

**DETERMINACIÓN DEL EFECTO CARDIOTÓXICO SOBRE *Rattus norvegicus*
CEPA WISTAR CAUSADO POR EL VENENO DE *Lachesis acrochorda*
(SERPENTES: VIPERIDAE)**

KAREN LEONOR ÁNGEL CAMILO

**UNIVERSIDAD DEL CAUCA
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES, EXACTAS Y DE LA EDUCACIÓN
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA
POPAYÁN
NOVIEMBRE DE 2016**

**DETERMINACIÓN DEL EFECTO CARDIOTÓXICO SOBRE *Rattus norvegicus*
CEPA WISTAR CAUSADO POR EL VENENO DE *Lachesis acrochorda*
(SERPENTES: VIPERIDAE)**

**KAREN LEONOR ÁNGEL CAMILO
TRABAJO DE GRADO PARA OPTAR POR EL TÍTULO DE BIÓLOGA**

**DIRECTOR
JIMMY ALEXANDER GUERRERO VARGAS
ASESORES
JOSÉ TORIBIO BELTRÁN VIDAL
IVONNE CAROLINA BOLAÑOS BURGOS**

**UNIVERSIDAD DEL CAUCA
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES, EXACTAS Y DE LA EDUCACIÓN
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA
POPAYÁN
NOVIEMBRE DE 2016**

NOTA DE ACEPTACIÓN

Aprovado con mención de Laureado

Firmas en las versiones impresas

Javier R. Rodríguez Buitrago, MD. MSc. Toxicología

Profesor de toxicología-Facultad de Medicina, Universidad Militar Nueva Grana

Profesor de Toxicología-Facultad de Medicina, Fundación Universitaria Sanitas

Director Científico-Fundación Antídoto

Jurado

Matheus Soares da Silva Ferreira

Médico Veterinario-Ph.D. Ciencias Veterinarias

Profesor e Investigador. Universidad Antonio Nariño

Jurado

Jimmy Alexander Guerrero Vargas, Ph.D.

Profesor Departamento de Biología, Universidad del Cauca

Director del Trabajo de Grado

Ciudad y fecha de sustentación: Popayán, 08 de noviembre de 2016

A mi Madre Ivarluz Camilo Girón

A mis tías Olga Lucía Camilo Girón

Y Gilma Camilo Girón

A mi hermana Lilibeth Camilo Girón

AGRADECIMIENTOS

- A Dios, por iluminarme, acompañarme y darme la fuerza en cada momento de mi vida, especialmente en esta meta.
- A la Universidad del Cauca, al Departamento de Biología y al Cuerpo de profesores, por brindarme la formación académica para lograr el título de profesional.
- Al Centro de Investigaciones Biomédicas de la Universidad del Cauca (CIBUC), y a su personal por contribuir a mi formación.
- Al Grupo de Investigaciones Herpetológicas y Toxinológicas (GIHT) de la Universidad del Cauca por contribuir en mi formación como investigadora.
- A la Unidad de Microscopía Electrónica, por permitirme la toma de fotos para hacer el análisis histopatológico.
- A mi Director Jimmy Guerrero Vargas, por sus grandes aportes, colaboración, consejos, regaño, por su apoyo para la realización de mi trabajo, por todas sus enseñanzas y sobre todo, por creer en mí.
- A mi asesora Ivonne Carolina Bolaños Burgos, por todo lo enseñado, su apoyo incondicional, su tiempo dedicado y los consejos brindados.
- A mi Asesor José Beltrán Vidal, por su enseñanza, colaboración, consejos, apoyo para la realización del trabajo.
- Al Patólogo Jaime Alvares, compartirme parte de su conocimiento y ayudarme con la lectura de las placas histológicas.
- Al Doctor Santiago Ayerbe, por su colaboración en la lectura de los electrocardiogramas y conocimientos aportados.
- A mi mamá por el gran cariño, apoyo, comprensión, confianza, por ser mi guía y ejemplo a seguir, a mis tías por darme apoyo, ánimo y fuerza espiritual y a mis hermanos por su compañía y mis sobrinas.
- A Andrés Mondragón, por su amor, colaboración, ánimo, consejos, palabras y críticas, que aportaron a mi vida y trabajo.

- A mi tía Jacqueline por su colaboración, para hacer posible el procesamiento de las muestras para el análisis enzimático.
- A Mary Luz bueno Ospina, por su colaboración y apoyo incondicional en todo el desarrollo de mi trabajo, conocimientos compartidos y los buenos consejos
- A mis grandes amigas Paola Samboní, Laura Gutiérrez, Katherine Bedoya y Adriana Collazos, por su amistad incondicional, compañía, consejos y colaboración incondicional.
- A mis compañeros, por su apoyo y compañía durante la carrera.

TABLA DE CONTENIDO

1. RESUMEN.....	9
2. INTRODUCCIÓN.....	10
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	12
4. JUSTIFICACIÓN	14
5. MARCO TEÓRICO	16
5.1. Generalidades de las serpientes	16
5.2. Familia Viperidae.....	16
5.3. Género <i>Lachesis</i>	16
5.4. Veneno de <i>L. acrochorda</i>	17
5.5. Evaluación electrocardiográfica	18
5.2. Enzimas cardiacas.....	21
Creatincinasa (CK).....	21
6. ANTECEDENTES.....	22
7. OBJETIVOS	27
Objetivo general	27
Objetivos específicos	27
8. MATERIALES Y MÉTODOS.....	28
Mantenimiento de las serpientes.....	28
Extracción del veneno.....	28
Procesamiento de veneno.....	29
Animales experimentales.....	29
Tipo de estudio	29
Registros electrocardiográficos	29
Determinación de los niveles de enzimas cardiacas CK y CK-MB.....	30
Análisis histológico.....	31
Diseño experimental.....	31
9. RESULTADOS.....	33
9.1. Análisis electrocardiográfico.....	33
9.1.1. Amplitud de la onda P.....	33
9.1.2. Amplitud de la onda T.....	34
9.1.4. Frecuencia cardiaca	36

9.2.	ANÁLISIS DE ENZIMAS CARDIACAS CK CK-MB.....	37
9.3.	ANÁLISIS HISTOPATOLÓGICO.....	38
9.3.1.	Hemorragia interfibrilar.....	38
9.3.2.	Edema.....	39
9.3.3.	Cardiocitólisis.....	40
9.3.4.	Bandas de contracción.....	41
10.	DISCUSIÓN.....	42
11.	CONCLUSIONES.....	47
12.	RECOMENDACIONES.....	48
13.	BIBLIOGRAFÍA.....	49

1. RESUMEN

Las serpientes existen desde finales del jurásico y principios del cretácico, y a pesar de que el hombre no hace parte de su cadena trófica, las mordeduras en humanos son frecuentes. El ofidismo es un problema de salud pública en Colombia y en muchos países de las regiones tropicales, y sucede especialmente en las zonas rurales, donde la poca disponibilidad de antivenenos es el principal factor de la alta mortalidad por esta enfermedad tropical. En el departamento del Cauca, la serpiente *Lachesis acrochorda*, popularmente conocida como “verrugoso o pudridora”, es una de las especies responsables de ofidismo con un 2-3 % de las mordeduras, y causa alta mortalidad. A pesar de que no existen reportes de que el veneno lachésico es neurotóxico, hay algunos casos clínicos en los que se registran alteraciones cardíacas. Por lo anterior, el objetivo principal de este trabajo es determinar el efecto cardiotoxico del veneno de la serpiente *L. acrochorda*, en ratas Wistar macho (n=20), de 230 ±20 g. Para este fin, se implementó un diseño estadístico de bloques aleatorizados con 3 grupos tratados, a los cuales se les inyectó veneno liofilizado (80, 40 y 20%) de la DL50, y un grupo control, tratado con solución salina, al 0,9%. Se registraron elevaciones altamente significativas ($p < 0,001^{***}$) de la onda T, lo cual puede ser por alteraciones electrolíticas como hipercalemia y alteraciones en el complejo QRS ($p < 0,001^{***}$), manifestándose desde los 10 min hasta las 3 horas post inoculación del veneno. Elevación de las enzimas CK y CK-MB. La evaluación histológica del miocardio de los biomodelos, mostró que con el paso de las horas, se producen edemas interfibrilares, bandas de contracción, cardiocitólisis y necrosis de coagulación focal. En conclusión, el veneno de *L. acrochorda* produce daños a nivel cardíaco en ratas Wistar.

2. INTRODUCCIÓN

Gracias a la ubicación geográfica y a las características climáticas colombianas (Badillo, Casas, & Gamarra 1989), en el país proliferan serpientes venenosas causantes del ofidismo, lo cual incluye este territorio, al igual que los países del África Subsahariana, Asia Meridional y otros de Latinoamérica, dentro de los principales afectados por este problema de salud pública (Gutiérrez et al., 2010).

Las serpientes pertenecen al reino Animalia, clase Sauropsida, suborden Serpentes. En la actualidad, se conoce la existencia de más de 3.000 especies distribuidas por todo el mundo (Castrillón-Estrada et al., 2007), de las cuales solo la sexta parte es venenosa; se encuentran distribuidas por debajo de los 2500 m.s.n.m. (Paredes, 2012). En Colombia se hallan más de 270 especies; 49 de éstas son venenosas para el hombre, 30 pertenecen a la familia Elapidae y 19 a la familia Viperidae, siendo *Bothrops*, *Crotalus* y *Lachesis* los principales géneros que afectan a los humanos. Es de resaltar que las especies en mención se distribuyen en casi todo el territorio, excepto en las aguas del Caribe (Lynch, 2012).

Las serpientes del género *Lachesis* son las víboras más largas de América Central y del Sur, cuando muerden, pueden inyectar altas dosis de veneno muy potente, y se ha reportado que este veneno puede producir síntomas como dolor, coagulopatía grave con depleción de fibrinógeno, edema, hemorragia, diarrea, náuseas, vómitos, sudoración y necrosis, que puede resultar en secuelas permanentes o incluso la muerte (Cardoso et al., 2003; de Oliveira Pardal et al., 2004; Jorge MT et al., 1997; Silva J., 1980). La *L. acrochorda* se encuentra distribuida en el Atlántico y el Pacífico colombiano, vertientes del oeste de Panamá, y en Colombia, al noroeste, en la costa Atlántica, donde se extiende hacia el sur, en los valles de los ríos Cauca y Magdalena, y a lo largo de la vertiente del Pacífico de Colombia y en el noroeste de Ecuador (Madrigal et al., 2012; Núñez Rangel et al., 2012).

La *L. acrochorda* produce entre un 2-3% de las mordeduras, con una alta mortalidad y según reportes clínicos en los casos de ofidismo por esta especie evidencian alteraciones cardiacas (Otero et al., 1992), por tal motivo, en este estudio se evaluó las alteraciones electrocardiográficas, enzimáticas e histopatológicas producidas en el corazón de ratas WISTAR, causadas por el veneno total de esta serpiente.

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En el mundo se reportan aproximadamente 5 400 000 mordeduras de serpiente anuales; en el 55,5% de los casos hay envenenamiento, y 125345 personas mueren. Los países más afectados son los del África Subsahariana, Asia Meridional y Latinoamérica, en los cuales, el principal factor contribuyente a la morbilidad y mortalidad asociada a la mordedura de serpiente es la poca disponibilidad de suero antiofídico en estas regiones (Gutiérrez et al., 2010). Para Latinoamérica se estiman 150000 accidentes ofídicos anuales, donde 5000 de estos casos son de víctimas mortales (Walteros & Paredes 2014).

Para Colombia, en el 2015 se notificaron ante el Sistema Nacional de Vigilancia en salud pública-SIVIGILA 5142 casos de agresiones causadas por ofidios venenosos que proliferan gracias a la ubicación geográfica y a las características climáticas del país (Badillo, Casas, & Gamarra 1989). De hecho, en el mundo existen aproximadamente 3000 especies de serpientes (Cardoso et al., 2003) de las cuales más de 270 se encuentran en Colombia; 49 especies son venenosas para el hombre, 30 pertenecen a la familia Elapidae y 19 a la familia Viperidae y están distribuidas en casi todo del territorio, excepto en las aguas del Caribe y por encima de los 3500 metros (Lynch, 2012).

En el departamento del Cauca están todos los géneros de la familia Elapidae y casi todos los de la familia Viperidae reportados para Colombia (Ayerbe & Latorre, 2010); siendo incluido en el 2015 dentro de los 10 departamentos con mayor incidencia de accidente ofídico a nivel nacional (Sivigila, 2015).

El envenenamiento provocado por especies del género *Lachesis* presenta efectos fisiopatológicos, tanto locales como sistémicos, que lo hacen necrolítico, edemático, anticoagulante y hemorrágico. Además, posee actividad neurotóxica, debido a una quinogenasa que produce activación del sistema nervioso autónomo parasimpático, que ocasiona un síndrome de excitación vagal. Este veneno también produce de manera indirecta calicreína y precalicreína (Factor de Fletcher), que provocan

aumento del peristaltismo, y de manera directa producen bradiquininas, las cuales son responsables de la hipotensión, diarrea y bradicardia (Ayerbe & Latorre 2010; Granados-Zúñiga & Aragón-Ortíz 1998; Instituto Nacional de Salud and Ministerio de Salud y Protección Social 2014; Otero et al. 1992).

A pesar de lo anterior, no se conoce con certeza cuál es el efecto cardíaco causado por el veneno de la especie *L. acrochorda*, lo cual conlleva a formular la siguiente pregunta: ¿puede el veneno de la serpiente *L. acrochorda* causar efectos cardiotóxicos al ser aplicado en dosis subletales? La respuesta a dicha pregunta fue un punto de partida para investigar si había afección directa en el corazón, causada por el veneno de *L. acrochorda*.

