

**IDENTIFICACIÓN DE LA HEPATOTOXICIDAD INDUCIDA POR EL VENENO DE
LA SERPIENTE DE CASCABEL *Crotalus durissus cumanensis* (SERPENTES:
VIPERIDAE) DE LA CUENCA DEL RÍO MAGDALENA EN EL DEPARTAMENTO
DE HUILA (COLOMBIA)**



ANDRÉS FELIPE OLAYA CASTAÑEDA

**UNIVERSIDAD DEL CAUCA
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES, EXACTAS Y DE LA EDUCACIÓN
PROGRAMA DE BIOLOGÍA
POPAYÁN
2017**

**IDENTIFICACIÓN DE LA HEPATOTOXICIDAD INDUCIDA POR EL VENENO DE
LA SERPIENTE DE CASCABEL *Crotalus durissus cumanensis* (SERPENTES:
VIPERIDAE) DE LA CUENCA DEL RÍO MAGDALENA EN EL DEPARTAMENTO
DE HUILA (COLOMBIA)**

Trabajo de grado para optar por el título de biólogo

ANDRÉS FELIPE OLAYA CASTAÑEDA

DIRECTOR

JIMMY ALEXANDER GUERRERO VARGAS, PhD.

ASESORES

CAROLINA SALGUERO BERMÚDEZ, PhD.

HAROLD JOFRE BOLAÑOS BRAVO, Medico Patólogo.

KAREN LEONOR ÁNGEL CAMILO, BSc.

UNIVERSIDAD DEL CAUCA

FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES, EXACTAS Y DE LA EDUCACIÓN

PROGRAMA DE BIOLOGÍA

POPAYÁN

2017

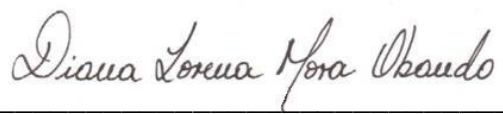
Nota de aceptación

Director _____

JIMMY ALEXANDER GUERRERO, PhD.

Jurado _____

MAYRA ALEJANDRA VELASCO, MSc

Jurado  _____

DIANA LORENA MORA, cPhD

Fecha y lugar de sustentación: Popayán, 07 de Noviembre de 2.017

A mi abuelo, Israel Antonio Castañeda

A mi madre, Olga Lucia Castañeda Vásquez

A mi padre, Francisco Luis Álvarez Velasco

A mi hermana, Isabel Sofía Álvarez Castañeda

AGRADECIMIENTOS

- 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 Grupo de Investigaciones Herpetológicas y Toxinológicas (GIHT) de la Universidad del Cauca por contribuir en mi formación como investigador.
- Al Centro de Investigaciones Biomédicas de la Universidad del Cauca (CIBUC), y a su personal por contribuir a mi formación y permitirme el uso de las instalaciones y equipos.
- Al Laboratorio LinaLab, por permitirnos el acceso a sus instalaciones y compartir con nosotros su conocimiento.
- Al Laboratorio de Patología de la Universidad del Cauca por permitirme el uso de las instalaciones y equipos para hacer el montaje histopatológico.
- Al Laboratorio de Biología de la Universidad del Cauca por permitirme la toma de fotos para hacer el análisis histopatológico.
- A los donantes a través de la plataforma GoFundMe, Julio Pérez, Catherine Callo, Martha Gil, Luz Marina Bedoya y Carolina Salguero por apoyar económicamente esta investigación.
- A mi director Jimmy Alexander Guerrero Vargas, por sus grandes aportes, colaboración y consejos que hicieron posible la realización de esta investigación.
- A mi asesora Karen Leonor Ángel Camilo, por todo lo enseñado, su apoyo incondicional, su paciencia, su tiempo dedicado y los consejos brindados.
- A mi asesora Carolina Salguero Bermúdez, por sus enseñanzas, su apoyo incondicional y la confianza que depositó en mí.
- A mi asesor, Harold Bolaños Bravo, por compartirme parte de su conocimiento y ayudarme con la lectura de las placas histológicas.

- A Diana Lorena Mora Obando y Mayra Alejandra Velasco Reyes, mis evaluadoras por sus enseñanzas, consejos, comentarios y constante apoyo a lo largo de la culminación de este proyecto.
- A mi madre Olga Castañeda, mi padre Francisco Álvarez y a mi hermana Isabel Sofía Álvarez Castañeda por todo el apoyo que me han brindado a lo largo de la carrera.
- Al Doctor Santiago Ayerbe, fundador del Grupo GIHT de la Universidad del Cauca por sus aportes a esta investigación.
- A la Doctora Sirsa Aleyda Hidalgo del Bioterio Universidad del Valle por sus aportes en el manejo de los roedores y la confianza depositada en el equipo de trabajo.
- A la familia Peñuela Castañeda por su colaboración.
- A la familia Vargas por darnos acceso a la hacienda “Las Mercedes” donde se realizó la colecta
- A Jaime Ramírez Mosquera por su ayuda en la colecta de campo.
- Al biólogo Andrés Felipe Lievano por su apoyo en la construcción del mapa
- A Yulieth Cristina Bermúdez por su gran apoyo a lo largo de la carrera, por sus consejos y el conocimiento compartido
- A mis compañeras y amigas Angie Marcela Rengifo, Mary Luz Bueno, Daniela Carvajal, Yulisa Moreno y Valentina Muñoz, y a mi amigo Carlos Gallego, por su amistad incondicional, compañía, consejos y colaboración.
- A mis compañeros, por su apoyo y compañía durante la carrera.
- A la doctora Cielo Pérez Solano, Vicerrectora Administrativa de la Universidad del Cauca por el apoyo para asistir al XI congreso de herpetología, donde se presentaron resultados de este Trabajo de Grado.
- Al doctor David Salazar Valenzuela, Ohio State University, por su apoyo en la estadía durante el XI congreso de herpetología.

