albinos de las cepas múridas NMRI y BALBc.
- 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 analítica Sartorius®, modelo Handy.
- 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

#### 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 fueron extraídas 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 muerda al plástico naturalmente, mientras que se le realizaban suaves masajes sobre las glándulas productoras de veneno, las cuales, se encuentran en la parte postero-lateral de la cabeza, para así dejar en el recipiente una pequeña cantidad de veneno. Posteriormente el veneno extraído fue colocado en tubos de ensayo y refrigerado a -20°C para su uso. El tratamiento inicial consistió en desecarlo al frío (Liofilizador Labconco®) y antes de su utilización fue pesado en una balanza analítica (Sartorius®), reconstituido en solución salina (0,9%) a una concentración de 10 mg/ml y almacenado en tubos Eppendorf® de 1,5 ml de capacidad.

#### 2.- Determinación de la dosis letal.

La dosis letal 50 medida como la potencia de una sustancia tóxica, se define como aquella cantidad de veneno necesaria para causar la muerte a la mitad de los ratones inyectados con el veneno. Ésta se determinó por el método secuencial de aumentar y disminuir la dosis de Dixon y Mood (1948) modificado por Sevcik, (1987). El veneno fue inyectado por vía intraperitoneal (VIP) con una microjeringa de

50 microlitros (Hamilton®) en ratones NMRI y BALBc hembra, previamente pesados en balanza digital (Denver Instrument®, modelo XS-310.D). Para el inicio del experimento, al primer ratón se le administró una dosis inicial  $X_1 = \log^{-1} X$  escogida arbitrariamente y se observó la respuesta en un tiempo definido de observación (una hora).

Si el primer ratón respondió con la muerte, el segundo recibió una dosis calculada como  $X_2 = \log^{-1} (X - d)$  donde  $d$  es un factor arbitrario constante ( $d=0,05$ ). Si por el contrario el primer ratón sobrevive, al segundo murido se le administra una dosis calculada como  $X_2' = \log^{-1} (X + d)$ . Se continuó con el experimento hasta encontrar el primer fenómeno vida – muerte o muerte – vida que representó el punto de inflexión, a partir del cual, se inició 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” sobrevive a la dosis anti- $\log X_m$ . El muestreo se detuvo al obtener una secuencia similar a +0+0+0+ \* ó 0+0+0+0\*, donde (+) indica muerte, (0) indica sobrevivencia y (\*), la dosis que deberá ser administrada al siguiente ratón definido como “punto final”. La corrida válida se considero completa al obtener cuatro ciclos de muerte – no muerte.

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

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

### 3.- 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 fueron procesados 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 Kruskal-Wallis. Se considero un nivel de significancia  $p < 0,05$ .
- Se calculó el Índice de Variabilidad (IV) según la fórmula  $IV = \frac{\text{Límite superior} - \text{Límite inferior}}{\text{Mediana}} \times 100$ .

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

### **4.1 RESULTADOS**

Para el cálculo de la Dosis Letal Cincuenta (DL-50) del veneno de los ejemplares adultos de *Bothrops colombiensis* y *Bothrops venezuelensis*, se emplearon un total de 31 ratones de la cepa BALBc y 29 de la cepa NMRI, con un peso comprendido entre 15 – 27 g y 14 – 37 g respectivamente.

En la tabla 1, se muestran los datos para el cálculo de DL-50 del veneno de *B. colombiensis*, ejemplares adultos en el modelo múrido BALBc para 60 minutos de observación, donde el ratón N° 1 representa la corrida no válida y el ratón N° 2 representa el primer punto de inflexión e inicia la corrida válida. En este experimento fueron necesarios 15 ratones con un peso promedio de 22,40 g por unidad de ratón.

Tabla 1.

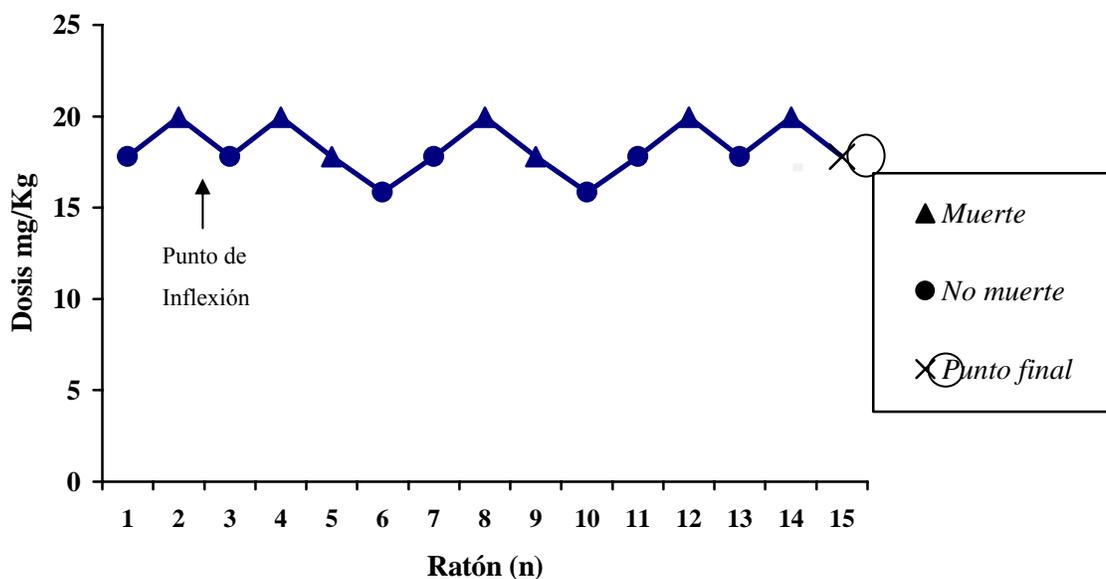
Datos para el cálculo de DL-50 del veneno de *B. colombiensis*, BALBc, ♀, VIP, 60 min.

<i>Ratón</i> ( <i>n</i> )	<i>Peso</i> ( <i>g</i> )	<i>Dosis</i> ( <i>Anti-log</i> )	<i>Dosis</i> ( $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ )	<i>Dosis Total</i> ( $\mu\text{g}$ )	<i>Volumen</i> ( $\mu\text{l}$ )	<i>Muerte</i> ( <i>minutos</i> )
<i>Corrida No Válida</i>						
1	23,4	1,25	17,78	416,05	26,00	0
<i>Corrida Válida</i>						
2	21,12	1,30	19,95	421,34	26,3	†: 31'
3	19,42	1,25	17,78	345,28	21,58	0
4	23,09	1,30	19,95	460,64	28,79	†: 45'
5	22,36	1,25	17,78	397,56	24,8	†: 50'
6	22,30	1,20	15,85	353,45	22,00	0
7	19,9	1,25	17,78	353,82	22,11	0
8	19,75	1,30	19,95	394,01	24,62	†: 43'
9	25,6	1,25	17,78	455,16	28,44	†: 32'
10	26,9	1,20	15,85	426,36	26,64	0
11	21,2	1,25	17,78	376,93	23,55	0
12	25,96	1,30	19,95	517,90	32,36	†: 41'
13	20,25	1,25	17,78	360,04	22,50	0
14	22,56	1,30	19,95	450,07	28,12	†: 46'
15	22,3	1,25	17,78	396,49	24,78	⊗
<i>Total</i>				6125,10	382,59	

†: muerte    0: no muerte    ⊗ : punto final

Control: 20,50 g de peso corporal; inyectado VIP con 50  $\mu\text{l}$  de solución fisiológica.

En el gráfico 1, se muestra la representación de los datos válidos para el cálculo de la DL-50 del veneno de ejemplares adultos de *B. colombiensis*, en el modelo múrdo BALBc. Se utilizaron 15 ratones con pesos comprendidos entre 19,4 y 26,9 g. A partir del primer punto de inflexión (ratón N° 2, a una dosis de veneno de 19,95  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ) se inicia la corrida válida, los siguientes cuatro (4) ciclos se toman como referencia para el cálculo de los resultados a expresarse como la mediana y sus límites de confianza al 95%. La DL-50, VIP, 60 minutos, fue de 17,90  $\text{mg}\cdot\text{Kg}^{-1}$  de ratón, con límites de confianza entre 17,78 y 18,86  $\text{mg}\cdot\text{Kg}^{-1}$  de ratón; representados en la tabla 1 entre el  $\text{Log}^{-1}$  de 1,25 y 1,30. La cantidad total de veneno de *B. colombiensis* utilizada fue de 6125,10  $\mu\text{g}$  (6,125 mg) correspondiendo 416,05  $\mu\text{g}$  para la corrida no válida y 5709,05  $\mu\text{g}$  para la corrida válida. Igualmente se pudo determinar el Índice de Variabilidad (IV) el cual fue de 6,03%.