4. JUSTIFICACIÓN

El ofidismo en Colombia, desde tiempo atrás, es un problema de salud pública que ha estado mal dimensionado, pues la vigilancia epidemiológica, producción de antivenenos, el conocimiento sobre la prevención, el tratamiento y manejo en los casos de ofidismo, son limitados, lo cual hace que el accidente ofídico se convierta en un riesgo para la sociedad, especialmente para la población que se encuentra en zonas rurales y de difícil acceso, siendo estas las más expuestas a este tipo de accidentes.

De acuerdo con lo anterior, varios investigadores se han interesado por el estudio de este tema, motivados por los efectos causados por la mordedura de serpiente, y por el aporte al conocimiento sobre la letalidad y la distribución de estas especies en Colombia (Ayerbe González and Latorre Ledezma, 2010; Cardoso et al., 2003; Castrillón-Estrada et al., 2007; Madrigal et al., 2012; Mora-Obando et al., 2014; Pla et al., 2013)

Actualmente, existen algunos reportes en los que se puede comprender los síntomas generados por los accidentes lachésicos, entre los cuales es común encontrar: hemorragia leve alrededor de la mordedura, formación de ampollas, sudoración profusa, cólico abdominal, náuseas, “sintomatología vagal” responsable de la hipotensión, diarrea y bradicardia (Castrillón-Estrada et al., 2007; Madrigal et al., 2012).

Sin embargo, aparte de la sintomatología clínica, no se han hecho estudios referentes a los daños provocados por la acción del veneno de las serpientes del género *Lachesis*, y menos aún de la especie *L. acrochorda*. Razón por la cual, no existe un manejo clínico apropiado contra el envenenamiento causado por esta especie, y se hacen necesarios estudios que permitan conocer de una manera más detallada cada uno de los efectos causados. Además, es importante mencionar que los antivenenos neutralizan principalmente los efectos sistémicos más que los locales (por ejemplo la necrosis) y, por lo tanto, las secuelas del envenenamiento son graves (Gutierrez et al., 1998).

Por otra parte, vale la pena resaltar que, según lo reportado anteriormente, una de las sintomatologías frecuentes en los accidentes lachésicos es la bradicardia (Castrillón-Estrada et al., 2007; Madrigal et al., 2012), por lo que se hizo necesario realizar el estudio sobre los efectos cardiotóxicos que pueden desencadenarse durante el envenenamiento. En este sentido, este proyecto podrá aportar al Sistema Nacional de Salud, permitiendo el cumplimiento de la ley 1438, que tiene como objetivo proteger la salud de los colombianos, ya que el bienestar del usuario es el eje central y núcleo articulador de las políticas en salud (Congreso de Colombia, 2011). Además puede contribuir al plan de acción en el control de síntomas y daños causados por el envenenamiento lachésico. Por lo tanto, este estudio es relevante porque sirve como base para futuras investigaciones que permitan optimizar el tratamiento y la prevención de complicaciones relacionadas con el envenenamiento por mordedura de estos ofidios.

5. MARCO TEÓRICO

5.1. Generalidades de las serpientes

Las serpientes derivan su nombre del latín *serpentes* (arrastrarse), pertenecen al Grupo de los vertebrados (Vertebrata) (Perez, 2012), al Phylum cordados (cuerpo dorsal simétrico), Subphylum vertebrados (endoesqueleto y cráneo), clase Reptilia (corazón de tres cavidades y respiración pulmonar), orden Squamata (escamas), porque tienen el cuerpo totalmente recubierto de escamas epidérmicas, suborden Ophidia y se caracterizan por tener temperatura corporal variable (poiquiloterms).

5.2. Familia Viperidae

La familia Viperidae, conocida también como las víboras, son un grupo de serpientes que se caracterizan por ser venenosas y peligrosas, pueden causar lesiones permanentes o la muerte; presentan dentición solenoglifa, generalmente tienen la cabeza en forma triangular, pupilas verticales y presentan fosas termorreceptoras. Estas serpientes son de comportamiento agresivo cuando se sienten amenazadas, y en Colombia esta familia está representada por 6 géneros, entre los cuales se incluyen las especies que son las principales causantes de accidentes ofídicos en el país (Ayerbe and Latorre, 2010).

5.3. Género *Lachesis*

La principal característica del género *Lachesis* es la forma de las escamas, las cuales son elevadas y, por tal razón, los lugareños de las zonas donde habita esta especie la nombran “verrugoso”. Este género de serpientes venenosas se encuentra en zonas boscosas remotas de Centro y Sur América, y en la isla de Trinidad, además, comprende las víboras más largas del mundo, presentando adultos que varían en longitud desde los 2 hasta los 2,5 m (el mayor espécimen conocido fue 3,65 m). El envenenamiento humano por *Lachesis* es poco frecuente, pero bastante grave, debido al gran rendimiento de veneno (200-400 mg), y se caracteriza por el daño visible local de los tejidos (edema, hemorragia y necrosis), náuseas, coagulopatías, hipotensión, bradicardia, diarrea, vómitos, trastornos de choque y alteraciones renales (Madrigal et al., 2012).

Actualmente el género *Lachesis* está representado por 4 especies: *L. stenophrys*, *L. melanocephala*, *L. muta* y la especie a estudiar *L. acrochorda* (Chochoan bushmaster). Estas serpientes habitan en bosques primarios, se caracterizan por presentar manchas dorsales irregulares y la superficie ventral de la cola presenta grandes motas o barras, el iris es café rojizo oscuro, tan fuerte en adultos que la pupila no siempre es visible, coloración del cuerpo rojizo o café pardo, con manchas dorsomediales café oscuro o negras (Madrigal *et al.*, 2012).

5.4. Veneno de *L. acrochorda*

El veneno de la serpiente *L. acrochorda* contiene en mayor proporción serina proteinasa (SP), péptidos de bradicinina potencial (VAP), metaloproteinasas de veneno de serpiente (SVMP), ácido L-amino oxidasa (LAO), proteínas lectinas tipo C (CTL), y en menor proporción fosfolipasas A₂ (PLA₂), veneno de serpiente con factor de crecimiento endotelial vascular (svVEGF) y una proteína secretora rica en cisteína (CRISP) (Madrigal *et al.*, 2012).

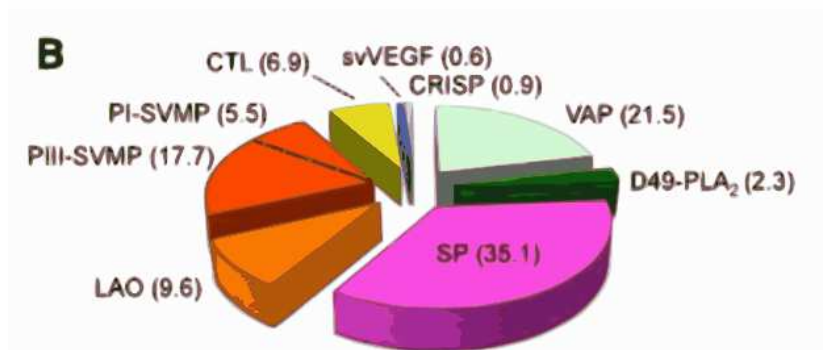


Figura 1: distribución porcentual de toxinas de *L. acrochorda*, proteínasa (SP), péptidos de bradicinina potencial (VAP), metaloproteinasas de veneno de serpiente (SVMP), ácido L-amino oxidasa (LAO), proteínas lectinas tipo C (CTL), fosfolipasas A₂ (PLA₂), veneno de serpiente con factor de crecimiento endotelial vascular (svVEGF) y una proteínas secretora ricas en cisteína (CRISP), tomado de (Madrigal *et al.*, 2012)

5.5. Evaluación electrocardiográfica

El electrocardiograma (ECG) es el registro gráfico de los potenciales eléctricos de la actividad del corazón (fibras miocárdicas), en un tiempo determinado (Lopez, 2012). Estas variaciones se captan con electrodos en la superficie de la piel o por punción, y a través de los conductores llega al fisiógrafo que mide los potenciales de acción del corazón y los registra. El ECG se utiliza para medir el ritmo y la regularidad de los latidos de corazón, permite identificar cualquier daño del miocardio, y también es útil para identificar efectos cardiacos que tienen diferentes sustancias (Magdaleno, 2014).

5.5.1. Derivaciones del ECG

Un ECG está compuesto por 3 tipos de derivadas: derivadas bipolares que registran la diferencia de potenciales entre dos electrodos (DI, DII, DIII), derivadas unipolares en el plano frontal, se llaman así, porque tienen como polo positivo la extremidad, y como polo negativo la señal resultante de promediar las otras dos extremidades (AVL, AVR, AVF); y las derivadas precordiales en el plano horizontal (V1, V2, V3, V4, V5, V6) (Lopez, 2012).

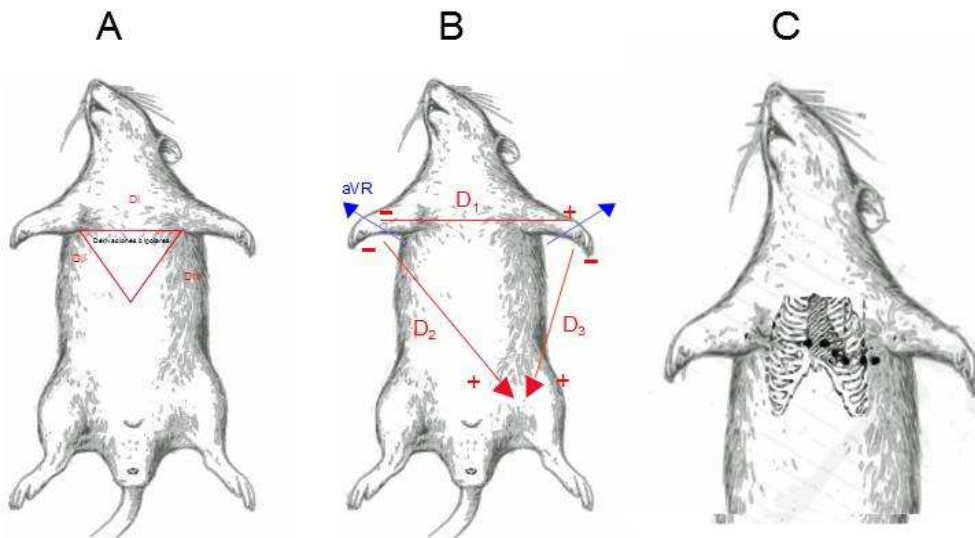


Figura 2: representación de las 12 derivaciones. A, derivaciones bipolares; B, derivaciones unipolares; C, derivaciones precordiales.

Para comprender cómo ocurre la despolarización de las aurículas y los ventrículos se debe conocer la morfología de las ondas P, el complejo QRS, y la onda T (Figura 3) (Lopez, 2012):

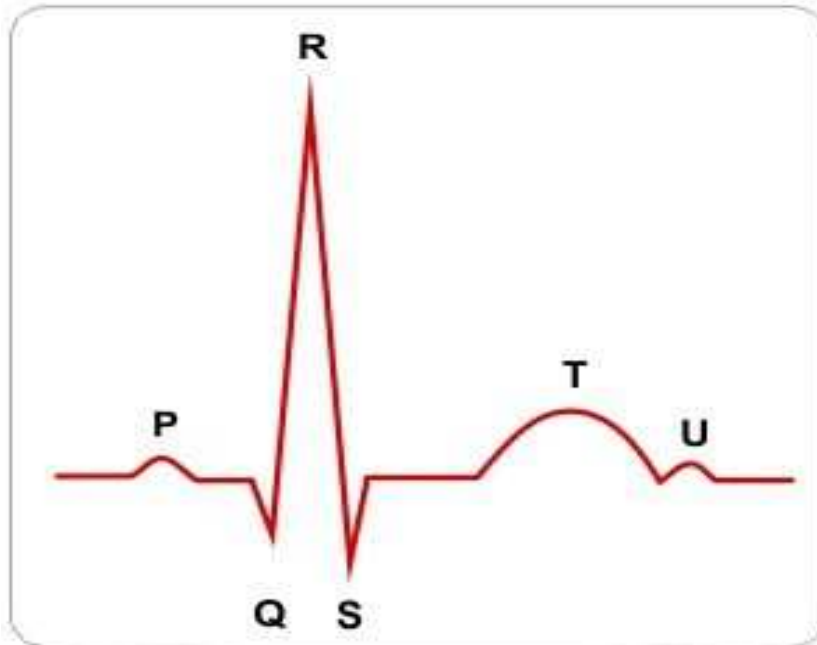


Figura 3: morfología de las ondas cardíacas

Onda P: Activación auricular.

Intervalo P-R: Se trata del tiempo que transcurre desde la salida del impulso en el nódulo sinusal, hasta alcanzar el nódulo aurículo-ventricular.

Complejo QRS: Despolarización ventricular. En este complejo, la primera onda negativa se denomina q, la primera onda positiva se denomina R, y la onda negativa que es posterior a la R, se denomina s (Lopez, 2012).

Onda T: Repolarización ventricular (Lopez, 2012) .