Tabla de Contenido

RESUMEN	11
1. INTRODUCCIÓN.....	12
2. JUSTIFICACIÓN.....	13
3. MARCO TEÓRICO	14
3.1. Generalidades de las serpientes.....	14
3.2. Familia Viperidae.....	15
3.3. <i>Crotalus durissus cumanensis</i>	15
3.4. Taxonomía y distribución geográfica de <i>C. d. cumanensis</i>	16
3.5. Veneno de la serpiente <i>C. d. cumanensis</i>	17
3.6. Accidente Ofídico Crotálico	19
3.7. Hígado.....	20
3.7.1. Acino hepático	20
3.7.2. Hepatocito.....	21
3.7.3. Células de Kupffer	21
3.8. Hepatotoxicidad.....	22
3.9. Alanina aminotrasferasa (ALT).....	23
3.10. Aspartato aminotransferasa (AST).....	23
3.11. Relación o cociente AST/ALT	24
4. ANTECEDENTES.....	24
5. OBJETIVOS.....	28
5.1. Objetivo General	28
5.2. Objetivos Específicos	28
6. MATERIALES Y MÉTODOS.....	29

6.1. Colecta de especímenes	29
6.2. Obtención del veneno	29
6.3. Análisis enzimático en suero sanguíneo	29
6.4. Histopatología	30
6.5. Diseño Experimental	30
7. RESULTADOS	32
7.1. Análisis enzimático en suero sanguíneo	32
7.1.1. Alanina aminotrasferasa (ALT)	32
7.1.2. Aspartato aminotrasferasa (AST)	33
7.1.3. Relación o cociente AST/ALT	34
7.2. ANÁLISIS HISTOPATOLÓGICO.....	34
7.2.1. Vacuolización.....	35
7.2.2. Infiltrado Inflamatorio	36
8. DISCUSIÓN.....	37
9. CONCLUSIONES.....	42
10. RECOMENDACIONES	42
11. BIBLIOGRAFÍA.....	43

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Descripción general de los componentes más frecuentes del veneno de las serpientes del género <i>Crotalus</i>	18
Tabla 2. Distribución de las pruebas estadística según los parámetros evaluados.....	31

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Distribución geográfica de <i>C. d. cumanensis</i> en Colombia	17
Figura 2. Tejido normal de hígado de ratas observado con microscopio óptico ..	22
Figura 3. Contraste por ANOVA de una vía de los valores de concentración en suero sanguíneo de la enzima ALT.....	32
Figura 4. Contraste por ANOVA de una vía de los valores de concentración en suero sanguíneo de la enzima AST.....	33
Figura 5. Proceso de Vacuolización.....	35
Figura 6. Infiltrados Inflamatorios.....	36

RESUMEN

El ofidismo es un problema de salud pública en Colombia. De acuerdo con los informes estadísticos emitidos por el Sistema de Vigilancia de Salud Pública en el país, en el año 2016 se reportaron 4636 casos, de los cuales entre el 2 a 3% de los registros correspondieron a *Crotalus durissus cumanensis*. Aunque representa un porcentaje relativamente bajo, el envenenamiento crotálico ocasiona efectos sistémicos letales tales como la neurotoxicidad, miotoxicidad y en ocasiones perturbaciones en la coagulación. En nuestro país son escasos los estudios relacionados con este tipo de accidente ofídico y sus complicaciones, entre las cuales se ha descrito la hepatotoxicidad. Por lo anterior, el objetivo de este trabajo fue determinar el daño hepático inducido por el veneno de la cascabel colombiana; para esto se identificaron las alteraciones histopatológicas y en la actividad enzimática sobre ratas Wistar macho (n=28) con un peso de 200 ± 30 g. Se implementó un diseño experimental completamente aleatorizado con 3 grupos, a los cuales se les aplicaron, por vía intraperitoneal, dosis subletales del veneno (80%, 40% y 20% de la DL_{50}); como grupo control se inyectaron animales con solución salina al 0,9% y el efecto fue evaluado luego de 8 horas de exposición. Los resultados muestran un incremento significativo en los valores de aspartato aminotransferasa (AST) ($p < 0,05$) en el grupo expuesto a la dosis del 80%. Por otro lado, no se reportaron alteraciones significativas en los valores de alanina aminotransferasa (ALT) ($p > 0,05$). Asimismo, no se observó diferencia significativa en los procesos de degeneración hidrópica e infiltrados inflamatorios observados. Lo anterior sugiere que el envenenamiento inducido por la serpiente objeto de estudio en esta investigación se caracteriza por un efecto miotóxico, asociado al efecto de la crotamina, crotoxina y fosfolipasas A2 (PLA2), responsables de los efectos miotóxico y los daños estructurales a las membranas celulares, lo que permite la liberación de AST desde el citoplasma de los miocitos al torrente sanguíneo. Por otro lado, no se observan daños a nivel hepático porque no existe daño en las membranas de los hepatocitos tal como lo demuestra la ausencia de ALT en sangre. En conclusión, el veneno de *C. d. cumanensis* distribuida en el

Valle Seco del Río Magdalena en Colombia, no produce daños aparentes a nivel hepático en ratas, pero si genera daño miotóxico severo, resultados que contrastan con los envenenamientos ocasionados por otras poblaciones de *C. durissus* en Suramérica.