DL-50, VIP, 60 min = 17,90 (17,78 - 18,86)  $\text{mg}\cdot\text{Kg}^{-1}$  de ratón.

Gráfico 1.

Determinación de la DL-50 del veneno de *B. colombiensis*, BALBc, ♀, VIP, 60 min.

La tabla 2, muestra los datos para el cálculo de DL-50 del veneno de ejemplares adultos de *B. colombiensis*, en el modelo múrido NMRI para 60 minutos de observación. Se utilizaron 16 ratones con pesos promedio de 23,9 g por unidad de ratón. El ratón número 4 representa el primer punto de inflexión y a partir de él se inicia la corrida válida.

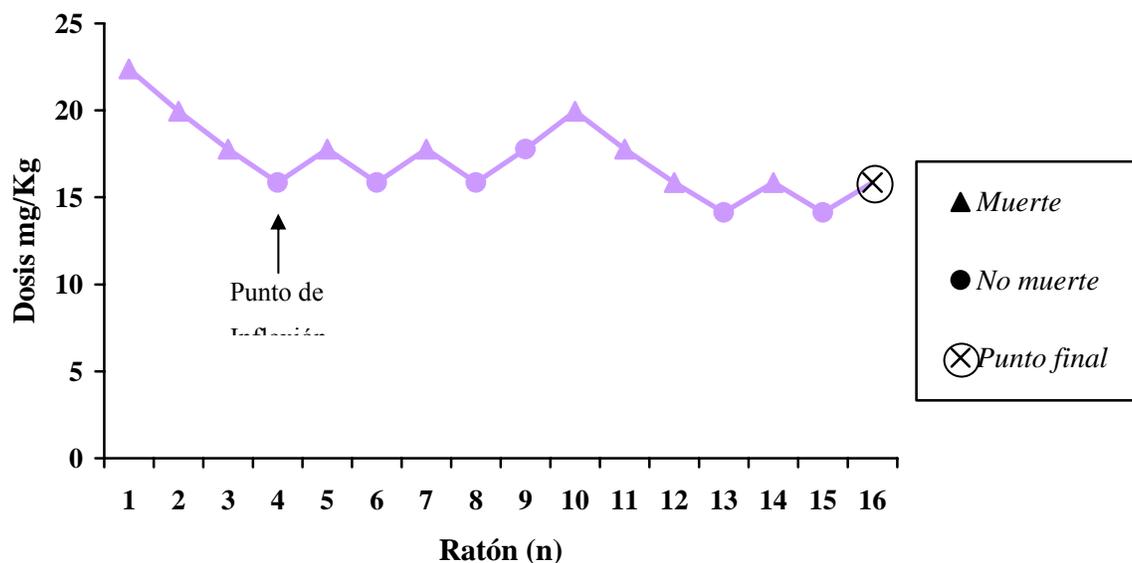
Tabla 2. Datos para el cálculo de DL-50 del veneno de *B. colombiensis*, NMRI, ♀, VIP, 60 min.

Ratón (n)	Peso (g)	Dosis (Anti-log)	Dosis ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )	Dosis Total ( $\mu\text{g}$ )	Volumen ( $\mu\text{l}$ )	Muerte (minutos)
Corrida No Válida						
1	18,32	1,35	22,39	410,18	20,30	†: 40'
2	26,15	1,30	19,95	521,69	25,82	†: 43'
3	26,04	1,25	17,78	462,99	22,92	†: 47'
Corrida Válida						
4	26,7	1,20	15,85	423,19	20,95	0
5	21,18	1,25	17,78	376,58	18,64	†: 25'
6	19,9	1,20	15,85	267,86	13,26	0
7	24,2	1,25	17,78	430,27	21,30	†: 34'
8	17,70	1,20	15,85	280,54	13,88	0
9	14,15	1,25	17,78	251,58	12,45	0
10	25,82	1,30	19,95	515,10	25,50	†: 59'
11	22,16	1,25	17,78	394,00	19,50	†: 41'
12	24,1	1,20	15,85	381,98	18,90	†: 44'
13	29,3	1,15	14,13	414,00	20,49	0
14	29,75	1,20	15,85	471,53	23,34	†: 49'
15	37,1	1,15	14,13	524,22	25,95	0
16	21,3	1,20	15,85	337,60	16,71	⊗
Total				6463,31	319,91	

†: muerte    0: no muerte    ⊗: punto final

Control: 21,35 g de peso corporal; inyectado VIP con 50  $\mu\text{l}$  de solución fisiológica.

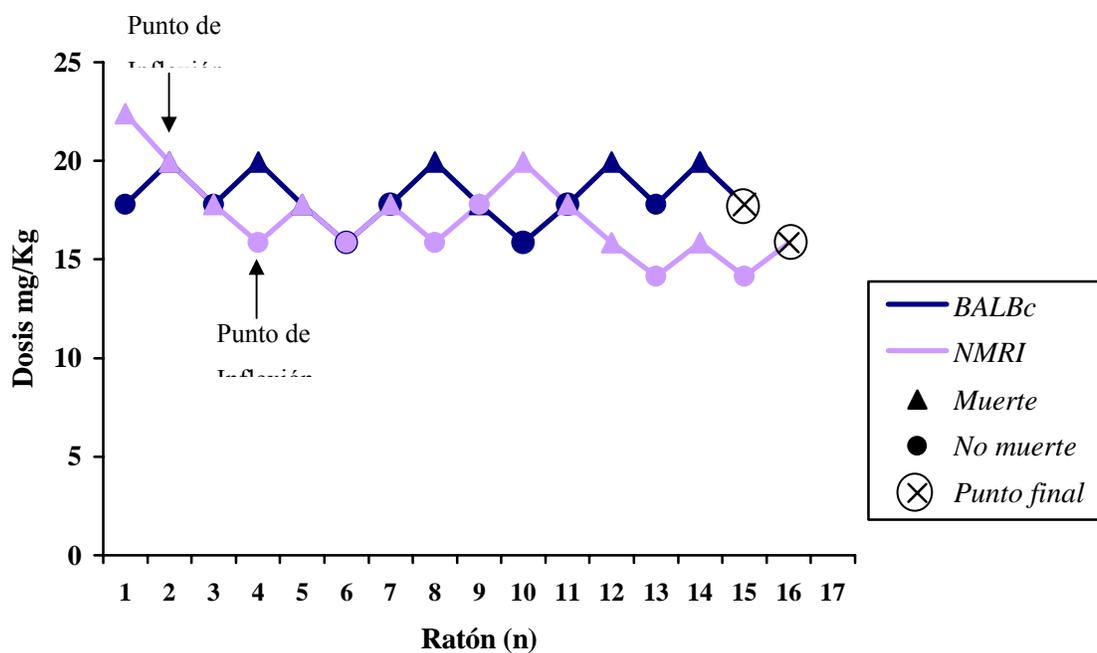
El gráfico 2, muestra la representación de los datos para el cálculo de la DL-50 del veneno de ejemplares adultos de *B. colombiensis*, en el modelo mürido NMRI. Se utilizaron 16 ratones con pesos comprendidos entre 14,15 y 29,75 g. El primer punto de inflexión (ratón N° 4) muestra el inicio de la corrida válida (dosis de veneno de  $15,85 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ), los siguientes cuatro (4) ciclos se toman como referencia para el cálculo de los resultados a expresarse como la mediana y sus límites de confianza al 95%. La DL-50, VIP, 60 minutos, fue de  $16,82 \text{ mg}\cdot\text{Kg}^{-1}$  de ratón, con límites de confianza entre  $15,85$  y  $17,04 \text{ mg}\cdot\text{Kg}^{-1}$  de ratón; representados en la tabla 2 entre el  $\text{Log}^{-1}$  de 1,20 y 1,25. La cantidad de veneno utilizada para la corrida no válida fue de  $1394,86 \mu\text{g}$  y para la corrida válida  $5068,45 \mu\text{g}$  teniendo como total la cantidad de  $6463,31 \mu\text{g}$  ( $6,463 \text{ mg}$ ). El IV fue de 7,07%.



DL-50, VIP, 60 min =  $16,82 (15,85 - 17,04) \text{ mg}\cdot\text{Kg}^{-1}$  de ratón.

Gráfico 2. Determinación de la DL-50 del veneno de *B. colombiensis*, NMRI, ♀, VIP, 60 min.