Conducción cardíaca

El sistema de conducción especializado del corazón está diseñado para generar los impulsos eléctricos, transmitir la actividad eléctrica rápidamente, coordinar los momentos de contracción de los atrios y ventrículos y responder ante las modulaciones del sistema nervioso simpático y parasimpático. Como las células del corazón están unidas de forma tan íntima entre sí por medio del sistema de conducción, la despolarización que comienza en cualquier área se extiende rápidamente a través del corazón. Sin el sistema de conducción, la despolarización tendría que ocurrir de célula a célula, y, como consecuencia, tardaría mucho más tiempo en desplazarse a través del corazón. Bajo condiciones normales, el área que se despolariza más rápidamente (y así marca la frecuencia cardíaca) es el nódulo senoatrial. El nódulo senoatrial se localiza en la unión de la vena cava craneal y la parte superior del atrio derecho. La despolarización se extiende a través del atrio en dirección hacia abajo, hacia los ventrículos, y entonces alcanza el nódulo atrioventricular, el cual se localiza en la unión entre el atrio derecho y el ventrículo derecho.

La corriente de despolarización es retrasada en el nódulo atrioventricular, de modo que le dará tiempo a los ventrículos a llenarse de sangre. La actividad eléctrica se mueve lentamente a través del nódulo atrioventricular y en las porciones proximales del sistema de conducción ventricular. Este sistema de conducción es conocido como fascículo de His. Este fascículo está formado por una rama derecha y una rama izquierda, esta última a su vez se subdivide en rama izquierda anterior y posterior. La primera parte del miocardio ventricular en ser despolarizado después de que la onda de despolarización deja el fascículo de His es el septo interventricular, el cual sufre la despolarización en una dirección de izquierda a derecha. La corriente luego se extiende a lo largo de las ramas izquierda y derecha del fascículo hacia el vértice del corazón. Aquí las fibras de Purkinje dirigen la onda de despolarización a través de los ventrículos en una dirección ascendente (hacia arriba), esencialmente exprimiendo la sangre de los ventrículos hacia afuera. La última área en ser despolarizada es la parte más superior de la pared libre del ventrículo izquierdo.

Toda esta actividad produce un latido cardíaco sincronizado que envía la sangre al cerebro y permite al cuerpo mantener la funcionalidad.

5.2. Enzimas cardíacas

Las enzimas cardíacas suelen ser usadas como marcadores de lesiones que ocurren en las fibras del miocardio; son estructuras proteicas que se encuentran dentro de las células musculares del corazón (cardiocytes). La concentración de las enzimas cardíacas aumenta en la sangre en situaciones en las cuales el corazón está sufriendo un daño, por ejemplo, un infarto agudo de miocardio (IAM), o cuando los cardiocytes mueren por falta de oxígeno (Cortés, 2007).

Creatincinasa (CK)

La creatincinasa es una enzima del citoplasma y la mitocondria que cataliza tanto la formación de ATP como la fosforilación reversible de la creatina, utiliza el ATP como grupo donador de fosfato (Cortés, 2007).

5.3. Fuentes tisulares de CK

El CK se encuentra abundante en el músculo esquelético, esta existe como un dímero que consta de dos subunidades que son: B (cerebro) y N (músculo) y estos se combinan para formar 3 isoenzimas: CK-BB (CK1), CK-MB (CK2) y CK-MM (CK3). La CK se eleva principalmente en afecciones del tejido músculo-esquelético, en el miocardio, o el cerebro. La creatincinasa se encuentra casi de manera exclusiva en el miocardio, su elevación es de gran utilidad para detectar infarto; la actividad de fracción CK-MB suele ser máxima entre las 12 y 24 horas después de un infarto de miocardio, volviendo a los valores normales después de las 48 a 72 horas, en los casos sin complicaciones. La CK-MB también se eleva en los casos de miocarditis, en la distrofia muscular de Duchenne, la polimiositis, la rabdomiólisis y otros trastornos miocárdicos o miopáticos (Santaló et al., 2014).

6. ANTECEDENTES

Después de realizar un rastreo de investigaciones nacionales e internacionales con respecto a los efectos cardiotoxicos del veneno de *Lachesis acrochorda* en ratas, se encontraron algunos estudios relacionados con los accidentes ofídicos, efectos clínicos y su incidencia en la morbilidad y la mortalidad humana. Por otra parte, otras investigaciones llevaron a cabo análisis del efecto cardiotoxico de venenos de distintas especies de serpientes como *Bothrops sp*, *Crotalus durissus cumanensis* y *Lachesis muta stenophrys*, entre otras, así como el efecto del veneno de escorpiones *Tityus sp* y *T. serrulatus*. Aunque no se hallaron estudios relacionados específicamente con el efecto cardiotoxico del veneno de *L. acrochorda* en ratas, las investigaciones encontradas son oportunas para nuestro estudio, ya que refieren datos necesarios para esta investigación, por ejemplo:

Otero *et al.*, (1992), en un informe basado en los aspectos clínicos y epidemiológicos de los accidentes ofídicos en Antioquia y Chocó, plantean que los venenos bothrópico y lachésico inducen severas alteraciones locales (edema, hemorragia, necrosis de tejido muscular y conectivo) y efectos sistémicos tales como alteraciones de la hemostasia, manifestaciones hemorrágicas, choque cardiovascular y nefrotoxicidad, y que, a pesar de que la incidencia de los accidentes lachésicos es baja (2%), la mortalidad es alta.

Otro estudio importante para nuestra investigación es el de Incio Ruiz *et al.*, (1993) quienes estudiaron la toxicidad y neutralización de venenos ofídicos peruanos de los géneros *Bothrops* y *Lachesis*. Para ello se inoculó veneno a ratones albinos machos de la cepa Balb/C de 18 a 22 g. En dicho análisis las DL₅₀ (método de Probits) del veneno de estas serpientes reflejan que la toxicidad de los venenos depende de la vía de inoculación del mismo. Por ejemplo la DL₅₀ de la serpiente del género *Lachesis* no logró ser determinada por vía endovenosa, ya que los ratones albinos, una vez inoculados con el veneno, no podían sobrevivir más de 10 min, lo que lleva a concluir que el veneno de *Lachesis*, es muy tóxico por esta vía.

Por otra parte, Granados-Zúñiga & Aragón-Ortíz (1998) estudiaron las alteraciones cardiovasculares inducidas por el veneno de *Lachesis muta* y por su enzima

fibrinogenolítica, para lo cual utilizaron la enzima desfibrinogenolítica aislada del veneno liofilizado de la serpiente *L. m. stenophrys*. Estos experimentos se hicieron en ratas albinas (*R. norvegicus*), a las cuales se les evaluaron cambios en la presión arterial y en los electrocardiogramas (electrodos de punción) durante la inoculación del veneno y 20 minutos después, se extrajo el corazón para obtener tejidos. Finalmente, los resultados sugieren un uso potencial de la enzima fibrinogenolítica como agente antitrombótico que no produce alteraciones cardíacas.

Así mismo, Hernández *et al.*, (2005) evaluaron las alteraciones ultraestructurales de tejido cardíaco tratado con veneno crudo de serpiente de cascabel (*C. d. cumanensis*). Para el estudio histológico se tomaron fragmentos de tejido cardíaco: septum interauricular y paredes de aurículas de 1 mm de diámetro, teñidos con acetato de uranilo y citrato de plomo, las placas fueron observadas en un microscopio electrónico. Según los resultados obtenidos, los cardiomiocitos mostraron una alta actividad proteolítica y hemorrágica y se descartaron procesos que afectan gravemente al corazón.

Por otro lado, Sifuentes *et al.*, (2008) estudiaron la capacidad de la suramina para antagonizar la cardiotoxicidad y algunas actividades enzimáticas del veneno crudo de *Bothrops jararacussu*. Este estudio se hizo en corazón aislado de ratas, donde la solución de perfusión mostró un aumento en la tasa de creatina quinasa inducida por el veneno. Del mismo modo, *in vivo*, inyectaron veneno de forma intravenosa en la vena yugular de ratas anestesiadas, y notaron que este veneno produce una rápida reducción en la presión arterial media y los cambios en el tamaño de las ondas en el ECG, extrasístoles, bradicardia, que conduce a un paro cardíaco después de 6-8 min postinoculación.

Noriega-Alvarado *et al.*, (2009) realizaron pruebas para medir cambios séricos en las enzimas ALT, AST, FA, CK-total y LDH inducidos por veneno de *C. d. cumanensis* en ratones Balb/c inoculados con veneno crudo, vía intraperitoneal, y los controles con solución fisiológica. Las muestras de sangre fueron obtenidas por punción intracardiaca a diferentes intervalos de tiempo postinyección (1; 3; 6; 12 y 24 h). El

análisis de datos con respecto la enzima CK-TOTAL indicó daño en tejido cardíaco y/o esquelético en las primeras 24 horas de exposición al veneno, ya que este veneno posee acción directa sobre el tejido muscular y estriado.

Otro estudio relevante para los objetivos de esta investigación fue el realizado por Pinto *et al.*, (2010) quienes analizaron el efecto cardiorrespiratorio que produce el veneno del escorpión brasileiro *T. serrulatus* en ratas machos cepa WISTAR recién destetadas. En este estudio se realizaron registros electrocardiográficos antes y después de la inoculación del veneno, los resultados mostraron que todos los animales sometidos a tratamiento con este veneno presentaron alteraciones en el ECG, compatibles con el desequilibrio electrolítico, miocarditis, alteraciones del sistema de conducción cardíaca y bradicardia. Además, evaluaron parámetros como los niveles de las enzimas cardíacas CK y CK-MB, las cuales presentaron un aumento significativo, y, por último, se hicieron análisis histológicos del corazón, en el cual no detectaron lesiones.

El estudio de los efectos cardiotóxicos también fue llevado a cabo por Beltrán *et al.*, (2011) mediante electrocardiografía, análisis enzimático sérico e histológico. El efecto cardiotóxico del veneno total de la serpiente *C. d. cumanensis* fue evaluado en ratas macho *R. norvegicus* de la cepa WISTAR, distribuidas al azar en cuatro grupos cada uno: 3 tratamientos con veneno diluido a diferentes concentraciones (80%, 40% y 20%) y uno con solución salina (0,9%) como control. Los ECG revelaron que las ratas tratadas con veneno mostraron ritmos sinusales con ligeras variaciones de voltaje, disminución de la amplitud de la onda R y elevación de la onda T, algunas fibrilaciones auriculares, sin alteraciones del sistema de conducción cardíaco; los niveles de CK y CK-MB, presentaron aumento significativo en proporción directa a la cantidad de veneno inoculado, y el análisis histopatológico mostró inicio de necrosis en miocitos con leves hemorragias. Las ratas tratadas con solución salina 0,9 % no presentaron ninguna alteración, lo cual llevó a concluir que el veneno total de *C. d. cumanensis*, aplicado en dosis subletales, genera efectos cardiotóxicos.

Entre las líneas de investigación consultadas encontramos un estudio realizado por Madrigal *et al.*, (2012), quienes hicieron un análisis proteómico de cambios ontogenéticos en la composición del veneno de *L. stenophrys*, y la caracterización de los proteomas de veneno de dos víboras congéneres, *L. melanocephala* y *L. acrochorda*. Junto con la caracterización anterior del proteoma del veneno de *L. m. muta*. El resultado fue un panorama comparativo de la composición y distribución de las proteínas tóxicas en todo el género *Lachesis*. De acuerdo a los resultados obtenidos de la caracterización del veneno de las serpientes *L. acrochorda* y *L. melanocephala*, encontraron que estos son muy similares entre sí, lo cual llevó a determinar que la sintomatología producida por envenenamiento lachésico es similar en las 4 especies. Estos hallazgos apuntan a una variación geográfica baja en la composición del veneno de *L. m. muta*, y por tanto, la alta divergencia entre *L. m. muta* y *L. acrochorda*, lo cual apoya la clasificación de estos taxones como especies diferentes.

Asimismo, Núñez-Rangel *et al.*, (2012) llevaron a cabo el desarrollo de un ensayo inmunoenzimático ligado a enzima (ELISA) para la identificación específica del veneno de *L. acrochorda*. Los venenos de *L. acrochorda*, *Bothrops asper*, *Porthidium nasutum*, *Bothriechis schlegelii* y *C. d. cumanensis*, todos de Colombia; algunas de las proteínas de veneno de *L. acrochorda* identificadas fueron una lectina Gal específica y una metaloproteinasa. Esta prueba puede ser útil para los médicos, ya que podría ser aplicable para el seguimiento de la distribución cinética de antígenos en pacientes o animales experimentalmente envenenados.

Del mismo modo, Pla *et al.*, (2013) hicieron el análisis proteómico de *L. m. rhombeata*, de Brasil. Junto con la caracterización previa de los proteomas de veneno de *L. stenophrys* y *L. melanocephala* (Costa Rica), *L. acrochorda* (Colombia), y *L. m. muta* (Bolivia), lo que proporciona la primera visión general de la composición y distribución de las proteínas del veneno a través de todo el género, y destaca la parecida composición y notables perfiles farmacológicos de los venenos de *Lachesis*. La paraspecificidad de dos antivenenos, producida en el Instituto Vital Brasil (Brasil) y el Instituto Clodomiro Picado (Costa Rica), utilizando diferentes

taxones del mismo género. El análisis proteómico de estos venenos confirma que los venenos de *Lachesis* tienen una composición similar entre los venenos de sudamérica y América central, lo cual lleva a concluir que la disponibilidad de los dos antivenenos producidos en Brasil y Costa Rica, y otros antivenenos en las Américas técnicamente garantiza la cobertura clínica para cualquier envenenamiento de *Lachesis sp.*

Otro referente de investigación consultado fue el llevado a cabo por Bolaños, (2013) quien determinó la actividad cardiotoxica del veneno liofilizado del escorpión *Tityus sp.*, en ratas macho cepa WISTAR, las cuales fueron distribuidas aleatoriamente en 4 grupos: 1 control tratado con solución salina 0,9% y 3 experimentales tratados con subdosis letales (80, 40 y 20 %) de la DL50, encontrando que el veneno de este escorpión produce graves alteraciones cardiacas como bloqueos auriculoventriculares, elevación de las enzimas CK y CK-MB, y daños histológicos como edema y necrosis.