1. INTRODUCCIÓN

La Organización Mundial de la Salud (OMS) estima que a nivel global son reportados cinco millones de casos de accidente ofídico (enfermedad producida por la mordedura de serpientes) la cual puede ocasionar graves secuelas y lesiones de salud con consecuencias psicológicas asociadas (OMS, 2013), siendo así, una enfermedad muy frecuente y de sumo interés médico, considerada en Colombia como un problema de salud pública, a pesar de la obligatoriedad del reporte del ofidismo en el país, existen muchos más casos que no son registrados (Otero-Patiño, 2011), estos pueden ser sub-estimados, debido a que en muchas ocasiones, los accidentes ofídicos ocurren en zonas rurales donde las personas mueren sin haber podido llegar a un centro de salud. En el mejor de los escenarios, las personas recurren a remedios caseros y por tanto, no se reportan en el ente responsable de realizar los análisis estadísticos, como es el Sistema Nacional de Vigilancia en Salud Pública (SIVIGILA) de Colombia.

En el 2016 el SIVIGILA reportó 4636 casos de ofidismo donde el 2 al 3% de los mismos fue ocasionado por la serpiente de cascabel (INS, 2016). En nuestro país se encuentra la subespecie *C. d. cumanensis*, la cual se distribuye en la costa Caribe desde el departamento de Córdoba hasta el extremo este de Venezuela, también se encuentra a lo largo del valle interandino del río Magdalena, en el Altiplano Cundiboyacense, los Llanos Orientales, Guaviare y Guainía. Esta especie se encuentra asociada a zonas de bosque seco o semiseco tropical y sus relictos o ecosistemas derivados (Campbell et al., 2004).

El envenenamiento ocasionado por la serpiente de cascabel es un evento de suma importancia médica debido al mecanismo de acción del veneno, el cual se

clasifica como neurotóxico, miotóxico y rara vez genera disturbios en los procesos de coagulación (Instituto Nacional de Salud INS, 2009). Se caracteriza por presentar manifestaciones locales como dolor y edema. Entre las manifestaciones sistémicas están: parálisis de pares craneales, visión borrosa, mialgias, parálisis periférica progresiva hasta llegar a paro respiratorio y falla renal (Barraviera, 1999). Asimismo, genera elevación en los niveles de creatina fosfoquinasa (CPK), lactato deshidrogenasa (LDH), aspartato aminotransferasa (AST), potasio sérico $[K^+]$ y descenso de los niveles de calcio sérico $[Ca^{++}]$ (Ayerbe, 2009). Adicionalmente, a estos efectos tóxicos, en Brasil se han realizado investigaciones que demuestran que el envenenamiento por *Crotalus durissus terrificus* induce daño hepático en seres humanos (Azevedo-Marques et al., 1987, 1985). En Colombia, existen escasos estudios relacionados con el compromiso de la función hepática o hepatotoxicidad producida por el envenenamiento crotálico (Ayerbe, 2009).

En Colombia existen escasos estudios relacionados con el accidente ofídico crotálico y las lesiones de salud que produce esta enfermedad tropical, como es la hepatotoxicidad. Por lo anterior, esta investigación caracterizó el daño hepático inducido por el veneno de *C. d. cumanensis* de la cuenca del río Magdalena - departamento de Huila (Colombia). Este estudio se realizó en ratas *Rattus norvegicus* cepa Wistar, mediante la evaluación de las alteraciones enzimáticas en suero sanguíneo e histopatológicas en el hígado que genera el veneno de *C. d. cumanensis*, con el propósito de proporcionar nuevas estrategias, herramientas y alternativas en pro de ayudar a mejorar los protocolos médicos del ofidismo crotálico y sus problemáticas asociadas en el sur-occidente colombiano.

2. JUSTIFICACIÓN

El Ofidismo es una enfermedad tropical muy frecuente, por lo que se constituye en un importante problema de salud pública en Colombia y de alto interés médico, especialmente en áreas rurales. En gran parte del territorio colombiano el

accidente ofídico no cuenta con la documentación correcta, manejo y tratamiento médico, resultado de las escasas campañas de capacitación desde los entes gubernamentales hacia los diferentes integrantes del área de la salud y la comunidad en general.

En el caso de un accidente ofídico crotálico, además de los efectos neurotóxico y miotóxico, se puede presentar hepatotoxicidad por tres vías: incidencia directa por el envenenamiento, daño hepático por estrés celular y por exceso de medicamentos al tratar el ofidismo. Además, este efecto puede provocar en el paciente necrosis celular, hepatitis, lesiones vasculares, entre otros (Jaeschke et al., 2002). Lo anterior refleja la importancia de caracterizar el daño hepático inducido por el envenenamiento de *C. d. cumanensis* de la cuenca del río Magdalena - departamento de Huila (Colombia), permitiendo aportar nuevo conocimiento en el campo de la salud y la biomedicina, y brindar mejores herramientas y estrategias que minimicen los efectos adversos ocasionados por el envenenamiento crotálico.