Al comparar las DL-50 obtenidas del veneno de ejemplares adultos de *B. colombiensis*, sobre las cepas de los modelos múridos BALBc y NMRI, empleando la técnica de análisis de varianza de Kruskal – Wallis, se encontró diferencias significativas en la sensibilidad al veneno de ambos ratones ( $KW = 6,25$ ;  $p = 0,00288$ ); siendo la cepa NMRI más sensible a este veneno. Gráfico 3.



Gráfico 3.

Comparación de la DL-50 del veneno de *B. colombiensis* en los modelos múridos BALBc y NMRI.

La tabla 3, muestra los datos para el cálculo de DL-50 del veneno de ejemplares adultos de *B. venezuelensis*, en el modelo múrdo BALBc para 60 minutos de observación. A partir del ratón número 4, que representa el primer punto de inflexión se inicia la corrida válida. Para este experimento fueron necesarios 18 ejemplares con pesos comprendidos entre 15,5 y 22,5 g.

Tabla 3.

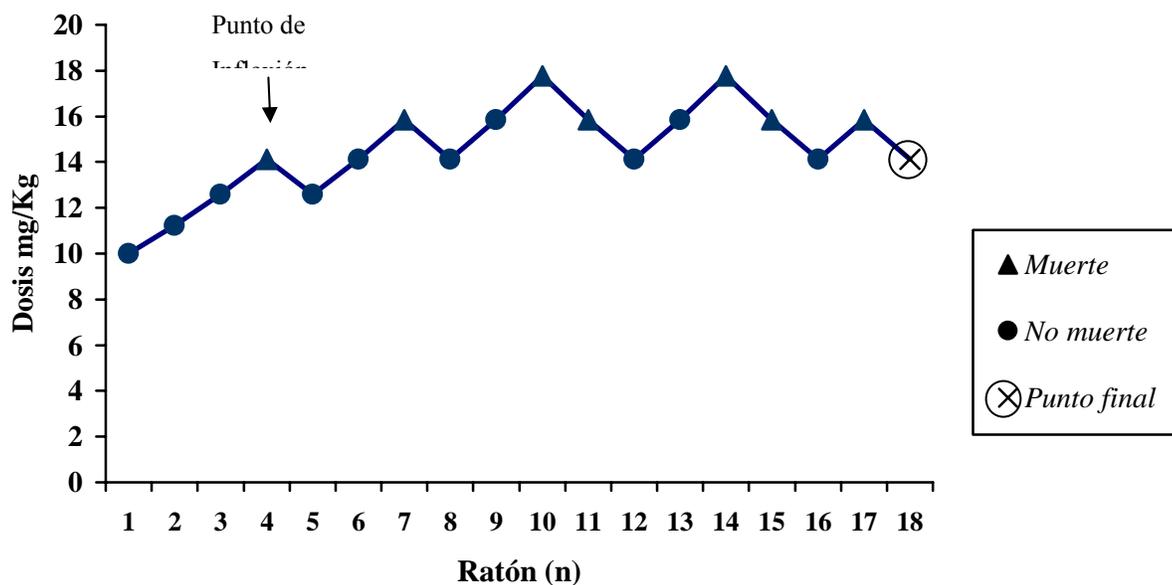
Datos para el cálculo de DL-50 del veneno de *B. venezuelensis*, BALBc, ♀, VIP, 60 min.

Ratón (n)	Peso (g)	Dosis (Anti-log)	Dosis ( $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ )	Dosis Total ( $\mu\text{g}$ )	Volumen ( $\mu\text{l}$ )	Muerte (minutos)
<i>Corrida No Válida</i>						
1	20,66	1	10	206,6	9,06	0
2	19,04	1,05	11,22	213,62	9,36	0
3	15,5	1,10	12,58	194,99	8,55	0
<i>Corrida Válida</i>						
4	19,3	1,15	14,13	272,7	11,96	†: 39'
5	21	1,10	12,58	264,2	11,58	0
6	19,56	1,15	14,13	276,4	12,12	0
7	18,2	1,20	15,85	288,47	12,65	†: 37'
8	19,3	1,15	14,13	276,00	12,10	0
9	19,37	1,20	15,85	307,00	13,43	0
10	22,25	1,25	17,78	395,60	17,35	†: 40'
11	21,40	1,20	15,85	339,19	14,87	†: 24'
12	21,9	1,15	14,13	309,44	13,57	0
13	17	1,20	15,85	269,45	11,81	0
14	18,6	1,25	17,78	330,70	14,50	†: 60'
15	21,4	1,20	15,85	339,19	14,87	†: 54'
16	22,25	1,15	14,13	314,39	13,78	0
17	19,8	1,20	15,85	313,83	13,76	†: 45'
18	21,5	1,15	14,13	303,79	13,32	⊗
<i>Total</i>				5215,56	228,64	

†: muerte    0: no muerte    ⊗: punto final

Control: 20,16 g de peso corporal; inyectado VIP con 50  $\mu\text{l}$  de solución fisiológica.

El gráfico 4, muestra la representación de los datos para el cálculo de la DL-50 del veneno de ejemplares adultos de *B. venezuelensis*, en el modelo múrdo BALBc. A partir del primer punto de inflexión (ratón N° 4, a una dosis de veneno de 14,13  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ) se inicia la corrida válida, los siguientes cuatro (4) ciclos se toman como referencia para el cálculo de los resultados a expresarse como la mediana y sus límites de confianza al 95%. La DL-50, VIP, 60 minutos, fue de 14,99  $\text{mg}\cdot\text{Kg}^{-1}$  de ratón, con límites de confianza entre 14,22 y 15,85  $\text{mg}\cdot\text{Kg}^{-1}$  de ratón; representados en la tabla 3 entre el  $\text{Log}^{-1}$  de 1,15 y 1,20. Se utilizó un total de veneno de 5215,56  $\mu\text{g}$  (5,215 mg) correspondiendo 4600,35  $\mu\text{g}$  a la corrida válida y 615,21  $\mu\text{g}$  a la corrida no válida. El IV fue de 10,87%.



DL-50, VIP, 60 min = 14,99 (14,22 - 15,85)  $\text{mg}\cdot\text{Kg}^{-1}$  de ratón.

Gráfico 4.

Determinación de la DL-50 del veneno de *B. venezuelensis*, BALBc, ♀, VIP, 60 min.

En la tabla 4, se muestran los datos para el cálculo de DL-50 del veneno de ejemplares adultos de *B. venezuelensis*, en el modelo múrido NMRI para 60 minutos de observación. El ratón número 2 representa el primer punto de inflexión para la corrida válida. Se utilizó un total de 16 ratones con pesos promedio de 30,91 g de ratón.

Tabla 4.

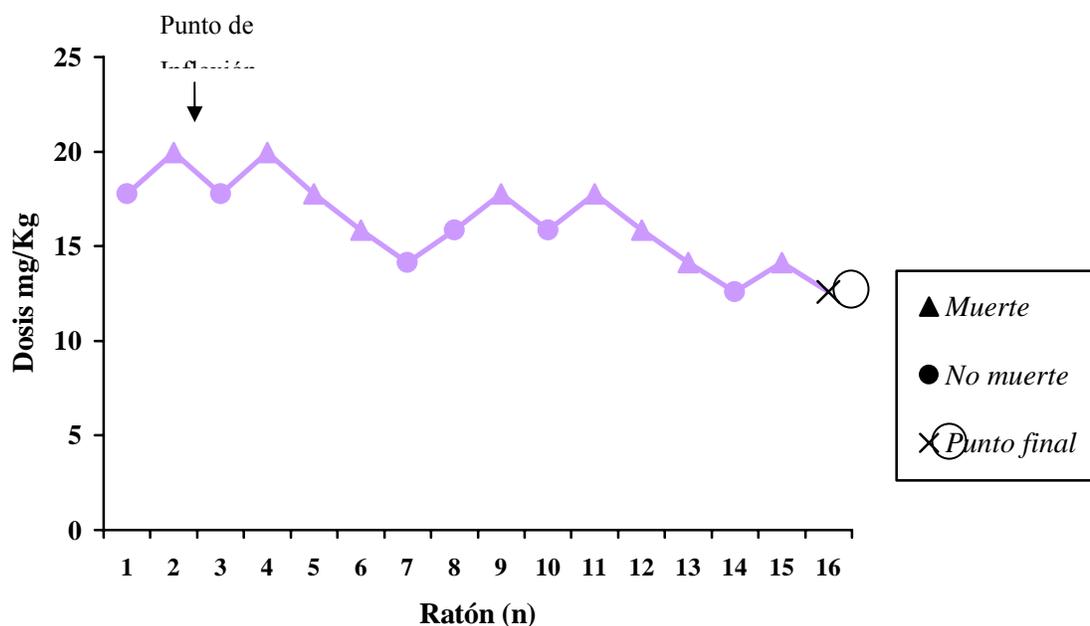
Datos para el cálculo de DL-50 del veneno de *B. venezuelensis*, NMRI, ♀, VIP, 60 min.