En síntesis, las líneas de investigación consultadas ofrecen referentes teóricos indispensables para el desarrollo de los objetivos de la presente investigación.

7. OBJETIVOS

Objetivo general

Determinar el efecto cardiotóxico del veneno de *Lachesis acrochorda* (García, 1896) en ratas *Rattus norvegicus* cepa Wistar.

Objetivos específicos

➤ Establecer las alteraciones de las ondas cardíacas por acción del veneno de *L. acrochorda*, mediante registro electrocardiográfico en ratas Wistar (*Rattus norvegicus*).

➤ Identificar las alteraciones causadas por el veneno de *L. acrochorda* sobre los niveles de las enzimas cardíacas CK y CK-MB de las ratas.

➤ Evaluar los daños histológicos producidos por el veneno de *L. acrochorda* en el corazón de las ratas.

8. MATERIALES Y MÉTODOS

Mantenimiento de las serpientes

Las serpientes *L. acrochorda* se mantuvieron en terrarios de vidrio rotulados, en el Centro de Investigaciones Biomédicas de la Universidad del Cauca (CIBUC). Estos animales se alimentan e hidratan *ad libitum*.

Extracción del veneno

La extracción del veneno de *L. acrochorda*, se realizó de forma manual. Inicialmente se inmoviliza la serpiente con un gancho herpetológico, sujetándola por la parte posterior de la cabeza, presionando con el dedo índice, y sujetando con los otros dedos por el cuello.

Luego se indujo al animal para que mordiera el embudo de vidrio (Figura 4), previamente recubierto con papel parafilm. En la parte inferior del embudo se utilizó un falcon para la recolección del veneno.



Figura 4: extracción de veneno de *L. acrochorda*.

Una vez extraído el veneno, se adicionó agua destilada para recuperar y diluir el veneno suspendido en el embudo, se alicuotó en tubos Eppendorf estériles de 1,5 ml y se llevaron a cabo los siguientes procedimientos:

Procesamiento de veneno

Las muestras se centrifugaron a 15 000 rpm, a 8 °C durante 15 minutos, en centrífuga (Labnet Hermle Z 233 MK-2), con el fin de limpiar el veneno de sangre e impurezas.

De la suspensión obtenida, se recuperó el sobrenadante donde están las toxinas. Luego se selló la muestra con papel parafilm, se congeló con nitrógeno (se expuso el veneno por 30 seg) y se liofilizó. Por último, el veneno fue almacenado a -20 °C, hasta el momento de uso en el experimento.

Animales experimentales

Para el estudio se utilizaron ratas macho, cepa WISTAR (*R. norvegicus*), en estado juvenil, con un peso de 240 g (\pm 20g), que fueron suministradas por el Centro de Investigaciones Biomédicas de la Universidad del Cauca CIBUC, donde fueron cuidados y alimentados *ad libitum* hasta 12 h antes de la experimentación y la hidratación no se retiró en ningún momento.

Tipo de estudio

Este fue un estudio experimental *in-vivo*, en el que se empleó ratas WISTAR (*R. norvegicus*) a las cuales se les aplicó diferentes subdosis letales (80%, 40% y 20%) de la DL₅₀ veneno de *L. acrochorda*, con un valor de 16,08µg/g, por vía intraperitoneal, para posteriormente analizar el efecto cardiaco, por medio de registros electrocardiográficos, histológicos y enzimáticos.

Registros electrocardiográficos

Para la toma de electrocardiogramas, los biomodelos fueron sedados con pentobarbital sódico (60mg/kg) (Gimeno *et al.*, 1990). Se utilizó un equipo de polígrafo powerlab de ADInstruments, de 8 canales, mediante la derivación bipolar de plano frontal DII.

El registro del EGC se hizo con electrodos de punción (Figura 5), y en cada bloque se tomaron registros durante 5 min así:

- Bloque 1: 10 min después de inyección de tratamiento
- Bloque 2: 1 hora después de inyección de tratamiento

- Bloque 3: 2 horas después de inyección de tratamiento
- Bloque 4: 3 horas después de inyección de tratamiento

Para los organismos del grupo control se tomarán los mismos registros, pero se les aplicará solución salina al 0,9% como tratamiento.



Figura 5: conexión con electrodos de punción para toma de registro ECG.

Determinación de los niveles de enzimas cardiacas CK y CK-MB

Luego de haber tomado los registros correspondientes tras la inoculación, se hizo cirugías a las ratas, iniciando por la parte ventral, se retiró la piel y se hizo una incisión con el escalpelo en el tórax para hacer una disección hasta llegar al cuello. Se tomaron muestras de sangre de la vena cava descendente, ubicada en la parte posterior de la masa visceral, con un yelco de 20G, la sangre se recogió en tubos separadores de suero (microtainer IMPROMINI, tapa amarilla Gel and clot activator 0,5 ml), que contenían gel separador para acelerar el proceso de coagulación, con el fin de facilitar la separación entre el suero y el contenido celular. Las muestras se dejaron reposar a temperatura ambiente por 30 minutos, tiempo necesario para la formación de coágulos. Pasado este tiempo, se centrifugó durante 15 minutos a 3500 rpm, con el fin de extraer el suero para efectuar la lectura de las muestras en laboratorio clínico por proceso de succión para lo cual se empleó el equipo BTS-310 marca Byosystems.

Análisis histológico

Se extrajo el corazón de cada rata, se limpió con solución salina al 0,9% para evitar restos de sangre en el tejido, se hizo cortes transversales que fueron depositados en una rejilla para tejidos previamente rotulada.

La fijación se realizó durante 48h en formol buferado al 10%, continuando con la fase de deshidratación en alcoholes ascendentes, de la siguiente manera: 3 alcoholes del 96% (una hora por c/u), 5 alcoholes absolutos (una hora por c/u), se hizo la aclaración o diafanización de las muestras, posteriormente estas se infiltraron en parafina a 59°C, por último, se hizo inclusión en un bloque de parafina, los cortes (4µm) se realizaron por medio de un micrótopo y cada lámina se tiñó con hematoxilina-eosina para analizarlas con el microscopio óptico y determinar las alteraciones causadas por el veneno en el tejido cardíaco.

Diseño experimental

Se empleó un diseño experimental completamente al azar y otro de bloques aleatorizados, donde se usaron 20 ratas WISTAR macho (*R. norvegicus*), homogéneas en cepa, edad, peso y sexo, que fueron distribuidas aleatoriamente en 4 grupos: 3 grupos experimentales y uno de control, como se muestra en la tabla (1), para las comparaciones histológicas se aplicó la prueba de Chi-cuadrado.

Tabla 1. Aplicación de los tratamientos por bloque.

Individuo	Concentración de sustancia aplicada	Cantidad	Vía aplicación
Rata 1	Sl'n salina 0,9%	300 µl	Intraperitoneal
Rata 2	80% de DL ₅₀ del veneno	300 µl	Intraperitoneal
Rata 3	40% de DL ₅₀ del veneno	300 µl	Intraperitoneal
Rata 4	20% de DL ₅₀ del veneno	300 µl	Intraperitoneal

Para el análisis estadístico se utilizaron los programas BioEstat versión 5.3 GraphPad Prism versión 5, los análisis se realizaron por contraste de hipótesis, con previo estudio de ajuste a la curva normal. Los gráficos se elaboraron con el

programa GraphPad Prism versión 5. En la Tabla 2, se referencian las pruebas estadísticas aplicadas para cada parámetro analizado:

Tabla 2: Estadística de las pruebas aplicadas.

PARAMETRO	ALTERACIÓN	PRUEBA ESTADISTICA	PRUEBA COMPLEMENTARIA
ELECTROCARDIOGRAFÍA	Amplitud onda P	Anova 2 vías	Bonferroni posttests
	Amplitud onda T	Anova 2 vías	Bonferroni posttests
	Duración intervalo QT	Anova 2 vías	Bonferroni posttests
	Frecuencia cardiaca	ANOVA 1 vía	Tukey
ENZIMAS CARDIACAS	Enzima CK	ANOVA 1 vía	Tukey
	Isoenzima CK-MB	Kruskal-Wallis	Dunn
ALTERACIONES HISTOLÓGICAS	Edema	Chi-Cuadrado	Partición LxC
	Edema	Chi-Cuadrado	Partición LxC
	Necrosis	Chi-Cuadrado	Partición LxC

9. RESULTADOS

En el presente trabajo se reportan alteraciones cardiacas, claramente observadas en las variaciones electrocardiográficas del grupo control, al compararse con las de los tratamientos (20, 40 y 80 % DL50). Estas alteraciones son notorias en los registros de la amplitud de las ondas P y T figuras 6 y 7 respectivamente, en la duración del segmento Q-T figura (8) y en la variación de la frecuencia cardiaca figura (9).

9.1. Análisis electrocardiográfico

9.1.1. Amplitud de la onda P

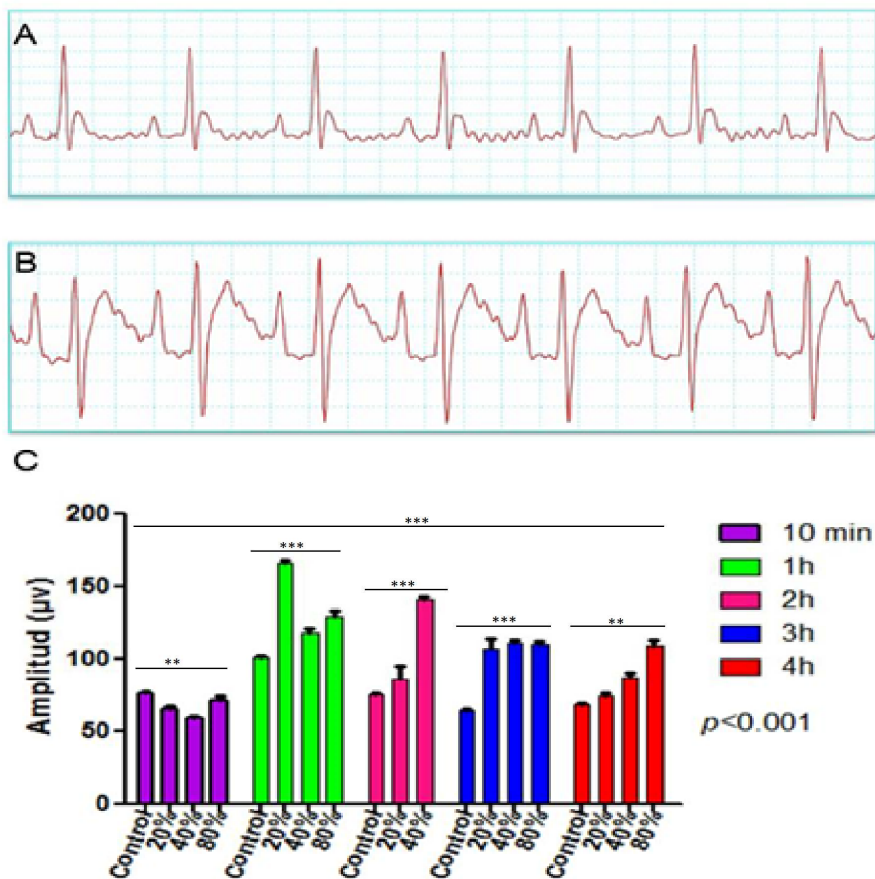


Figura 6: Alteraciones en la onda P. A, registro de ECG normal en rata control. B registro de ECG en ratas inyectadas con veneno de *L. acrochorda* indicando la anormal elevación de la onda P. C, análisis estadístico, Anova de dos vías contrastando los valores de la amplitud de la onda P en cada uno de los bloques (horas) y Tratamientos (control y subdosis de la DL50 del veneno de *L. acrochorda* aplicadas), mostrando una diferencia altamente

significativa ($p < 0.005$) entre la amplitud de la onda P de los controles con relación a la de los tratamientos, siendo en las 2 y 3 horas donde presentó mayor elevación.

La alteración de la onda P sugiere que hay posible aumento de tamaño de la aurícula izquierda del corazón, embolismo pulmonar, presencia de posible infarto agudo del miocardio, edema pulmonar o hipertensión pulmonar.