3. MARCO TEÓRICO

3.1. Generalidades de las serpientes

Las serpientes son reptiles que se caracterizan por poseer un cuerpo alargado y carecer de extremidades. Su movimiento se debe a ondulaciones que realizan con su cuerpo por medio de contracciones musculares que les permiten avanzar con el cuerpo extendido (Ayerbe González and Latorre Ledezma, 2010). Los ojos se encuentran debajo de una escama, generalmente transparente. La lengua puede ser considerada parte de su sistema olfativo, con la cual percibe las moléculas odoríferas en el ambiente, posteriormente dirige estas moléculas al órgano de Jacobson para ser interpretadas y ayudar a formar una imagen más completa y compleja de lo que se encuentra a su alrededor (Lillywhite, 2014).

A nivel taxonómico se han descrito 3571 especies de serpientes a nivel mundial (Uetz et al., 2016), registrándose en Colombia más de 270 especies agrupadas en diez familias, siendo dos de interés toxinológico: Elapidae y Viperidae (Lynch, 2012; Otero-Patiño, 2011; Zambrano et al., 2014).

3.2. Familia Viperidae

Las serpientes de la familia Viperidae son venenosas y peligrosas, generalmente presentan pupilas verticales, cabeza en forma triangular o punta de lanza, fosetas termorreceptoras y dentición solenoglifa, es decir, poseen colmillos retráctiles localizados en la parte delantera de la mandíbula conectados directamente con la glándula de veneno. Esta última característica le confiere al veneno la facultad de pasar a través del colmillo gracias a un canal interno y finalmente salir por una apertura en la parte distal (Campbell et al., 2004). 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 González and Latorre Ledezma, 2010).

3.3. *Crotalus durissus cumanensis*

La serpiente de cascabel *C. durissus* se caracteriza por llegar a medir hasta 180 cm de largo, presenta patrones de coloración variables, generalmente café oscuro, gris-café, café rojizo, entre otros. De igual forma, se suelen observar patrones en forma de rombos o diamantes, encontrándose entre 18 y 32 rombos en el dorso del cuerpo. En cuanto a patrones de escamación, se caracteriza por tener de 2 a 5 intersupraoculares, específicamente en *C. d. cumanensis* se presentan 3. Presenta de 11 a 18 supralabiales, entre 12 y 20 infralabiales, de 155 a 179 ventrales en machos y entre 163 y 190 en hembras, y de 25 a 32 subcaudales en machos y de 18 a 26 en hembras. Por otro lado, tiene la cabeza pequeña, en forma triangular, los ojos con pupila elíptica vertical, cola corta gruesa y terminada en anillos córneos (cascabel) siendo esta última característica la que confiere el nombre común a esta especie (Campbell et al., 2004).

3.4. Taxonomía y distribución geográfica de *C. d. cumanensis*

Reino:	Animalia
Filo:	Chordata
Subfilo:	Vertebrata
Clase:	Sauropsida
Orden:	Squamata
Suborden:	Serpentes
Familia:	Viperidae
Subfamilia:	Crotalinae
Género:	<i>Crotalus</i>
Especie:	<i>C. durissus</i>
Subespecie:	<i>C. d. cumanensis</i> Humboldt, 1833

La serpiente *C. durissus* se distribuye desde Colombia hasta Argentina, excepto en Ecuador y Chile. En Colombia se encuentra representada por la subespecie *C. d. cumanensis*, la cual registra en toda la costa Caribe, desde el departamento de Córdoba hasta el extremo este de Venezuela, esta subespecie, también se encuentra a lo largo del valle inter-Andino del río Magdalena, desde el municipio de Garzón (Huila) hasta su desembocadura; igualmente se reporta en el Altiplano Cundiboyacense, los Llanos Orientales, Guaviare y Guainía (figura 1) (Campbell et al., 2004).