<i>Ratón</i> (n)	<i>Peso</i> (g)	<i>Dosis</i> (Anti-log)	<i>Dosis</i> ( $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ )	<i>Dosis Total</i> ( $\mu\text{g}$ )	<i>Volumen</i> ( $\mu\text{l}$ )	<i>Muerte</i> (minutos)
<i>Corrida No Válida</i>						
1	31,71	1,25	17,78	563,80	24,72	0
<i>Corrida Válida</i>						
2	21,35	1,30	19,95	425,93	18,68	†: 40'
3	30	1,25	17,78	533,4	23,39	0
4	29,6	1,30	19,95	590,52	25,9	†: 55'
5	29,60	1,25	17,78	526,28	23,08	†: 16'
6	30,6	1,20	15,85	485,01	21,27	†: 28'
7	37,6	1,15	14,13	531,29	23,30	0
8	31,4	1,20	15,85	497,70	21,82	0
9	25,7	1,25	17,78	456,95	20,04	†: 12'
10	30,6	1,20	15,85	485,01	21,27	0
11	29	1,25	17,78	515,62	22,61	†: 50'
12	35,6	1,20	15,85	564,26	24,75	†: 57'
13	36,45	1,15	14,13	515,03	22,58	†: 18'
14	37,6	1,10	12,58	473,00	20,74	0
15	26,37	1,15	14,13	372,60	16,34	†: 53'
16	31,5	1,10	12,58	396,27	17,38	⊗
<i>Total</i>				7932,67	347,87	

†: muerte    0: no muerte    ⊗: punto final

Control: 26,20 g de peso corporal; inyectado VIP con 50  $\mu\text{l}$  de solución fisiológica.

En el gráfico 5, se muestra la representación de los datos para el cálculo de la DL-50 del veneno de ejemplares adultos de *B. venezuelensis*, en el modelo mürido NMRI. En el primer punto de inflexión (ratón N° 2, a una dosis de veneno de 19,95  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ) se inicia la corrida válida, los siguientes cuatro (4) ciclos se toman como referencia para el cálculo de los resultados a expresarse como la mediana y sus límites de confianza al 95%. La DL-50, VIP, 60 minutos, fue de 15,96  $\text{mg}\cdot\text{Kg}^{-1}$  de ratón, con límites de confianza entre 14,99 y 17,04  $\text{mg}\cdot\text{Kg}^{-1}$  de ratón; representados en la tabla 4 entre el  $\text{Log}^{-1}$  de 1,15 y 1,25. La cantidad de veneno utilizada para la corrida no válida fue de 563,80  $\mu\text{g}$  y para la válida de 7368,87  $\mu\text{g}$  para un total de 7932,67  $\mu\text{g}$  (7,93 mg). El IV fue de 12,84%.

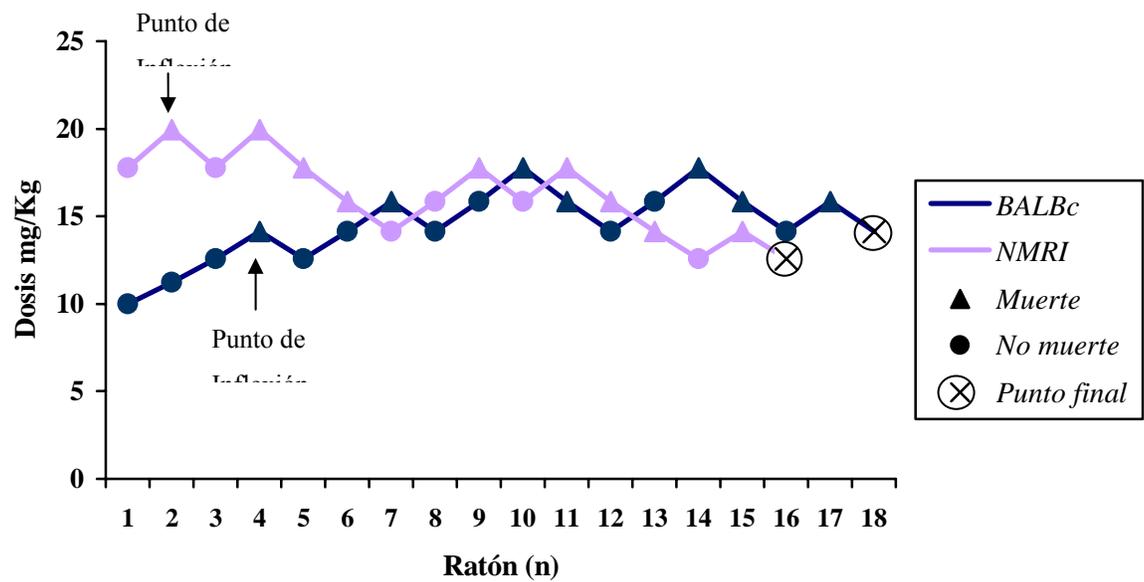


DL-50, VIP, 60 min = 15,96 (14,99 - 17,04)  $\text{mg}\cdot\text{Kg}^{-1}$  de ratón.

Gráfico 5.

Determinación de la DL-50 del veneno de *B. venezuelensis*, NMRI, ♀, VIP, 60 min.

Observando de forma yuxtapuesta, en el gráfico 6, se comparan las DL-50 obtenidas del veneno de ejemplares adultos de *B. venezuelensis*, sobre las cepas de los modelos múridos BALBc y NMRI. El análisis de varianza de KW = 1,21 indica que no hubo diferencias significativas ( $p > 0,05$ ) en la sensibilidad al veneno de ambas cepas de ratón.



Gráfico 6.

Comparación de la DL-50 del veneno de *B. venezuelensis* en los modelos múridos BALBc y NMRI.

La tabla 5, muestra la frecuencia de muerte inducida por la administración del veneno de *B. colombiensis*, en ratones BALBc según la dosis. Se observa que a la dosis de 19,95 mg/kg, todos los ratones (5) fallecieron antes de los 60 min correspondientes, mientras que a la dosis de 17,78 mg/kg 2 murieron antes de los 60 min (33,3%). Cuando se utilizó la dosis de 15,85 mg/kg todos los ratones sobrevivieron.

Tabla 5. Frecuencia de muerte inducida por el veneno de *B. colombiensis*, BALBc, según la dosis administrada por VIP.

<i>Dosis (<math>\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}</math> de ratón)</i>			
<i>Ratón (n)</i>	<i>15,85</i>	<i>17,78</i>	<i>19,95</i>
<i>Corrida No Válida</i>			
1	-	0	-
<i>Corrida Válida</i>			
2	-	-	†: 31'
3	-	0	-
4	-	-	†: 31'
5	-	†: 50'	-
6	0	-	-
7	-	0	-
8	-	-	†: 43'
9	-	†: 32'	-
10	0	-	-
11	-	0	-
12	-	-	†: 41'
13	-	0	-
14	-	-	†: 46'
<i>Punto Final</i>			
15	-	⊗	-
Datos válidos:	0	2	5
N= 7 [†]			
<i>Frecuencia de muerte:</i>		<i>33,33</i>	<i>100</i>

†: Tiempo de muerte en minutos    0: Supervivencia    ⊗: Siguiendo animal

La tabla 6, muestra la frecuencia de muerte inducida por la administración del veneno de *B. colombiensis*, en ratones NMRI. Con la dosis de 19,95 mg/kg, todos los ratones (1) fallecieron antes de los 60 min. Con 17,78 mg/kg fueron inyectados 4 ratones de los cuales 3 murieron antes de los 60 min (75%) y 1 sobrevivió (25%); con la dosis de 15,85 mg/kg 3 sobrevivieron (60%) y 2 murieron (40%) y con la dosis de 14,13 mg/kg ambos sobrevivieron (100%).

Tabla 6. Frecuencia de muerte inducida por el veneno de *B. colombiensis*, NMRI, según la dosis administrada por VIP.