9.1.2. Amplitud de la onda T

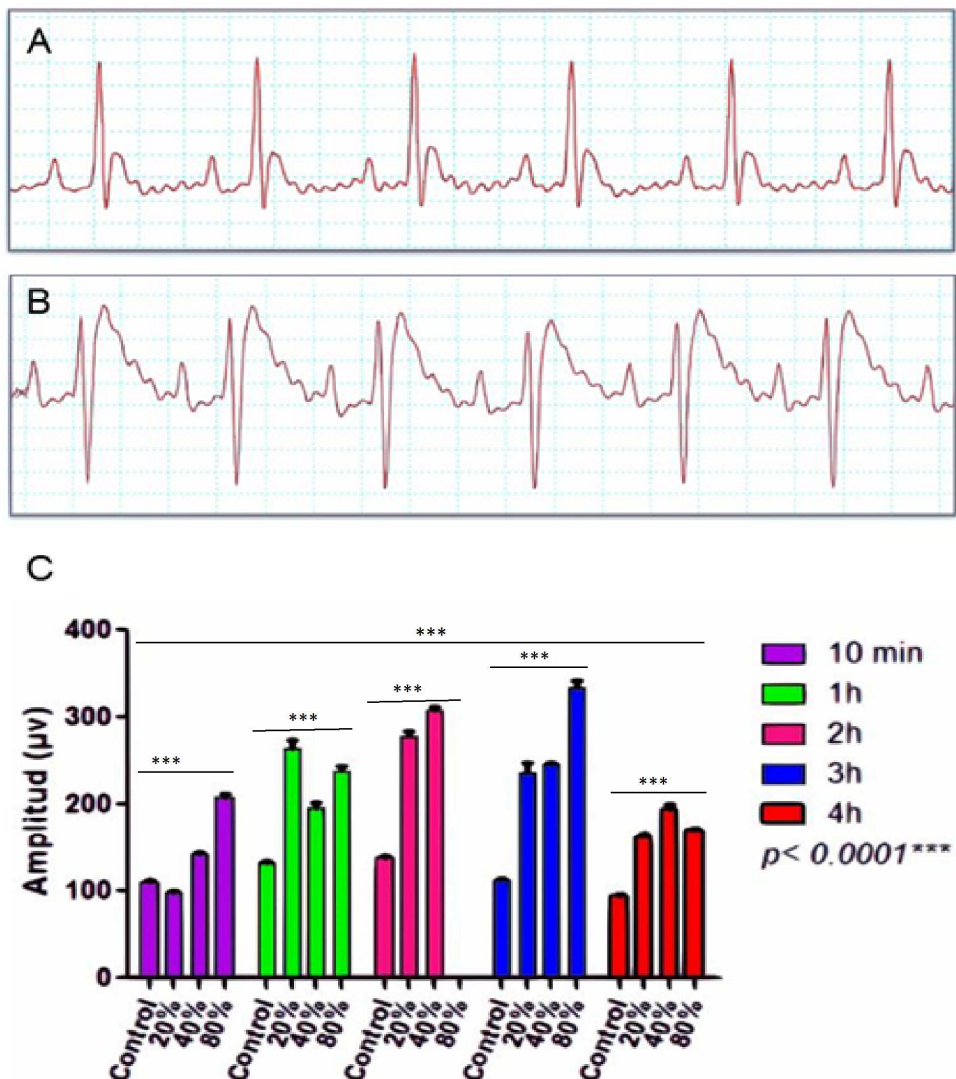


Figura 7: Alteraciones en la onda T. A, registro de ECG normal en rata control. B registro de ECG en ratas inyectadas con veneno de *L. acrochorda* indicando la anormal elevación de la onda T. C, análisis estadístico, Anova de dos vías contrastando los valores de la amplitud de la onda T en cada uno de los bloques (horas) y Tratamientos (control y subdosis de la

DL50 del veneno de *L. acrochorda* aplicadas), mostrando una diferencia altamente significativa ($p < 0.005$) entre la amplitud de la onda T de los controles con relación a la de los tratamientos, siendo en las 2 y 3 horas donde presentó mayor elevación.

El aumento de la amplitud de la onda T, sugiere incremento del riesgo de presencia de torsión de puntas, una arritmia cardiaca muy grave, que suele producir paro cardiaco y que suele estar relacionada también con reducción de los niveles de potasio sanguíneo.

9.1.3. Duración de segmento Q-T

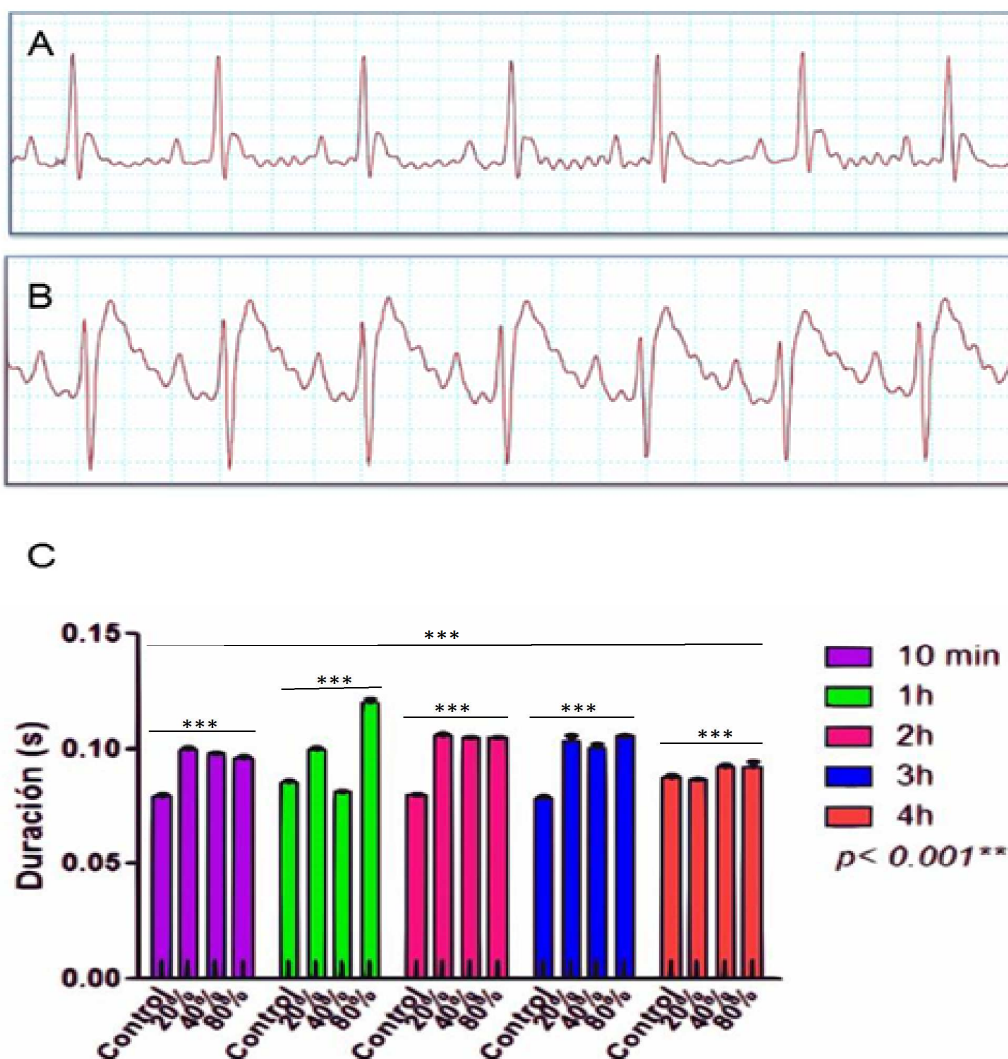


Figura 8: Alteraciones en la duración del intervalo QT. A, registro de ECG normal en rata control. B registro de ECG en ratas inyectadas con veneno de *L. acrochorda* indicando aumento del intervalo QT. C, análisis estadístico, Anova de dos vías contrastando los valores

de la duración del intervalo QT en cada uno de los bloques (horas) y Tratamientos (control y subdosis de la DL50 del veneno de *L. acrochorda* aplicadas), mostrando una diferencia altamente significativa ($p < 0.005$) entre la amplitud de la duración del intervalo QT de los controles con relación al de los tratamientos.

9.1.4. Frecuencia cardiaca

Después de la aplicación de cada uno de los tratamientos utilizados y como se observa en la figura 8 la frecuencia cardiaca disminuye en los tratamientos aplicados con relación a la del grupo control ($F = 6.352$, $p < 0.05$).

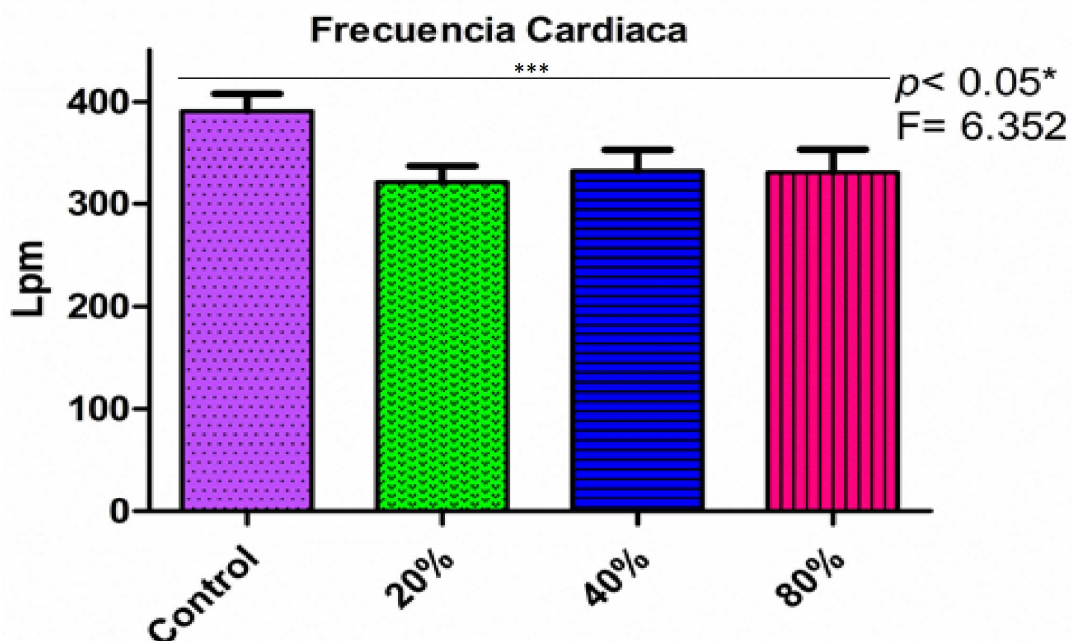


Figura 9: Alteración en la frecuencia cardiaca. Análisis de ANOVA de 1 vía para la frecuencia cardiaca presentada por las ratas en el grupo control y en las subdosis (20%, 40%, 80%), veneno de *L. acrochorda*, después de aplicar el prueba post hoc de Dunnet se reporta diferencia significativa entre la fc del grupo control versus la fc de cada una de las subdosis.

El gráfico estadístico muestra una disminución en la frecuencia cardiaca en las subdosis aplicadas, con respecto a las frecuencias de las ratas control, en especial en las dosis del 20 y el 80% (< 320 Lpm; < 350 Lpm, respectivamente), lo que indica la aparición de una posible bradicardia.

9.2. ANÁLISIS DE ENZIMAS CARDIACAS CK CK-MB

Con el propósito de aumentar evidencias del efecto cardiotoxico, causado por el veneno de *L. acrochorda* se realizaron mediciones de los niveles de las enzimas CK Y CK-MB en sangre de los biomodelos experimentales. Estos resultados se muestran en la Figura 9, en la que se puede observar una tendencia hacia el aumento de los niveles de la enzima CK y CK-MB, lo que sugiere daño miocárdico.

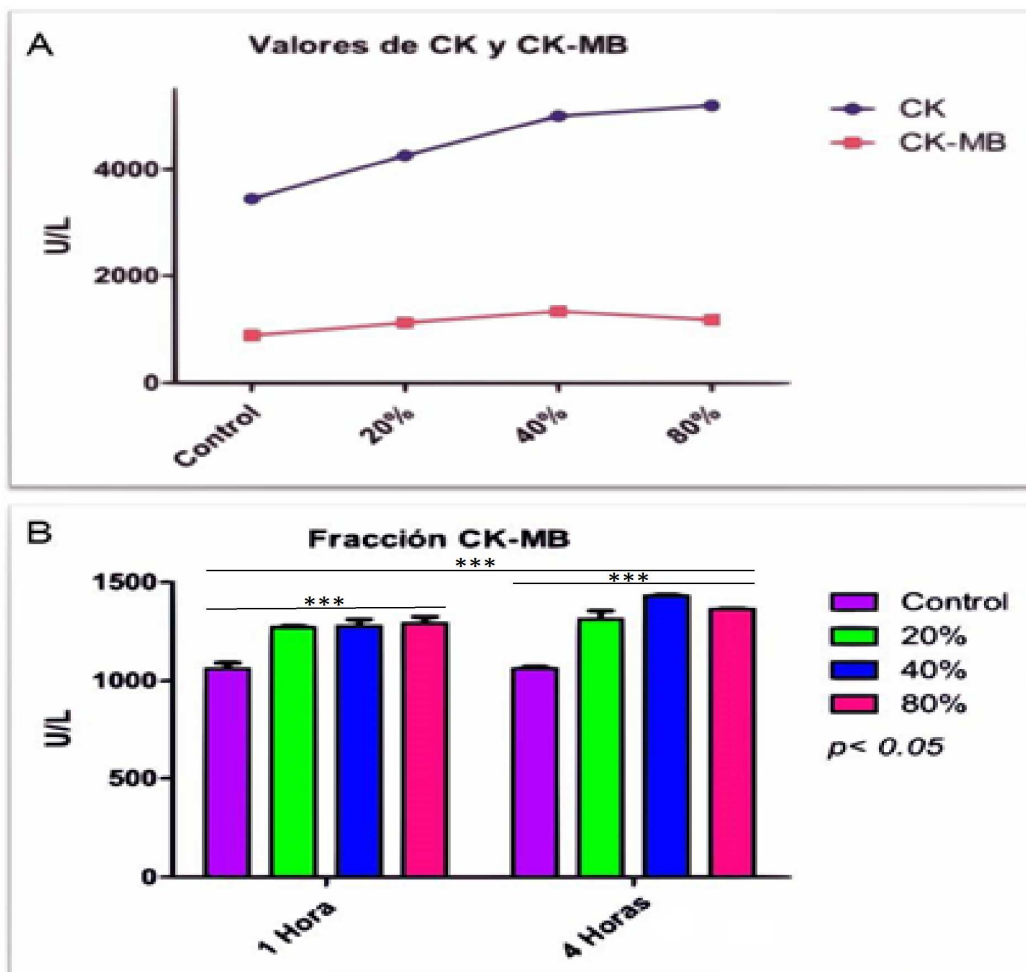


Figura 10: Enzimas cardiacas. A, valores de CK y CK-MB en cada uno de los tratamientos utilizados; B, Contraste por ANOVA de dos vías de los valores de concentración en sangre de la isoenzima CK-MB a la primera y cuarta hora post inoculación del veneno de *L. acrochorda* mostrando una diferencia significativa en el aumento de los niveles de esta isoenzima en los tratamientos versus el control y a las 4 horas de experimento ($p < 0.05$). Se observó que las isoenzimas CK-MB que en las horas 1 y 4, se elevaron de una manera significativa.