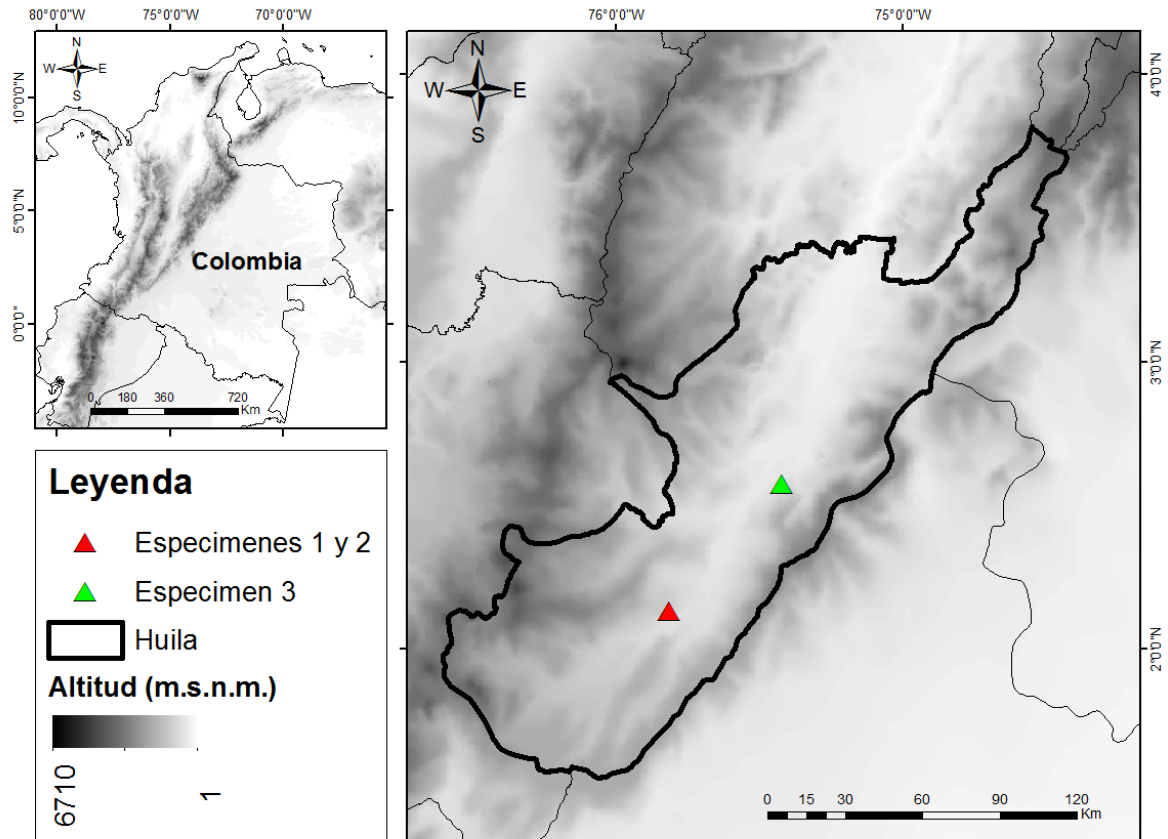


Figura 1. Distribución geográfica de *C. d. cumanensis* en Colombia. Se amplifica la zona de colecta de los especímenes de *C. d. cumanensis* empleados para obtener el pool de veneno. En negro se resalta el departamento del Huila. El triángulo rojo representa el lugar donde fueron colectados los especímenes 1 y 2 en la finca “Las Mercedes” del municipio de Tarqui y el triángulo verde representa al espécimen 3 del municipio de el Hobo, este último permanecía en cautiverio en el Centro de Investigaciones Biomédicas (CIBUC). Fuente: este estudio.

3.5. Veneno de la serpiente *C. d. cumanensis*

El veneno es cualquier sustancia tóxica de origen animal o vegetal que se produce en un órgano excretor o grupo de células altamente especializado (Ayerbe, 2009). El veneno de la cascabel colombiana se clasifica como neurotóxico, con un mecanismo de acción esencialmente a nivel presináptico, impidiendo la liberación de los neurotransmisores en las terminales nerviosas, asimismo produce un

bloqueo neuromuscular y parálisis flácida progresiva que puede desembocar en daño al músculo esquelético, también presenta efecto miotóxico y rara vez genera disturbios en los procesos de coagulación (Brazil, 1966; Bucarechi et al., 2014; Instituto Nacional de Salud INS, 2009). Aunque se ha reportado compromiso de la función hepática o hepatotoxicidad durante el envenenamiento por esta especie, existen pocos estudios al respecto (Ayerbe, 2009). Los principales componentes del veneno crotálico se reportan en la tabla 1.

Tabla 1. Descripción general de los componentes más frecuentes del veneno de las serpientes del género *Crotalus*

Nombre	Tipo de molécula	Función	Efecto	Referencias
Fosfolipasa A₂	Enzimas	Hidrolizan el enlace éster de los glicerofosfolípidos de células musculares y nerviosas liberando ácidos grasos y lisofosfolípidos	Neurotoxicidad, miotoxicidad sistémica, efectos anticoagulantes y edema	(Romero-Vargas et al., 2010; Saviola et al., 2015)
Crotamina	Polipéptido	Actúa sobre los canales de Sodio (Na ⁺) de células musculares y nerviosas	Miotoxicidad y Neurotoxicidad	(Jiménez-Porras, 1970; Ponce-Soto et al., 2007; Saravia et al., 2002)
Crotoxina	Complejo compuesto por una subunidad (B) de Fosfolipasa-A ₂ y una subunidad (A) acídica no enzimática llamada chaperona o crotapotina	Miotoxina y neurotoxina de acción presináptica que inhibe la liberación de acetilcolina	Neurotoxicidad y rabdomiólisis	(Azevedo-Marques et al., 1985; Bucarechi et al., 2014; Hendon, 1975; Lomonte et al., 2015; Saravia et al., 2002)

Convulxina	Lecitina tipo C	Se unen a los carbohidratos dependientes de Calcio (Ca^{+2})	Agente activador plaquetario	(Batuwangala et al., 2004; Boldrini-França et al., 2010; Murakami et al., 2003; Prado-Franceschi and Vital Brazil, 1981)
Giroxina	Serina proteinasas, similares a la trombina	Participa en los procesos degenerativos celulares por catálisis nucleofílicas	Hipofibrinogenemia, activa factores anticoagulantes e induce el síndrome neurológico “rotación de barril”	(Alexander et al., 1988; Boldrini-França et al., 2010; De Oliveira et al., 2009; de Sousa-e-Silva et al., 2003)
Metaloproteinasas	Proteasa dependiente de Zn^{+2}	Proteólisis dependiente de metales	Hemorrágico y actividad fibrinolítica	(Aguilar et al., 2007; Saviola et al., 2015)
Glutamil ciclasas y Fosfolipasa B	Familias enzimáticas	Hidrolizan el enlace éster del primer acilo y del segundo acilo con el glicerol	Contribuye indirectamente en la toxicidad del veneno	(Georgieva et al., 2010; Saviola et al., 2015)