Ratón (n)	Dosis ( $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ de ratón)				
	14,13	15,85	17,78	19,95	22,39
<i>Corrida No Válida</i>					
1	-	-	-	-	†: 40'
2	-	-	-	†: 43'	-
3	-	-	†: 47'	-	-
<i>Corrida Válida</i>					
4	-	0	-	-	-
5	-	-	†: 25'	-	-
6	-	0	-	-	-
7	-	-	†: 34'	-	-
8	-	0	-	-	-
9	-	-	0	-	-
10	-	-	-	†: 59'	-
11	-	-	†: 41'	-	-
12	-	†: 44'	-	-	-
13	0	-	-	-	-
14	-	†: 49'	-	-	-
15	0	-	-	-	-
<i>Punto Final</i>					
16	-	⊗	-	-	-
Datos válidos:					
N= 6 [†]	0	2	3	1	0
<i>Frecuencia de muerte:</i>					
	-	40	75	100	-
†: Tiempo de muerte en minutos    0: Supervivencia    ⊗: Siguió el animal					

En la tabla 7, se muestra la frecuencia de muerte en 60 minutos, VIP, del veneno de *B. venezuelensis*, en ratones BALBc. Con la dosis de 17,78 mg/kg, todos los ratones (2) fallecieron antes de los 60 min correspondientes, con 15,85 mg/kg 4 murieron antes de los 60 min (80%) y 1 sobrevivió (20%); con 14,13 mg/kg fueron inyectados 5 ratones de los cuales 4 sobrevivieron (80%) y 1 murió (20%) antes de los 60 min. El ratón inyectado con la dosis de 12,58 mg/kg sobrevivió al efecto tóxico del veneno.

Tabla 7. Frecuencia de muerte inducida por el veneno de *B. venezuelensis*, BALBc, según la dosis administrada por VIP.

	<i>Dosis (<math>\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}</math> de ratón)</i>					
<i>Ratón (n)</i>	<i>10</i>	<i>11,22</i>	<i>12,58</i>	<i>14,13</i>	<i>15,85</i>	<i>17,78</i>
<i>Corrida No Válida</i>						
1	0	-	-	-	-	-
2	-	0	-	-	-	-
3	-	-	0	-	-	-
<i>Corrida Válida</i>						
4	-	-	-	†: 39'	-	-
5	-	-	0	-	-	-
6	-	-	-	0	-	-
7	-	-	-	-	†: 37'	-
8	-	-	-	0	-	-
9	-	-	-	-	0	-
10	-	-	-	-	-	†: 40'
11	-	-	-	-	†: 24'	-
12	-	-	-	0	-	-
13	-	-	-	-	0	-

14	-	-	-	-	-	†: 60'
15	-	-	-	-	†: 54'	-
16	-	-	-	0	-	-
17	-	-	-	-	†: 45'	-

*Punto Final*

18				⊗		
----	--	--	--	---	--	--

## Datos válidos:

N= 7 [†]	0	0	0	1	4	2
----------	---	---	---	---	---	---

## Frecuencia de muerte:

-	-	-	20	80	100
---	---	---	----	----	-----

---

†: Tiempo de muerte en minutos    0: Supervivencia    ⊗: Siguió animal

En la tabla 8, se muestra la frecuencia de muerte inducida por la administración del veneno de *B. venezuelensis* en ratones NMRI. Con la dosis de 19,95 mg/kg, todos los ratones (2) fallecieron antes de los 60 min. Con 17,78 mg/kg fueron inyectados 4 ratones de los cuales 3 (75%) murieron; con la dosis de 15,85 mg/kg 2 sobrevivieron (50%) y 2 murieron (50%). Con 14,13 mg/kg 2 fallecieron (66,6%) y 1 sobrevivió (33,3%) y finalmente con la dosis de 12,58 mg/kg se inyectó un ratón, el cual sobrevivió.

Tabla 8. Frecuencia de muerte inducida por el veneno de *B. venezuelensis*, NMRI, según la dosis administrada por VIP.

<i>Dosis (<math>\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}</math> de ratón)</i>					
<i>Ratón (n)</i>	<i>12,58</i>	<i>14,13</i>	<i>15,85</i>	<i>17,78</i>	<i>19,95</i>
<i>Corrida No Válida</i>					
1	-	-	-	0	-
<i>Corrida Válida</i>					
2	-	-	-	-	†: 40'
3	-	-	-	0	-
4	-	-	-	-	†: 55'
5	-	-	-	†: 16'	-
6	-	-	†: 28'	-	-
7	-	0	-	-	-
8	-	-	0	-	-
9	-	-	-	†: 12'	-
10	-	-	0	-	-
11	-	-	-	†: 50'	-
12	-	-	†: 57'	-	-
13	-	†: 18'	-	-	-
14	0	-	-	-	-
15	-	†: 53'	-	-	-
<i>Punto Final</i>					
16	⊗	-	-	-	-
Datos válidos:					
N= 9 [†]	0	2	2	3	2
<i>Frecuencia de muerte:</i>					
	-	66,6	50	75	100
†: Tiempo de muerte en minutos    0: Supervivencia    ⊗: Siguió animal					

En la tabla 9 se presentan los efectos tóxicos provocados por la administración del veneno de *B. colombiensis*, en ambos modelos múridos (BALBc y NMRI) observados en una hora de experimentación. Los signos como hipoactividad, taquipnea y postración se observaron en todos los animales (100%). Estos en BALBc aparecieron en un tiempo promedio de 12; 5,57; y 20,78 min y para NMRI con un tiempo de 16,67; 2,67 y 41,5 min respectivamente. Con menos frecuencia se presentaron signos como ataxia del tren posterior, mioclonias y otros trastornos de la respiración (bradipnea, polipnea). No hubo diferencias importantes en la frecuencia de aparición de los signos clínicos entre ambas cepas de ratón.

Tabla 9. Signos de toxicidad observados en ratones BALBc y NMRI por la administración del veneno de *B. colombiensis*, VIP, 60 min.

<i>Signos Clínicos</i>	<i>BALBc</i>		<i>NMRI</i>	
	<i>Tiempo (minutos)</i>	<i>% Aparición</i>	<i>Tiempo (minutos)</i>	<i>% Aparición</i>
<i>Hipoactividad</i>	12	100	16,67	100
<i>Taquipnea</i>	5,57	100	2,67	100
<i>Postración</i>	20,78	100	41,5	100
<i>Ataxia tren posterior</i>	28	14,28	14,92	80
<i>Mioclonias</i>	9,4	35,71	35,4	66,67
<i>Periodos de Apnea</i>	41,63	57,14	37,33	20
<i>Otros Trastornos Respiratorios</i>	40,28	50	37,6	66,67
<i>Convulsión</i>	-	-	30	6,67
<i>Muerte</i>	41,14	50	42,44	60

Tiempo (minutos): tiempo promedio de aparición.

En la tabla 10 se presentan los efectos tóxicos provocados por la administración del veneno de *B. venezuelensis*, en ambos modelos múridos (BALBc y NMRI) observados en una hora de experimentación. Los signos como hipoactividad, taquipnea y postración se observaron en todos los animales (100%). Estos en BALBc aparecieron en un tiempo estimado de 9,35; 3,05; y 32,63 min y para NMRI con un tiempo de 9,4; 4,13; y 38,66 min respectivamente. Con menor frecuencia se presentaron signos como ataxia del tren posterior, mioclonias y otros trastornos de la respiración (bradipnea, polipnea). En forma similar a lo ocurrido con el veneno de *B. colombiensis*, las manifestaciones clínicas fueron similares en ambas cepas.

Tabla 10. Signos de toxicidad observados en ratones BALBc y NMRI por la administración del veneno de *B. venezuelensis*, VIP, 60 min.

<i>Signos Clínicos</i>	<i>BALBc</i>		<i>NMRI</i>	
	<i>Tiempo (minutos)</i>	<i>% Aparición</i>	<i>Tiempo (minutos)</i>	<i>% Aparición</i>
<i>Hipoactividad</i>	9,35	100	9,4	100
<i>Taquipnea</i>	3,05	100	4,13	100
<i>Postración</i>	32,63	100	38,66	100
<i>Ataxia tren posterior</i>	18,6	82,35	19,88	60
<i>Mioclonias</i>	27,56	52,94	25,14	46,67
<i>Periodos de Apnea</i>	38,42	41,18	40,4	33,33
<i>Otros Trastornos Respiratorios</i>	30,75	94,11	30,13	53,33
<i>Convulsión</i>	29	5,88	15	6,66
<i>Muerte</i>	43,42	41,17	36,56	60

Tiempo (minutos): tiempo promedio de aparición.

En la tabla 11 se observa la comparación del gasto de veneno y ratones así como la variabilidad de los experimentos entre ambas especies de mapanares y entre ambos modelos múridos. El número de ratones utilizado para cada experimento fue similar. Por otro lado, el Índice de Variabilidad (IV) y el gasto de veneno fue levemente mayor, para ambos venenos, con la cepa NMRI, aún y cuando el total de veneno *B. colombiensis* utilizado en dichos ratones fue menor que con BALBc, demostrándose así que estos ratones no resultan ser los más adecuados para estos experimentos.