9.3. ANÁLISIS HISTOPATOLÓGICO

Adicional a los registros electrocardiográficos, a la medición de los niveles de CK y CK-MB en sangre de los biomodelos experimentales, se extrajo de estos el corazón y se realizó un análisis histopatológico, para ratificar el efecto cardiotoxico causado por el veneno de *L. acrochorda*. En los tejidos cardiacos analizados se observaron las siguientes alteraciones histológicas: Edema, hemorragia interfibrilar, cardiocitólisis y bandas de contracción como se indica en las figuras 11, 12, 13 y 14 respectivamente.

9.3.1. Hemorragia interfibrilar

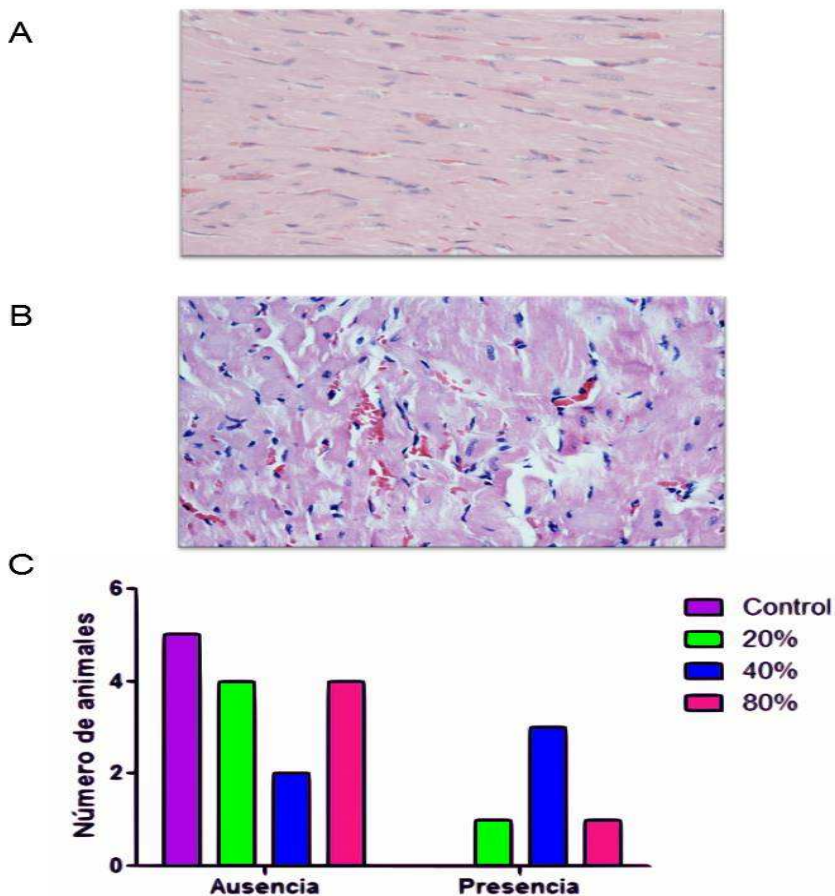


Figura 11: hemorragia interfibrilar. A, tejido normal de ratas control, B tejido con presencia de hemorragia interfibrilar, H-E 40X. C, Análisis estadístico de la hemorragia interfibrilar por la prueba de Chi-Cuadrado indicando que no hay dependencia del veneno para la presencia de esta alteración.

9.3.2. Edema

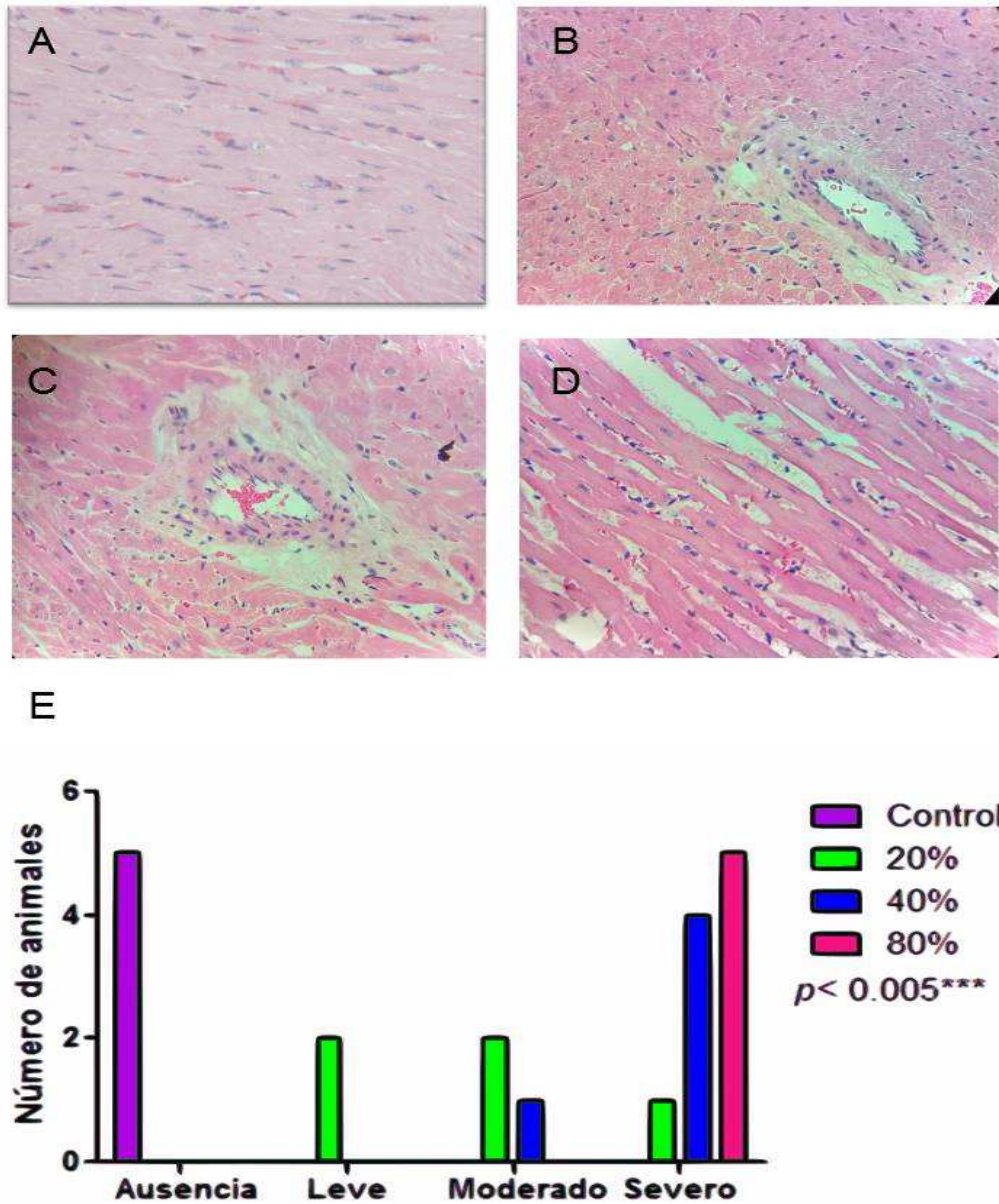


Figura 12: Edema interfibrilar. A, tejido normal de ratas control, B tejido con presencia de edema interfibrilar moderada (ratas inyectadas con 20% de la DL50), C tejido con presencia de edema interfibrilar moderado (ratas inyectadas con 40% de la DL50), D tejido con edema interfibrilar severo (ratas inyectadas con 80% de la DL50), H-E 40X. E, Análisis estadístico del edema por la prueba de Chi-Cuadrado indicando la dependencia en el nivel de alteración según la dosis aplicada.

Las ratas control del grupo control no presentaron edema, mientras que las ratas tratadas con veneno, si presentaron esta alteración, lo cual indica que el veneno produce edema interfibrilar.

9.3.3. Cardiocitólisis

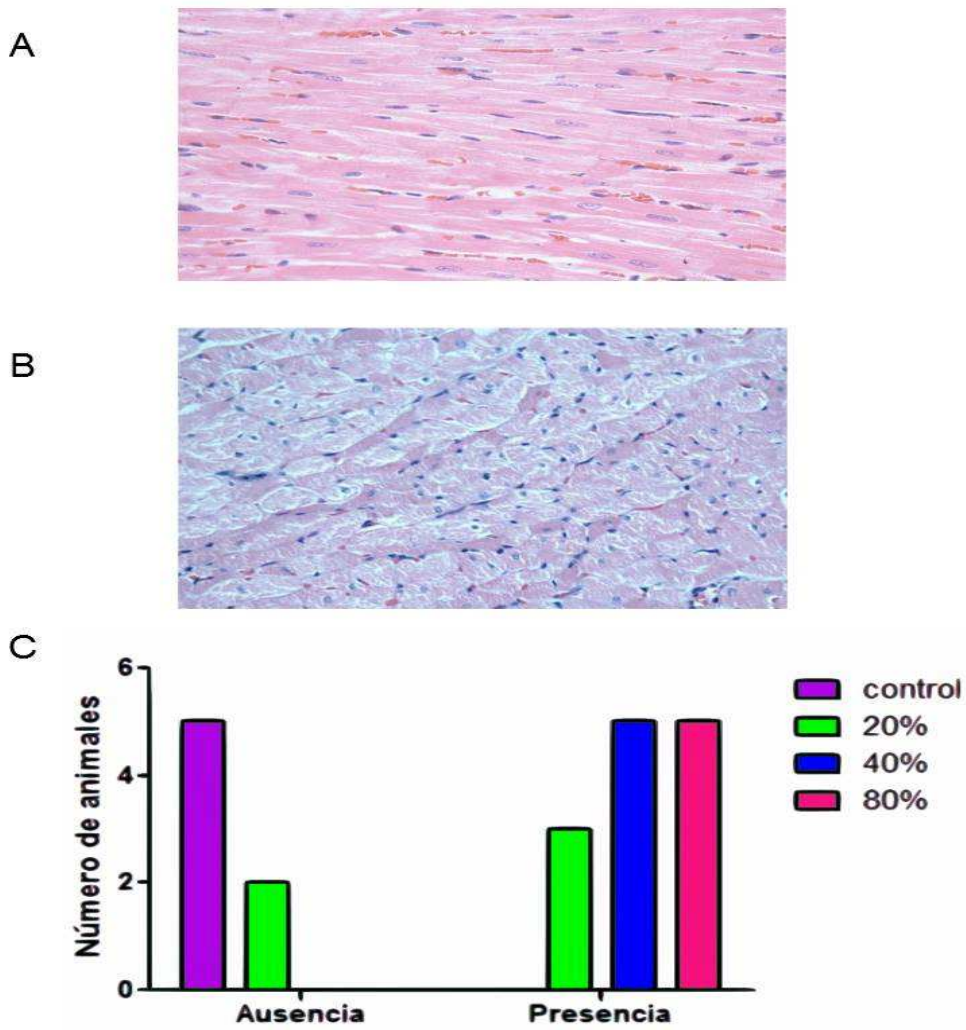


Figura 13: cardiocitólisis. A, tejido normal de ratas control, B tejido con presencia de cardiocitólisis, H-E 40X. C, Análisis estadístico de la presencia de cardiocitólisis por la prueba de Chi-Cuadrado indicando la dependencia en el nivel de alteración según la dosis aplicada.

Las ratas control del grupo control no presentaron edema, mientras que las ratas tratadas con veneno, si presentaron esta alteración, lo cual indica que el veneno

produce cardiocitólisis (muerte celular), asociada a infarto de miocardio causada posiblemente por los efectos sistémicos producido por el veneno de *L. acrochorda*.