3.6. Accidente Ofídico Crotálico

El accidente ofídico u ofidismo, es el evento desencadenado por la mordedura de las serpientes ya sean venenosas o no, con inoculación de veneno o sin ella (Ayerbe, 2009). Cuando ocurre inoculación de veneno, se denomina envenenamiento ofídico con sus respectivos signos y síntomas (Ayerbe, 2009) y se entiende como accidente ofídico crotálico al causado por la mordedura de las serpientes del género *Crotalus*. El envenenamiento crotálico se caracteriza por presentar manifestaciones locales como dolor, edema, sangrado escaso y ligero eritema. Entre las manifestaciones sistémicas están: parálisis de pares craneales con papiledema, midriasis paralítica, visión borrosa, diplopía, ptosis palpebral,

oftalmoplejía, estrabismo divergente y facies miasténica, mialgias, parálisis periférica progresiva hasta llegar a paro respiratorio y falla renal, también se puede presentar rhabdomiólisis, hemoglobinuria, nefrosis de la nefrona intermedia, mioglobinuria, oliguria o anuria (Barraviera, 1999; Bucarechi et al., 2013). Por otro lado, en cuanto a hallazgos paraclínicos es de resaltar las alteraciones en los tiempos de coagulación e incluso la incoagulabilidad de la sangre, elevación temprana en los niveles creatina fosfoquinasa (CPK), lactato deshidrogenasa (LDH), aspartato aminotransferasa (AST), potasio sérico [K^+], descenso de los niveles de calcio sérico [Ca^{++}] y síndrome compartimental (Ayerbe, 2009; Bucarechi et al., 2014).

3.7. Hígado

Es el órgano más voluminoso del cuerpo y representa el 2% del peso corporal total. Se caracteriza por ser multifuncional (permite la filtración y almacenamiento de la sangre; metaboliza los carbohidratos, proteínas, grasas, hormonas y compuestos químicos extraños; formación de la bilis; depósito de vitaminas y hierro, así como la síntesis de factores de la coagulación) y muchas de sus funciones guardan relación entre sí, por lo tanto se manifiestan en particular en los trastornos hepáticos. (Guyton and Hall, 2011)

3.7.1. Acino hepático

Es una unidad del hígado, tiene una forma de diamante y está formada por la vena porta, la arteria hepática y el conducto biliar (fig. 2). Esta unidad funcional permite comprender los patrones de daño celular que se producen en casos de hipoxia o cuando el hígado es expuesto a sustancias tóxicas (e.g. veneno de serpiente) (Guyton and Hall, 2011). Dentro del acino se diferencian tres zonas:

Zona 1: Es la más próxima a la arteria hepática. En esta zona los hepatocitos reciben una gran cantidad de nutrientes y oxígeno, por lo que estas células son las primeras en ser expuestas a las sustancias tóxicas que llegan al hígado.

Zona 2: Es una zona de actividad metabólica intermedia entre la zona 1 y la zona 3.

Zona 3: Es la zona más distal a la arteria hepática y la más proximal a la vena porta. Los hepatocitos de esta zona son más susceptibles a sufrir daños al exponerse a sustancias tóxicas.

3.7.2. Hepatocito

Son las células especializadas en el desarrollo de las funciones metabólicas que se realizan en el hígado. Estas células son poliédricas de aproximadamente 20 nm de longitud por 30 nm de ancho, presentan un núcleo central redondeado u ovalado, y en el 25% de los casos pueden ser células binucleadas. Asimismo constituyen cerca del 80% de las células del tejido hepático como se muestra en la figura 2 (Gomes-da-Silveira and Ribeiro-Filho, 2006).

3.7.3. Células de Kupffer

También denominadas células reticuloendoteliales, son macrófagos altamente especializados, localizados únicamente en el hígado, revisten los sinusoides y su función es fagocitar las bacterias y otros cuerpos extraños de la sangre de los sinusoides como se muestra en la figura 2 (Guyton and Hall, 2011). Estos macrófagos se incrementan debido al envenenamiento por serpientes y funcionan como un marcador para evaluar el daño hepático (França et al., 2009).

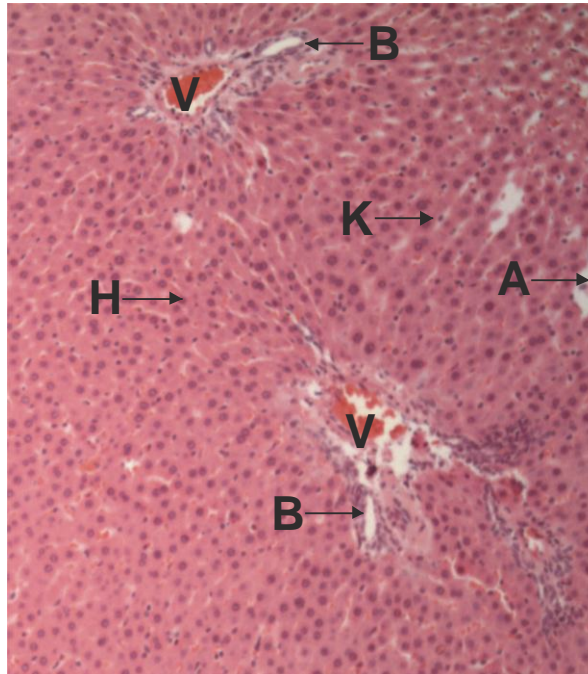


Figura 2. Tejido normal de hígado de ratas observado con microscopio óptico H-E 10X. A. Arteria Hepática. B. Conducto Biliar. K. Células de Kupffer. H. Hepatocito. V. Vena Hepática. Fotografía: Olaya, A (2017).