Tabla 11.

Gasto biológico y variabilidad de los experimentos en el cálculo de la DL-50 de *B. colombiensis* y *B. venezuelensis* en los modelos múridos BALBc y NMRI.

<i>Serpiente</i>	<i>BALBc</i>			<i>NMRI</i>		
	<i>Ratón</i> ( <i>n</i> )	<i>Dosis Total</i> ( $\mu\text{g}$ )	<i>IV (%)</i>	<i>Ratón</i> ( <i>n</i> )	<i>Dosis Total</i> ( $\mu\text{g}$ )	<i>IV (%)</i>
<i>B. colombiensis</i>	13	5312,56	6,03	12	4730,85	7,07
<i>B. venezuelensis</i>	14	4296,56	10,87	14	6972,6	12,84

## 4.2 DISCUSION

Las diferentes especies del género *Bothrops* (Viperidae: Crotalinae) son responsables de la mayoría de los envenenamientos por mordeduras de serpientes venenosas en Latinoamérica (Costa Cardoso y Fan, 1995; Russell y col, 1997; Alves Araujo y col, 2003). En la actualidad en la Argentina se comunican a las autoridades sanitarias alrededor 10 000 accidentes anuales por animales venenosos -ponzoñosos (Segre y col, 2000; García, 2003). El 70% de estos accidentes son producidos por serpientes y de éstos, más del 95% son causados por especies del género *Bothrops* (García, 2003). En Brasil las mordeduras por *Bothrops* representan cerca del 90% de los casos de mordeduras por serpientes venenosas (Alves Araujo y col, 2003) y en Centroamérica también las *Bothrops* son responsables de la mayoría de los accidentes (Rojas y col, 1997; Russell y col, 1997; Sasa y Vázquez, 2003).

Venezuela es uno de los países tropicales en los que el envenenamiento ofídico es un problema de salud pública, en donde las serpientes del género *Bothrops* son las responsables de la mayoría de los accidentes ofídicos alcanzando un 80% total de los casos registrados, caracterizándose por producir efectos sistémicos con importantes alteraciones de la coagulación sanguínea debido a los distintos componentes del veneno (Grand y col, 2004).

Los venenos de las serpientes poseen una composición variable, existiendo 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 intraespecie entre ejemplares de distintas zonas geográficas (Pirela y col, 2006).

Los venenos botrópicos son una mezcla compleja de elementos enzimáticos y no enzimáticos, con actividades procoagulantes, hemorrágicas y miotóxicas, que actúan sobre el espectro amplio de órganos y tejidos, causando cuadros graves de necrosis tisular, trastornos de la coagulación y daño endotelial vascular (Rodríguez-Acosta y col, 2003).

En diversos países se han realizado estudios sobre la variabilidad de los venenos de diferentes especies de serpientes. Se han encontrado diferencias en todos los niveles taxonómicos, siendo de mayor importancia la variabilidad intraespecífica (Saldarriaga y col, 2000).

Una forma inicial de caracterizar el veneno y de evaluar las diferencias tanto en su composición como en su efecto tóxico, es determinar, la Dosis Letal Cincuenta (DL-50). Este índice indica la cantidad requerida de una droga o toxina que es capaz de producir la muerte en el cincuenta por ciento de una población de animales experimentales (Ross, 1996). Su determinación es esencial para la estandarización de venenos y antivenenos de origen natural (Sevcik, 1987).

Se ha demostrado que la DL-50 de venenos botrópicos varía conforme la vía de inyección, el animal experimental, género y especie de la serpiente y con la región geográfica que habitan (Furnaletto y col, 1973 y Siles Villarroel, 1997).

Es por ello que este estudio se basó en la determinación y comparación de las DL-50 del veneno de las especies *Bothrops colombiensis* y *Bothrops venezuelensis*, ejemplares adultos, capturados en diferentes regiones de Venezuela, en los modelos múridos NMRI y BALBc, demostrándose que el veneno de los ejemplares adultos de *B. colombiensis* poseen una letalidad similar entre los modelos múridos en estudio (DL-50 de 17,90 mg·Kg<sup>-1</sup> de ratón BALBc y DL-50 de 16,82 mg·Kg<sup>-1</sup> de ratón NMRI); igual resultado fue arrojado por el veneno de los ejemplares adultos de *B.*

*venezuelensis* (DL-50 de 14,99 mg·Kg<sup>-1</sup> de ratón BALBc y DL-50 de 15,96 mg·Kg<sup>-1</sup> de ratón NMRI).

Contrariamente Maruñak y col, (2005) encontraron diferencias significativas entre la potencia letal de *B. jararacussu* de Argentina, la cual es de elevada toxicidad por la letalidad manifestada (DL-50 = 43,52 µg/ratón) respecto al veneno de serpientes pertenecientes al mismo género y especie que habitan en Brasil (Sánchez y col, 1992; Perrone y col, 1989) (Tabla 12).

**Tabla 12. Actividad letal de venenos de serpientes de Brasil y Argentina.**

ESPECIE	DL-50 (µg/ratón)
<i>B. jararacussu</i> * Minas Gerais (Brasil)	74.7
<i>B. jararacussu</i> * Sao Paulo (Brasil)	78.25
<i>B. jararacussu</i> ** Región de Itaipú (Brasil)	116.28
<i>B. jararacussu</i> Argentina	43.52

\* Sánchez y col, 1992.

\*\* Perrone y col, 1989.

Por otra parte, Roodt y col, (2004) determinaron la DL-50 para *B. cotiara*, la cual fue de 51 µg/ratón, manteniéndose dentro de los valores de aquellas comunicadas para los venenos de las otras especies de este género en la Argentina, que oscilan entre 18 y 73 µg (Roodt, 2002) y para las de los venenos de otras especies de *Bothrops* de Sudamérica que oscilan entre 38 y 230 µg (Sánchez y col, 1992).

En nuestro país, Pirela y col, (2006) demostraron que el veneno de *Crotalus durissus cumanensis* de la localidad de Porshoure, de la Guajira venezolana, presenta una DL-50 de 0,210 mg/Kg, mientras que Montilla (1999), reporta un valor de 0,789 mg/Kg, de un pool de veneno obtenido de serpientes de cascabel de distintas zonas del Estado Zulia. Por otro lado Saravia y col, (2002) determinaron un valor de DL-50 de 0,176 mg/Kg, con *Crotalus durissus cumanensis* de la Villa del Rosario, Estado Zulia, lo que confirma que la composición de los venenos suele presentar variaciones, no sólo entre individuos de la misma especie, sino también entre individuos de la misma subespecie de distintas zonas geográficas (Pirela de Salas y col, 2006). Sin embargo, estos resultados no pueden compararse con los nuestros ya que el tiempo de observación fue de 48 horas.

Estableciendo comparaciones de la DL-50 obtenida por Bejarano y Astudillo (2008) y por Blanco y Rojas (2005) para los venenos de *B. colombiensis* y *B. venezuelensis* respectivamente, cuyos valores fueron de DL-50 = 16,82 mg/Kg<sup>-1</sup> de ratón para *B. colombiensis* y DL-50 = 15,84 mg/Kg<sup>-1</sup> de ratón para *B. venezuelensis*, ambos estudios realizados en ratones C57bl/6, inyectados por VIP y para 60 min de observación, con las obtenidas en el presente estudio para ambas especies, pero calculadas en dos modelos muridos diferentes, hasta ahora muy poco empleados en este tipo de investigaciones, como lo son los modelos BALBc y NMRI, se puede demostrar que no hay variaciones significativas entre las mencionadas DL-50, lo que nos indica que los tres modelos muridos presentan igual sensibilidad al efecto tóxico del veneno de las especies en estudio (Figura 7 y 8).