9.3.4. Bandas de contracción

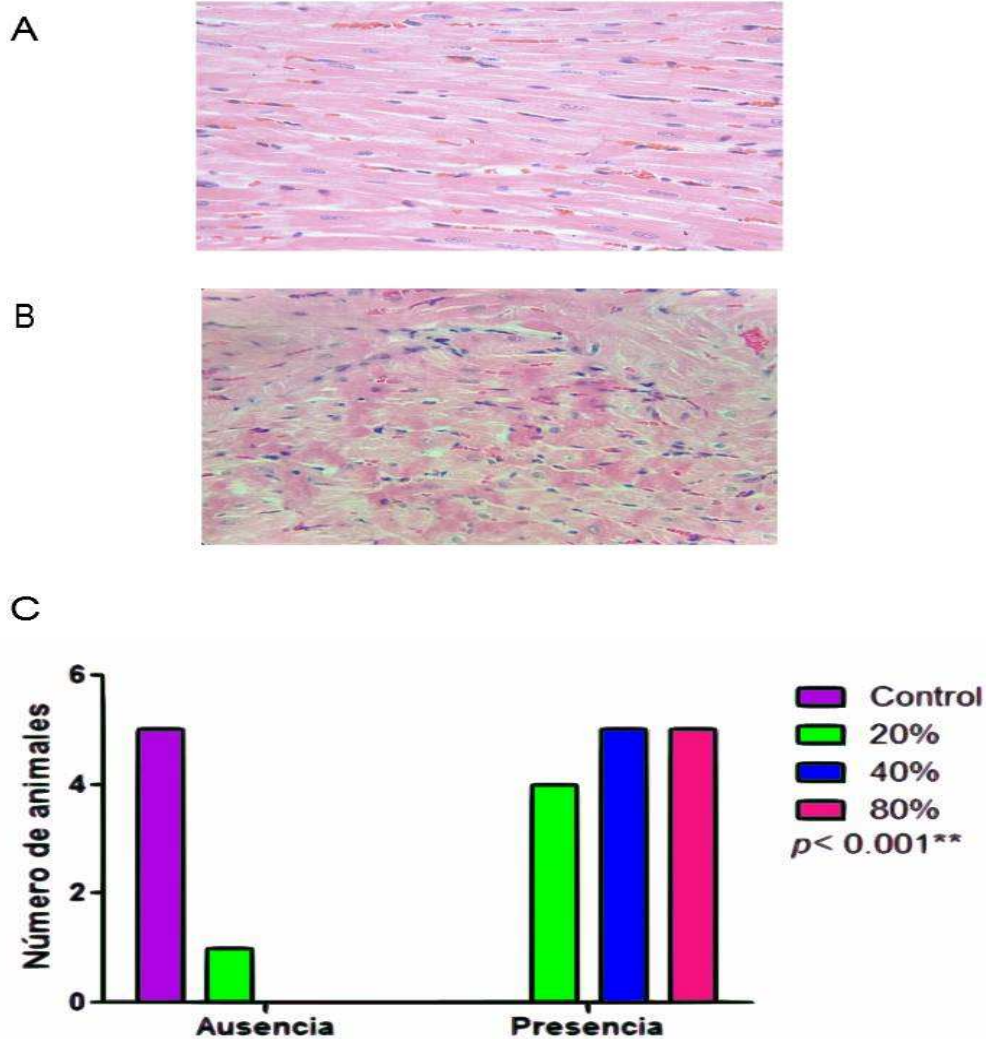


Figura 14: bandas de contracción. A, tejido normal de ratas control, B tejido con presencia de bandas de contracción, H-E 40X. C, Análisis estadístico de la presencia de bandas de contracción por la prueba de Chi-Cuadrado indicando la dependencia en el nivel de alteración según la dosis aplicada.

Las ratas control del grupo control no presentaron bandas de contracción, mientras que las ratas tratadas con veneno, si presentaron esta alteración, lo cual indica que el veneno produce necrosis con bandas de contracción.

10. DISCUSIÓN

El envenenamiento provocado por especies del género *Lachesis* presenta efectos fisiopatológicos, tanto locales como sistémicos, siendo locales los efectos necrolítico, y sistémico los efectos edemático, anticoagulante y hemorrágico. Este veneno también produce, de manera indirecta, calicreína y precalicreína (Factor de Fletcher), que provocan aumento del peristaltismo, y de manera directa producen bradiquininas, las cuales son responsables de la hipotensión, diarrea y bradicardia (Ayerbe & Latorre 2010; Granados-Zúñiga & Aragón-Ortíz 1998; Instituto Nacional de Salud and Ministerio de Salud y Protección Social 2014; Otero et al. 1992). Por este motivo, las fallas cardíacas demostradas en este trabajo por los biomodelos inyectados con veneno de *L. acrochorda* (Figura 10), son uno de los síntomas presentes en pacientes víctimas de accidente ofídico lachésico, lo que aumenta la probabilidad de muerte para los pacientes víctimas de este envenenamiento.

El veneno de *L. acrochorda* tiene diferentes proporciones de proteínas tales como: serina proteinasa (SP: 35.1%), péptidos de bradisinina potencial (VAP: 21.5%), metaloproteinasas de veneno de serpiente (SVMP PIII: 17.7%; SVMP PI: 5.5%), ácido L-amino oxidasa (LAO:9.6%), proteínas lectinas tipo C (CTL:6.9%), y, en menores proporciones, fosfolipasas A2 (PLA2:2.3), veneno de serpiente con factor de crecimiento endotelial vascular (svVEGF: 0.6%) y proteínas secretoras ricas en cisteína (CRISP:0.9) (Madrigal *et al.*, 2012), que son las responsables de la sintomatología como la bradicardia, el efecto coagulante, la hemorragia y el efecto necrosante producidos tras un envenenamiento lachésico.

En este estudio, uno de los parámetros analizados fue el electrocardiográfico, en el que se tomó como referencia la amplitud de las ondas P y T, la duración del intervalo Q-T y la frecuencia cardíaca. Con respecto a la onda P que representa la activación auricular, se presentó una elevación al inyectar los biomodelos con las subdosis de veneno. En la onda P, las aurículas se despolarizan desde la aurícula derecha hacia la izquierda, desde la pared posterior hasta la anterior y desde la parte superior hacia abajo (Vallejo, 2012), mostrando de esta manera cómo está funcionando el marcapaso natural, por tal motivo se midió la amplitud de esta onda,

la cual presentó una elevación estadísticamente significativa ($p < 0.001$) al comparar las amplitudes de dicha onda en los biomodelos control con los inyectados con veneno, lo que evidencia alteración cardíaca (figura 6) posiblemente un aumento en el tamaño de la aurícula izquierda del corazón, lo cual puede estar dando por la sobrecarga de trabajo del corazón para bombear sangre coagulada, edema pulmonar, embolismo o hipertensión pulmonar e infarto cardíaco.

Otro parámetro analizado fue la amplitud de la onda T, que representa la repolarización ventricular (Lopez, 2012). La amplitud de la onda T presenta rangos de valores normales en ratas Wistar entre 130-230 μv (Rodríguez *et al.*, 1997). Se observó una elevación estadísticamente significativa ($p < 0.001$) de la onda T en los biomodelos inyectados con las dosis de veneno establecidas, sin embargo, a las horas 2 y 3 post-veneno, la elevación de esta onda es mayor que a las horas 1 y 4 (figura 6). Una de las posibles causas de la elevación de la amplitud de la onda T es un trastorno electrolítico conocido como hipercalemia, que consiste en la elevación de los niveles de potasio en la sangre (Goldberger, 2006), que puede estar dada por la presencia de una posible insuficiencia renal. La elevación de la onda T, sugiere un posible infarto de miocardio o una isquemia, lo cual se confirmó con los análisis enzimáticos e histológicos.

En el análisis de la duración del intervalo QT que representa la post-despolarización cardíaca, también se observó aumento de la duración del intervalo QT al comparar la duración en los registro de los biomodelos controles con los que recibieron las subdosis de veneno. Esta alteración, puede deberse al bloqueo de los canales de potasio en el potencial de acción de las células, que conllevan a la prolongación de la fase de repolarización, que al actuar como efecto adverso se manifiesta por la prolongación del QT en el electrocardiograma (Salazar *et al.*, 2011) produciendo de esta manera la bradicardia (Figura 9).

Al analizar estadísticamente los datos de frecuencia cardíaca (figura 8), se encontró diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$) entre el grupo control y los tratamientos. La frecuencia cardíaca se observó más disminuida en los animales a

los que se les inyectó las dosis de veneno; este comportamiento de la frecuencia cardíaca es uno de los síntomas reportados para pacientes víctimas de accidente lachésico (Ayerbe and Latorre, 2010). De este modo, la bradicardia puede ser una respuesta de la cantidad de péptidos de bradicinina potencial (VAP) y a la serina proteinasa presentes en este veneno (Madrigal *et al.*, 2012).

El veneno de *L. acrochorda* contiene dos tipos de SVMP y, a pesar de compartir actividad catalítica similar, no todos los tipos de SVMPs inducen hemorragia en modelos *in vivo*, lo cual se evidencia en las SVMPs P-III que incluyen desintegrina y dominios ricos en cisteína, que actúan como formadoras de potentes toxinas hemorrágicas. mientras que las SVMPs P-I muestran una reducción de la actividad hemorrágica (Baldo *et al.*, 2010), haciendo que estas funcionen como enzimas procoagulantes (Bernardoni *et al.*, 2014). La actividad procoagulante de este veneno fue evidente en este trabajo, a pesar de que otros estudios sugieren que el veneno de las serpientes del género *Lachesis*, tras una mordedura, produce coagulopatías graves que son alteraciones en la coagulación de la sangre y hemorragias (Jorge MT *et al.*, 1997; Madrigal *et al.*, 2012).

Adicionalmente en este estudio no se observó que el veneno de *L. acrochorda* sea hemorrágico y anticoagulante, ya que en los biomodelos inyectados con mayores subdosis de veneno, presentaron más coagulación sanguínea, sugiriendo de esta manera que el veneno de esta especie de serpiente no es hemorrágico, insinúa que las metaloproteinasas son enzimas responsables de una actividad procoagulante (Bernardoni *et al.*, 2014). De este modo, los altos niveles de serina proteasas presentes en este veneno (Madrigal *et al.*, 2012) están favoreciendo la formación de coágulos.

Por otro lado, otro parámetro analizado en este estudio fue los niveles de las isoenzimas CK-MB, que los resultados tuvieron diferencias estadísticamente significativas entre los valores de CK-MB del grupo control y las dosis de veneno de aplicadas ($p > 0.05$), siendo a las 1 y 4 horas, los tiempo en los que observó mayor elevación de la isoenzima CK-MB, causada por el veneno de *L. acrochorda* (figura

10), indicando de esta manera alteraciones en la función cardiaca como los es el infarto de miocardio (Santaló et al., 2014), causadas por este veneno, Y así se pudo ratificar en los resultados de los registros ECG (figuras 6, 7, 8) y en los análisis histopatológicos (figura 11, 12, 13, 14) obtenidos en este estudio.

El otro parámetro analizado en este estudio fue el histopatológico, donde se encontraron diversas alteraciones que conllevan a concluir las alteraciones encontradas en los otros dos parámetros estudiados. En cuanto a la hemorragia presente en algunos tejidos (Figura 11), a pesar de que esta no es estadísticamente significativa, puede deberse a un efecto de las SVMPs, que fisiológicamente tiene efectos hemorrágicos (Baldo *et al.*, 2010) y que están presentes en el veneno de esta serpiente (Madrigal *et al.*, 2012), aunque otros reportes también han mencionado que el veneno de *L. acrochorda* tiene un efecto hemorrágico y coagulante (Castaño and Cañas, 2016).

Otra alteración encontrada en el estudio histopatológico, fue el edema se refiere a la presencia de un exceso de líquido en los tejidos corporales, en este caso del tejido cardiaco. En la mayoría de los casos aparece sobre todo en el compartimiento del líquido extracelular, pero puede afectar también al líquido intracelular (Hall, 2011). En los resultados obtenidos en este estudio, se presentó edema en todos los tejidos cardiacos de las ratas que fueron sometidas a tratamiento con subdosis de veneno de *L. acrochorda*, un ejemplo claro fue en la dosis del 80%, en la que los edemas se encontraron en mayor cantidad y diámetro, en comparación con los del tejido de las ratas inoculadas con el 40% del veneno, que presentaron esta alteración en algunas regiones del tejido más que en otras, y en la dosis del 20% que fueron pocos los edemas encontrados, aunque estos tendieron a aumentar con el paso del tiempo (Figura 12), también se encontraron edemas perivasculares, lo cual sugiere que el veneno afecta la composición vascular de los tejidos y la circulación sanguínea, siendo esta afección dosis dependiente.

El mecanismo que podría explicar la formación del edema en el tejido cardiaco está relacionado con el proceso inicial de la inflamación, la vasodilatación de las arteriolas y el aumento del flujo sanguíneo, que aumentan la presión hidrostática intravascular,

dando lugar al paso de líquido de los capilares a los tejidos. Este líquido denominado trasudado, es esencialmente un ultrafiltrado de plasma sanguíneo y contiene pocas proteínas. Sin embargo, la trasudación se ve pronto eclipsada por un aumento de la permeabilidad vascular que permite el paso de líquido rico en proteínas e incluso en células (denominado exudado) al intersticio, reduciendo la presión osmótica intravascular y aumentando la presión osmótica del líquido intersticial. El resultado neto es una salida de agua e iones a los tejidos extravasculares, la acumulación de líquido en estos espacios recibe el nombre de edema (Kumar et al., 2008), lo cual puede estar relacionado con un posible trastorno electrolítico producido por el veneno de *L. acrochorda*.

También se encontraron alteraciones, tales como edema (Figura 12), cardiocitólisis (Figura 13) y necrosis con bandas de contracción (Figura 14), las cuales mostraron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.001$), entre el grupo control y los grupos tratados con veneno, lo cual sugiere que el envenenamiento por *L. acrochorda* está afectando el músculo cardíaco directamente.