3.8. Hepatotoxicidad

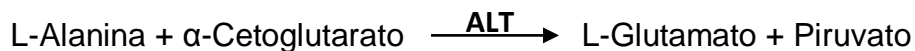
Término general con el cual se hace referencia a las alteraciones y daños generados al hígado por sustancias químicas, xenobióticas, medicamentos y/o estrés oxidativo (Jaeschke et al., 2002), este último causante es un efecto producido por algunos venenos de serpientes. (Abdel-Moneim et al., 2015; Al-Quraishy et al., 2014; Asmari et al., 2015; Dasilva et al., 2011)

Los daños hepáticos asociados al envenenamiento crotálico han sido relacionados al efecto directo del veneno sobre las mitocondrias y por la acción de citocinas en los hepatocitos, especialmente la interleucina-6 (Barraviera et al., 1995). Las lesiones microscópicas son variables y responden a la cantidad de veneno inoculado y al tiempo transcurrido post-inoculación, generando aparición de infiltrados inflamatorios, degeneración hidrópica durante las 12 horas siguientes a la mordedura o inoculación del veneno. Asimismo, los niveles séricos de AST y ALT se pueden ver afectados con tendencia a incrementar significativamente respecto a los grupos control (Dasilva et al., 2011; França et al., 2009).

3.9. Alanina aminotrasferasa (ALT)

También conocida como transaminasa glutámico pirúvica (GPT), se encarga de catalizar la reversión de un grupo amino de la alanina al α -cetoglutarato con formación de glutamato y piruvato. La ALT normalmente se encuentra en las células hepáticas y renales. Esta enzima usualmente se emplea como marcador serológico para el diagnóstico de las enfermedades hepáticas como la hepatotoxicidad (Dasilva et al., 2011; França et al., 2009). Barraviera et al., (1995) establecieron que el incremento de esta enzima en el suero sanguíneo se debe a las lesiones en las membranas mitocondriales y citoplasmáticas de los hepatocitos provocadas por el veneno de *C. d. cumanensis*.

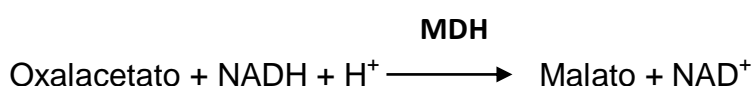
A continuación se presenta la reacción catalizada por la alanina aminotrasferasa en el hígado y el principio fotométrico por el cual puede ser detectada de forma indirecta utilizando LDH. La estimación de la velocidad de disminución de la concentración de NADH en el medio, la cual es proporcional a la concentración catalítica de ALT en la muestra ensayada, permite determinar la cantidad de ALT presente en el suero sanguíneo (Bergmeyer et al., 1978).



3.10. Aspartato aminotransferasa (AST)

Anteriormente conocida como transaminasa glutamato oxaloacética (GOT) cataliza la reversión de un grupo amino del aspartato al α -cetoglutarato con formación de glutamato y oxalacetato. Por otro lado, La AST es una enzima intracelular, que se encuentra principalmente en el músculo del corazón, las células hepáticas, las células del músculo esquelético y en menores cantidades en otros tejidos (Barraviera et al., 1995), es un buen marcador cuando ocurre daño en las células hepáticas.

A continuación se presenta la reacción catalizada por la aspartato aminotransferasa en el hígado. Al igual que en el caso de la ALT, se presenta el principio fotométrico, donde la velocidad de disminución de la concentración de NADH en el medio, que a su vez es proporcional a la concentración catalítica de AST en la muestra ensayada, permite determinar la cantidad de AST presente en el suero sanguíneo (Bergmeyer et al., 1978).



3.11. Relación o cociente AST/ALT

La relación AST/ALT funciona como un indicador de alteraciones hepáticas, cuando este valor es menor a uno, se asocia con hepatitis vírica, si el valor es mayor a uno se relaciona con pacientes enfermos con fibrosis, es decir, enfermedad hepática avanzada. Un incremento mayor a dos puede sugerir procesos de esteatohepatitis no alcohólica o con cirrosis y es necesario realizar una biopsia para establecer el diagnóstico y pronóstico. En caso de observarse un valor superior a cuatro se sugiere fallo hepático agudo (García Martín and Zurita Molina, 1998; Gopal and Rosen, 2000; Moseley, 1996).

4. ANTECEDENTES

Diferentes estudios abordan la epidemiología, el cuadro clínico y la caracterización bioquímica y biológica del veneno de *C. d. cumanensis* en Colombia y Venezuela, al igual que para la subespecie *C. d. terrificus* en Brasil. Sin embargo, a nivel nacional, los estudios son limitados y no existen investigaciones publicadas en relación con el efecto hepatotóxico del veneno de *C. d. cumanensis*.

Grillo-Rodríguez y colaboradores (1974), son considerados los pioneros en el estudio del veneno de *C. d. cumanensis*. Su grupo ha evaluado las propiedades bioquímicas y físicas del veneno incluyendo un análisis del porcentaje de proteínas y nitrógeno, así como el contenido de nucleotidasas y PLA₂, pH, solubilidad, densidad, viscosidad. También reportaron la dosis letal 50 (DL₅₀) intravenosa de 666 µg/kg e intraperitoneal de 1143 µg/kg.