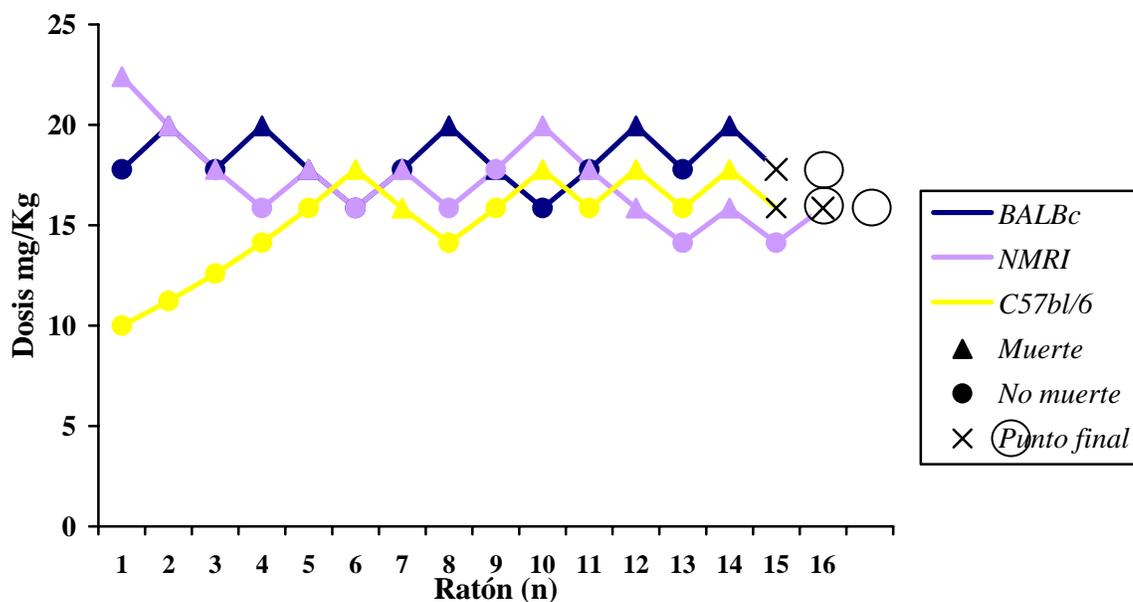


Gráfico 7. Comparación de la DL-50 del veneno de *B. colombiensis* en los modelos muridos BALBc, NMRI y C57bl/6.

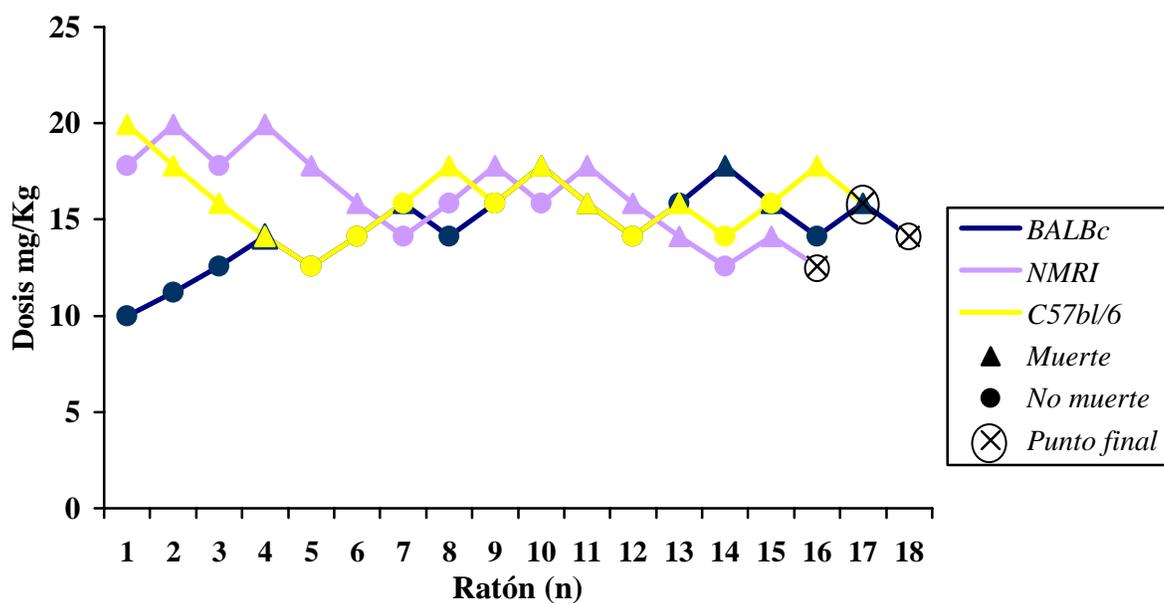


Gráfico 8. Comparación de la DL-50 del veneno de *B. venezuelensis* en los modelos muridos BALBc, NMRI y C57bl/6.

En oposición a estos resultados, en lo que respecta a la sensibilidad del efecto tóxico del veneno en las distintas cepas de ratón, se encuentra un estudio realizado por Hurtado, Montaña y Rodríguez, (2008), quienes demostraron que los ratones C57bl/6 son más sensibles al efecto tóxico del veneno de un escorpión de la especie *Tityus nororientalis* (Scorpiones; Buthidae) donde la DL-50 fue de  $8,43 \mu\text{g} \times \text{g}^{-1}$  de ratón, dosis mucho menor que la obtenida en ratones hembra NMRI (DL-50 =  $28,18 \mu\text{g} \times \text{g}^{-1}$  de ratón) y este menor que la obtenida en los ratones BALBc (DL-50 =  $40,07 \mu\text{g} \times \text{g}^{-1}$  de ratón), ambos resultados obtenidos en el mismo estudio. Esto demuestra que la variabilidad en la susceptibilidad de los ratones a un tipo de veneno puede no ser igual cuando se estudian venenos de otros grupos zoológicos.

Las mordeduras de los vipéridos producen en Centro y Norteamérica cuadros predominantemente histotóxicos y hemotóxicos, causando extensas lesiones locales (que pueden conducir a la amputación de miembros) y hemorragias incoercibles por diferentes mecanismos que actúan sobre el sistema hemostático. Estos efectos, conjuntamente a fenómenos hipotensivos provocados por mecanismos directos (hemorragias) e indirectos (activación del sistema caliceína - bradiquinina, péptidos hipotensores) pueden conducir a la muerte (Roodt y col, 2005). El mecanismo de acción predominante del veneno *Bothrópico* es coagulante, anticoagulante y proteolítico (Charry, 2006).

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.

Los signos clínicos fueron observados durante 60 minutos, posterior a la inyección por vía intraperitoneal del veneno de ambas especies. Presentándose para ambos modelos múridos, con mayor frecuencia (100% de los ratones) y en tiempo de

aparición temprano (3 – 17 minutos) los signos de taquipnea e hipoactividad, hechos que se pueden adjudicar al dolor local como principal manifestación clínica que aparece en este tipo de envenenamientos, y debido a que la inyección del veneno se hizo a nivel abdominal, el dolor generado en esta área es el causante de estas manifestaciones. De igual forma se presentó en el 100% de los ratones la manifestación de postración, pero con un tiempo de aparición más tardío (21 - 41 minutos). Resultados similares fueron obtenidos por Astudillo y Bejarano (2008) Blanco y Rojas (2005) para los venenos de *B. colombiensis* y *B. venezuelensis* respectivamente.

Otras manifestaciones clínicas que se encontraron con mayor frecuencia para ambos modelos múridos, fueron alteraciones respiratorias que luego de periodos prolongados de taquipnea evolucionaron a respiraciones lentas superficiales y entrecortadas y periodos de apnea (50 – 95 % de ratones), así como ataxia del tren posterior (80% de los ratones), y mioclonias (36 – 67 % de ratones), signos sugestivos de afección a nivel neurológico. Sin embargo, Rodríguez-Acosta y col, (2003) revelaron la leve acción del veneno sobre las estructuras encefálicas, lo que llevo a considerar la importancia de la barrera hematoencefálica como elemento de protección para la difusión del veneno desde el espacio vascular hacia el tejido nervioso propiamente dicho, por lo que estos signos aparentemente neurológicos, con seguridad son debidos a la isquemia y las hemorragias más que a algún efecto neurológico.

La muerte se produjo en más del 50% para ambos modelos múridos, en un tiempo promedio de 40 minutos. La causa de la muerte probablemente se deba a los trastornos hemorrágicos y de la coagulabilidad, que como se ha mencionado son las principales actividades tóxicas y más importantes de estos venenos.

Al estudiar la variabilidad del efecto de estos venenos (*B. colombiensis* y *B. venezuelensis*) en los modelos múridos estudiados pudimos demostrar que no existe una diferencia en la susceptibilidad de estos ratones al efecto del veneno de las dos especies de mapanares estudiadas. Con respecto al gasto de material biológico (número de ratones y total de veneno utilizado), en este trabajo de investigación, se pudo demostrar que para ambas cepas de ratón el número de animales utilizados fue similar (12 ratones NMRI para *B. colombiensis* y 14 para *B. venezuelensis*, y 13 ratones BALBc para *B. colombiensis* y 14 ratones para *B. venezuelensis*). Los experimentos realizados en los ratones BALBc fueron los que tuvieron un consumo de veneno menor (5312,56 µg de veneno *B. colombiensis* y 4296,56 µg de veneno *B. venezuelensis*) en comparación con la cepa de ratón NMRI (4730,85 µg de veneno *B. colombiensis* y 6972,6 µg de veneno *B. venezuelensis*).