Otras de las posibles causas de los efectos producidos por este veneno puede ser que el veneno con el que se realizó este estudio, por ser colectado de especímenes *L. acrochorda* que habitan únicamente en el departamento del Cauca, tenga una composición diferente, lo que nos llevaría a pensar que ocurre lo mismo que con la especie *Bothrops asper*, en la cual la composición del veneno varía de acuerdo a la distribución geográfica de los organismos (Mora-Obando et al., 2014).

11. CONCLUSIONES

El veneno total de la serpiente *L. acrochorda* causó las siguientes manifestaciones cardiotóxicas:

- ❖ Aumento en la amplitud de las ondas P y T, y aumento en la duración del intervalo QT, sugiriendo así, posibles efectos relacionados con isquemia o infarto agudo de miocardio, embolismo, edema o hipertensión pulmonar y alteración en la conducción eléctrica y electrolítica del corazón.
- ❖ Produjo un efecto cronotrópico negativo sobre el corazón de las ratas tratadas con veneno de *L. acrochorda*, que contribuyó a la disminución en la frecuencia cardíaca, ocasionada posiblemente por la estimulación del sistema nervioso parasimpático.
- ❖ El veneno de *L. acrochorda* Causó elevación en los niveles de la enzima CK y de su fracción CK-MB, por posible daño de los miocitos cardíacos y la necrosis del tejido cardíaco evidenciando infarto de miocardio.
- ❖ Causó daño en el tejido cardíaco, ocasionando la presencia edema interfibrilar, hemorragia interfibrilar, cardiocitólisis, y bandas de contracción.
- ❖ A mayor tiempo transcurrido post veneno, se presentaron mayores efectos y alteraciones en el tejido cardíaco.

12. RECOMENDACIONES

- Realizar estudios de coagulación de este veneno, profundizar en la evaluación de su efecto procoagulante.
- Realizar estudios de los niveles en sangre de los iones K^{+1} , Na^{+1} , Ca^{+2} para conocer como el veneno afecta sus concentraciones, debido a las alteraciones que causa en los canales de los mismos.
- Tener en cuenta, los niveles de troponina I, Mioglobina y las subformas de la isoenzima CK-MB, para la realización de próximos estudios cardiotóxicos, ya que son importantes marcadores de daño cardiaco y servirían para confirmar la presencia de infarto y necrosis miocárdica.
- Investigar los posibles efectos producidos por el veneno de esta especie en los diferentes órganos del cuerpo.
- Purificar el veneno total de *L. acrochorda*, las moléculas causantes de daño cardiaco y estudiar su efecto en los canales iónicos de membrana de las células cardiacas.
- Este estudio podría ser complementado con métodos alternativos como la ecocardiografía que permite analizar los daños en el corazón desde otro ángulo, contribuyendo a un mayor conocimiento de las patologías cardiacas.
- Este estudio se convierte en un punto de partida para la realización de nuevas investigaciones sobre esta y otras especies venenosas con el fin de conocer el potencial biotecnológico, farmacológico y toxicológico que tienen estas especies y de esa forma contribuir a la prevención y manejo de los accidentes ofídicos.

13. BIBLIOGRAFÍA

- Ayerbe, S., Latorre, J., 2010. MANUAL PARA LA PREVENCIÓN Y MEJORAMIENTO EN LA ATENCIÓN DEL PACIENTE CON ACCIDENTE OFÍDICO.
- Badillo, R., Casas, M., Gamarra, G., 1989. Ofidiotoxicosis en el hospital universitario Ramón González Valencia de Bucaramanga. *Acta Méd Colomb* 14, 352–368.
- Baldo, C., Jamora, C., Yamanouye, N., Zorn, T.M., Moura-da-Silva, A.M., 2010. Mechanisms of Vascular Damage by Hemorrhagic Snake Venom Metalloproteinases: Tissue Distribution and In Situ Hydrolysis. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 4, e727.
- Beltrán, J., Ayerbe, S., Arenas, C., Coral, R., Hurtado, F., Morales, H., Sarmiento, B., Torres, M., Tobar, J., 2011. EVALUACION DEL EFECTO CARDIOTOXICO DEL VENENO DE LA SERPIENTE *Crotalus durissus cumanensis*, EN RATAS *Rattus norvegicus*.
- Bernardoni, J.L., Sousa, L.F., Wermelinger, L.S., Lopes, A.S., Prezoto, B.C., Serrano, S.M.T., Zingali, R.B., Moura-da-Silva, A.M., 2014. Functional Variability of Snake Venom Metalloproteinases: Adaptive Advantages in Targeting Different Prey and Implications for Human Envenomation. *PLoS One* 9, e109651.
- Bolaños, carolina, 2013. DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD CARDIOTÓXICA DEL VENENO DEL ESCORPIÓN *Tityus sp*, EN RATAS WISTAR *Rattus norvegicus* 91.
- Cardoso, J.L.C., FRANÇA, F.O.S., WEN, F.H., MÁLAQUE, C.M.S., HADDAD Jr., V., 2003. Animais peçonhentos no Brasil: biologia, clínica e terapêutica dos acidentes. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo* 45, S87. doi:10.1590/S0036-46652003000600009
- Castaño, R., Cañas, C., 2016. Vanenos, in: Cañas, C., Castro, F., Castaño, R. (Eds.), *Serpientes Venenosas: Lecciones Aprendidas Desde Colombia*. pp. 108–124.
- Castrillón-Estrada, D.F., Acosta Vélez, J.G., Hernández-Ruiz, E.A., Palacio, L.M.A., 2007. Envenenamiento ofídico. *Salud Uninorte*.
- Congreso de Colombia, 2011. Ley 1438 de enero 19 de 2011. pp. 1–53.
- Cortés, G., 2007. Síndromes coronarios agudos: utilidad de los biomarcadores séricos 77, 235–239.
- de Oliveira Pardal, P.P., Souza, S.M., da Costa Monteiro, M.R.D.C., Fan, H.W., Cardoso, J.L.C., França, F.O.S., Tomy, S.C., Sano-Martins, I.S., de Sousa-e-Silva, M.C.C., Colombini, M., Kodera, N.F., Moura-da-Silva, A.M., Cardoso, D.F., Velarde, D.T., Kamiguti, A.S., Theakston, R.D.G., Warrell, D. a., 2004. Clinical trial of two antivenoms for the treatment of Bothrops and Lachesis bites in the

- north eastern Amazon region of Brazil. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 98, 28–42.
- Gimeno, L., Gimeno, L.O., Cejalvo, D., Calvo, M.A., Bolani, B., Lloris, J.M., 1990. Anestesia en el Animal de Laboratorio. Parte 2. *Res. Surg.* 36–44.
- Goldberger, A., 2006. A Simplified Approach, in: *Clinical Electrocardiography*. 7a Ed. Philadelphia: Mosby Elsevier.
- Granados-Zúñiga, J., Aragón-Ortiz, F., 1998. [Cardiovascular alterations induced by the venom of *Lachesis muta* (serpentes: Viperidae) and its fibrinogenolytic enzyme]. *Rev. Biol. Trop.* 46, 1149–57.
- Gutierrez, J.M., Leon, G., Rojas, G., Lomonte, B., Ruvacado, A., Chaves, F., 1998. NEUTRALIZATION OF LOCAL TISSUE DAMAGE INDUCED BY BOTHROPS ASPER (TERCIOPELO) SNAKE VENOM. *Toxicon* 36, 1529±1538.
- Gutiérrez, J.M., Williams, D., Fan, H.W., Warrell, D.A., 2010. Snakebite envenoming from a global perspective: Towards an integrated approach. *Toxicon*. doi:10.1016/j.toxicon.2009.11.020
- Hernández, M., Finol, H., López, J., Fernández, I., Scannone, H., Rodríguez-Acosta, A., 2005. No TitleCumanensis), ALTERACIONES ULTRAESTRUCTURALES DE TEJIDO CARDÍACO TRATADO CON VENENO CRUDO DE SERPIENTE DE CASCABEL (*Crotalus durissus*. *Rev. la Fac. Med.* 28.
- Incio Ruiz, R., Incio Ruiz, L., Martinez-vargas, A., Salas, M., Gutierrez, jose M., 1993. Toxicidad y neutralización de venenos ofídicos peruanos de los géneros *Bothrops* y *Lachesis* (Serpentes: Viperidae). *Rev. Biol Trop.* 41, 351–357.
- Instituto Nacional de Salud, I., Ministerio de Salud y Protección Social, 2014. Protocolo de vigilancia en Salud Pública. Tuberculosis.
- Jorge MT, S. Sano-Martins, I., C. Tomy, S., C.B. Castro, S., A. Ferrari, R., Adriano Ribeiro, L., A. Warrell, D., 1997. Snakebite by the bushmaster (*Lachesis muta*) in Brazil: Case report and review of the literature. *Toxicon* 35, 545–554. doi:10.1016/S0041-0101(96)00142-0
- Lopez, J.H., 2012. introducción, in: *La Alegría de Leer El Electrocardiograma*. Editorial Medica CELSUS, p. 194.
- Lynch, J.D., 2012. EL CONTEXTO DE LAS SERPIENTES DE COLOMBIA CON UN ANÁLISIS DE LAS AMENAZAS EN CONTRA DE SU CONSERVACIÓN. *Rev. Colomb. Cienc* 36, 435–449.
- Madrigal, M., Sanz, L., Flores-Díaz, M., Sasa, M., Núñez, V., Alape-Girón, A., Calvete, J.J., 2012. Snake venomomics across genus *Lachesis*. Ontogenetic changes in the venom composition of *Lachesis stenophrys* and comparative proteomics of the venoms of adult *Lachesis melanocephala* and *Lachesis acrochorda*. *J. Proteomics* 77, 280–97.

Magdaleno, F., 2014. Electrocardiograma.

Mora-Obando, D., Guerrero-Vargas, J.A., Prieto-Sánchez, R., Beltrán, J., Rucavado, A., Sasa, M., Gutiérrez, J.M., Ayerbe, S., Lomonte, B., 2014. Proteomic and functional profiling of the venom of *Bothrops ayerbeii* from Cauca, Colombia, reveals striking interspecific variation with *Bothrops asper* venom. *J. Proteomics* 96, 159–172. doi:10.1016/j.jprot.2013.11.005

Noriega-Alvarado, J., Colmenarez, D., Mogollón, A., Márquez, N., Hernández, V., Pérez, M., 2009. Cambios séricos en las enzimas ALT, AST, FA, CK-TOTAL y LDH inducidos por veneno de *Crotalus durissus cumanensis* en ratones Balb/C. *Rev. Cient. la Fac. Ciencias Vet. la Univ. del Zulia* 19, 408–413.

Núñez Rangel, V., Fernández Culma, M., Rey-Suárez, P., Pereañez, J., 2012. Development of a sensitive enzyme immunoassay (ELISA) for specific identification of *Lachesis acrochorda* venom. *J. Venom. Anim. Toxins Incl. Trop. Dis.* 18, 173–179.

Otero, R., Tobón, G., Gómez, L., Osorio, R., Valderrama, R., Hoyos, D., Urreta, J., Molina, S., Arboleda, J., 1992. Accidente ofídico en Antioquia y Chocó. Aspectos clínicos y epidemiológicos (marzo de 1989 - febrero de 1990). *Acta Médica Colomb.* 17, 21.

Paredes, E., 2012. 1. informe del evento accidente ofídico final año 2012.

Perez, A., 2012. Manual Ofídico [WWW Document]. 6 agosto 2012. URL <http://manual-ofidico.blogspot.com/2012/08/origen-y-generalidades-de-las-serpientes.html>

Pinto, M., Melo, M., Cruz, M., Vercosa, J.D., Melo, M., 2010. Cardiorespiratory evaluation of juvenile rats experimentally envenomed with *Tityus serrulatus* venom. *J. Venom. Anim. Toxins Incl. Trop. Dis.* 16, 253–267.

Pla, D., Sanz, L., Molina-Sánchez, P., Zorita, V., Madrigal, M., Flores-Díaz, M., Alape-Girón, A., Núñez, V., Andrés, V., Gutiérrez, J.M., Calvete, J.J., 2013. Snake venomomics of *Lachesis muta rhombeata* and genus-wide antivenomics assessment of the paraspecific immunoreactivity of two antivenoms evidence the high compositional and immunological conservation across *Lachesis*. *J. Proteomics* 89, 112–23.

Rodríguez, M., Tamames, P., Sariego, I.G.P., 1997. Caracterización electrocardiográfica de las ratas wistar. Normalización técnica en la facultad de ciencias médicas de Granma. *Multimed.*

Salazar, L., Palacio, A.C., Rodríguez, J.R., 2011. Mecanismos de cardiotoxicidad: antineoplásicos, anti-inflamatorios no esteroideos, antipsicóticos, cocaetileno y simpaticomiméticos. *Rev. Colomb. Cardiol.* 8, 11.

Santaló, M., Guindo, J., Llanos, O., 2014. Marcadores biológicos de necrosis miocárdica 56, 703–720.

Sifuentes, D.N., El-Kik, C.Z., Ricardo, H.D., Tomaz, M.A., Strauch, M.A., Calil-Elias, S., Arruda, E.Z., Schwartz, E.F., Melo, P.A., 2008. Ability of suramin to antagonize the cardiotoxic and some enzymatic activities of Bothrops jararacussu venom. *Toxicon* 51, 28–36.

Silva J., 1980. Accidentes humanos por las serpientes de los géneros Bothrops y Lachesis. *Mem Inst Butantan* 44/45, 403–423.

Walteros, D., Paredes, A., 2014. Vigilancia y Analisis del Riesgo en Salud Pública Protocolo de Vigilancia en Salud Pública ACCIDENTE OFIDICO 1–29.