Comparando estos resultados con los obtenidos por Astudillo y Bejarano (2008) y Blanco y Rojas (2005) (tabla 13), observamos que la cepa de ratón C57bl/6 tuvo un gasto de material biológico parecido expresado con una utilización de números similares de roedores pero un consumo de veneno de serpiente mucho menor. La variabilidad de los experimentos con esa cepa de ratón fue mucho menor con el veneno de *B. colombiensis*, pero también similar con el de *B. venezuelensis*.

**Tabla 13. Gasto biológico y variabilidad de los experimentos en el cálculo de la DL-50 de *B. colombiensis* y *B. venezuelensis* en el modelo múrido C57bl/6.**

<i>Serpiente</i>	<i>C57bl/6</i>		
	<i>Ratón (n)</i>	<i>Dosis Total (μg)</i>	<i>IV (%)</i>
<i>B. colombiensis</i> *	9	3335,78	5
<i>B. venezuelensis</i> **	12	4066,69	14

\* Astudillo y Bejarano (2008)

\*\* Blanco y Rojas (2005)

Es importante mencionar que hasta donde es conocido por los autores no hay un trabajo realizado en nuestro país o en el extranjero donde se compare la susceptibilidad al veneno de serpientes de las distintas cepas de ratón que fueron estudiadas en esta investigación.

## CAPITULO V: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

### 5.1 CONCLUSIONES

- 1 La Dosis Letal Cincuenta de *B. colombiensis* para los modelos múridos NMRI y BALBc es de 16,82 mg/Kg y 17,90 mg/kg, respectivamente.
- 2 La Dosis Letal Cincuenta de *B. venezuelensis* para los modelos múridos NMRI y BALBc es de 15,96 mg/Kg y 14,99 mg/kg, respectivamente.
- 3 No se evidenció diferencia significativa sobre la sensibilidad al veneno de *B. colombiensis* y *B. venezuelensis* en ambas cepas de ratón.
- 4 Los índices de variabilidad son similares en las dos cepas de ratón, así como también lo es el número de roedores utilizados.
- 5 El consumo de veneno es algo mayor cuando se usan ratones NMRI en comparación con BALBc y C57bl/6 (estudiados previamente).
- 6 Los principales signos clínicos que se evidenciaron en ambas cepas de ratón por la administración del veneno VIP fueron taquipnea, hipoactividad y postración.
- 7 No se observó diferencia importante al comparar el costo-beneficio del uso de los modelos múridos (NMRI; BALBc y C57bl/6), sin embargo, considerando el gasto total de veneno, continua siendo conveniente el uso de la cepa C57bl/6 para investigaciones de esta índole.

## 5.2 RECOMENDACIONES

- 1 Promover la realización de nuevas investigaciones con los modelos múridos NMRI y BALBc, debido a que no se cuenta con una fuente disponible, amplia y de fácil acceso.
- 2 Incentivar la utilización del método de Dixon y Mood (1948) modificado (Sevcik, 1987), en próximas investigaciones para el cálculo de la DL-50, ya que utiliza una menor cantidad de animales de experimentación, tiempo y veneno, por lo que es un modelo práctico para la experimentación.
- 3 Precisar comparativamente la DL-50 del veneno de estas serpientes a través de otros factores que podrían hacerla cambiar, ejemplo: sexo, zona geográfica, edad, época del año.
- 4 Evaluar en nuevas investigaciones, a estas cepas de ratón (NMRI, BALBc y C57bl/6) con distintos venenos, no sólo de serpientes si no de otros grupos taxonómicos.
- 5 Mantener el uso de ratones C57bl/6, para el estudio de los venenos de serpientes, como se ha venido haciendo en los laboratorios de CICS.

## **ANEXOS**



UNIVERSIDAD DE ORIENTE  
NÚCLEO DE ANZOÁTEGUI  
ESCUELA DE MEDICINA

**CENTRO DE INVESTIGACIONES EN CIENCIAS DE LA SALUD (CICS)**

**LABORATORIO DE TOXINOLOGÍA**

## **FICHA DE RESULTADOS**

<b>DL<sub>50</sub> MÉTODO:</b>		<b>EXPERIMENTO:</b>
<b>VENENO (ESPECIE, SEXO):</b>		
<b>ANIMAL EXPERIMENTAL:</b>	(Número del animal, peso, vía de inyección)	
<b>CÁLCULO DE DOSIS:</b>	Factor	Dosis (volumen)

### Tabla de Resultados:

Tiempo

Manifestaciones clínicas

01.	
02.	
03.	
04.	
05.	
06.	
07.	
08.	
09.	
10.	
11.	
12.	
13.	
14.	
15.	
15.	
16.	
17.	

**Anexo 1. Formato para la recolección de datos del cálculo de la DL-50.**



**Anexo 2. *Bothrops colombiensis*.**



**Anexo 3. *Bothrops venezuelensis*.**



**Anexo 4. Extracción del veneno de la serpiente.**



**Anexo 5. Extracción del veneno de la serpiente.**

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

TÍTULO	“DOSIS LETAL 50 DEL VENENO DE <i>Bothrops venezuelensis</i> Y <i>Bothrops colombiensis</i> (SERPENTES, VIPERIDAE) EN LOS MODELOS MÚRIDOS NMRI Y BALBc”
SUBTÍTULO	

AUTOR (ES):

APELLIDOS Y NOMBRES	CÓDIGO CULAC / E MAIL
Méndez Acosta, Ruth María	CVLAC: V-15.417.858 E MAIL: ruthmendez_82@hotmail.com
Moreno Romero, María Fernanda	CVLAC: V-16.473.565 E MAIL: nandamr_84@hotmail.com
	CVLAC: E MAIL:
	CVLAC: E MAIL:

PALÁBRAS O FRASES CLAVES:

Dosis letal cincuenta, veneno, serpientes, modelo múrido BALBc, modelo múrido NMRI, modelo múrido C57bl/6, taquipnea, postración, hipoactividad \_\_\_\_\_

---



---



---

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

ÁREA	SUBÁREA
Escuela de Ciencias de la Salud	Medicina

**RESUMEN (ABSTRACT):**

Se determinó la DL-50 del veneno de ejemplares adultos de *Bothrops venezuelensis* y *Bothrops colombiensis* (serpientes pertenecientes al género de mayor importancia médica en el continente suramericano) en los modelos múridos NMRI y BALBc por vía intraperitoneal y para una hora de observación. La DL-50 del veneno de *B. colombiensis* fue mayor (DL-50 = 17,90 mgKg<sup>-1</sup> de ratón BALBc y 16,82 mgKg<sup>-1</sup> de ratón NMRI); por lo que el veneno de *B. venezuelensis* es significativamente más potente (DL-50 = 14,99 mgKg<sup>-1</sup> de ratón BALBc y 15,96 mgKg<sup>-1</sup> de ratón NMRI). No se encontraron diferencias significativas al evaluar la sensibilidad al veneno de ambas especies de los modelos múridos en estudio. Las manifestaciones clínicas inducidas por el veneno de ambas serpientes fueron similares en ambas cepas de ratón presentándose en un 100% manifestaciones como taquipnea, hipoactividad y postración y no encontrándose diferencias importantes en la frecuencia de aparición y síntomas entre ambas cepas de ratón. Se determinó que la cepa de ratón que ameritó mayor gasto de ambos venenos fue NMRI y la cepa cuyo consumo de veneno fue menor fue la BALBc. Al comparar estos resultados con estudios previos realizados en la cepa C57bl/6; se sugiere que esta última, es la cepa de ratón más adecuada para investigaciones de esta índole.

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

CONTRIBUIDORES:

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

FECHA DE DISCUSIÓN Y APROBACIÓN:

2009	03	20
AÑO	MES	DÍA

LENGUAJE. SPA

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

ARCHIVO (S):

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

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

ALCANCE

ESPACIAL: Centro de Investigación en Ciencias de la Salud\_\_\_\_ (OPCIONAL)

TEMPORAL: \_\_\_\_\_ (OPCIONAL)

TÍTULO O GRADO ASOCIADO CON EL TRABAJO:

Medico 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”. \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
Méndez A., Ruth M.

**AUTOR**

\_\_\_\_\_  
Moreno R., María F.

**AUTOR**

\_\_\_\_\_  
Kiriakos, Demetrio.

**TUTOR**

\_\_\_\_\_  
De Sousa, Leonardo

**JURADO**

\_\_\_\_\_  
Ovalles, María.

**JURADO**

\_\_\_\_\_  
Dra. María Ovalles.

Coordinador de la Comisión de Trabajo de Grado

**POR LA SUBCOMISION DE TESIS**