Para el año 2009 en Venezuela, se reportaron cambios séricos en las enzimas ALT y AST inducidos por veneno de *C. d. cumanensis* en ratones. Se observó un incremento significativo de estas enzimas en las pruebas bioquímicas realizadas en grupos de ratones entre las 6 y las 9 horas, lo que sugiere que el veneno de esta especie ocasiona daño hepático (Noriega-Alvarado et al., 2009).

Calvete y colaboradores (2010) realizaron la caracterización venómica de especímenes de *Crotalus simus*, *C. d. cumanensis*, *C. d. durissus*, *C. d. ruruima* y *C. d. terrificus*. Presentaron la correlación de las composiciones y actividades de estos venenos y la tendencia adaptativa pedomorfica del complejo *Crotalus* en Sur América.

Azevedo-Marques y colaboradores (1985) reportaron la evolución clínica de dos pacientes mordidos por *C. d. terrificus* en Brasil, los cuales presentaron hemólisis y neurotoxicidad con secuelas psicológicas asociadas y daño renal. Además, registraron variaciones significativas en los valores de CPK, LDH, AST, urea, creatinina, ácido úrico, Fósforo, Potasio y Calcio. En 1987, los mismos autores, presentaron tres estudios de caso de pacientes donde se determinó la actividad miotóxica y nefrotóxica del veneno de *C. d. terrificus*, a partir del incremento en la actividad enzimática de AST en las primeras 72 horas post-mordedura en los 3 pacientes evaluados; aunque los autores no referencian directamente la hepatotoxicidad, este es un buen marcador serológico de daño hepático (Azevedo-Marques et al., 1987).

Para 1992 se reportó la presencia de neurotoxicidad facial (61%), mialgia (29%) y orina oscura (40%) inducidas por el veneno de la cascabel suramericana en 87 pacientes del sureste brasileño; solo a 13 de ellos se les realizó exámenes

enzimáticos y se encontró un notable incremento en los niveles de creatina quinasa (CK), AST y LDH en 12 pacientes (Portella Silveira and de Andrade Nishioka, 1992). Para ese mismo año, se realizó una caracterización toxinológica de 20 especies diferentes de serpientes suramericanas, de las cuales las serpientes *C. d. terrificus* de Brasil y Argentina presentaron alteraciones en la coagulación y ausencia de este efecto para la población de Bolivia. Por otra parte, el veneno de ningún individuo de esta especie presentó actividad proteolítica, aunque sí actividad edematizante leve (Sanchez et al., 1992).

En 1995, Barraviera y colaboradores encontraron que en 16 pacientes brasileños mordidos por *C. d. terrificus* se incrementaron los niveles de ALT y AST, asociando estos resultados a un daño celular en diferentes órganos; de igual forma, se observó un incremento en los niveles de ALT lo cual está directamente relacionado con daño celular en los hepatocitos. Por otro lado, se reportaron cambios histológicos en el hígado, donde los hepatocitos ubicados cerca a la vena centrolobulillar presentaron degeneración hidrópica.

En 1998, Acosta y colaboradores estudiaron el efecto del veneno de serpientes del género *Crotalus* en ratones y observaron formación de edema, cuya dosis edematizante mínima fue superior a la de las especies del género *Bothrops*, el veneno desencadenó una reacción inflamatoria con presencia de leucocitos polimorfonucleares; asimismo, se observó la presencia de infiltrados inflamatorios alrededor de fibras nerviosas y no se reportaron alteraciones hemorrágicas.

Aguilar y colaboradores en 2007, reportaron variaciones intraespecíficas en las actividades hemostáticas y bioquímicas del veneno de *C. d. cumanensis*. Algunas poblaciones no presentaron uniformidad en las actividades tóxicas, por ejemplo la actividad hemorrágica solo se reportó en tres de siete poblaciones. Las DL₅₀ de los venenos presentaron valores similares, exceptuando el de la Isla Margarita (Venezuela) el cual presentó una mayor toxicidad. La actividad coagulante se reportó en una de las poblaciones y la actividad fibrinolítica fue observada en todas las poblaciones, aunque los valores correspondientes a las poblaciones de

Santa Teresa y la Isla Margarita, fueron menores en comparación con las otras 5 poblaciones estudiadas.

França y colaboradores en 2009 determinaron la hepatotoxicidad inducida por *C. d. terrificus* midiendo los niveles de ALT, los cuales incrementaron cuando se probaron las dosis más altas de veneno. De igual manera, se encontraron células de Kupffer, infiltrado inflamatorio, congestión vascular, aumento en la densidad endotelial y degeneración en los hepatocitos. Para ese año, también reportó incremento en los niveles de ALT (dosis de 300 µg/Kg a las 3 horas y dosis 100 µg/Kg y 300 µg/Kg después de 6 horas de inyectado el veneno) y AST (dosis de 200 µg/Kg y 300 µg/Kg después de 3 horas y dosis de 300 µg/Kg después de 6 horas de inyectado el veneno) al evaluar dosis altas de veneno de *C. d. terrificus* en ratas (Dasilva et al., 2011).

Los estudios recientes sobre hepatotoxicidad ocasionada por venenos de serpiente se han realizado con especies de la familia Viperidae de Medio Oriente y de la familia Elapidae. Por ejemplo, Jarrar en 2011 reportó incremento en los niveles de ALT y AST por acción del veneno de *Echis coloratus* en hígado de ovejos. Además, observó necrosis, alteraciones citoplasmáticas y nucleares, atrofia de los hepatocitos y activación de las células de Kupffer. Por otro lado y en el 2013 se reporta una relación entre el daño hepático, la cantidad y calidad del veneno inoculado de *Naja naja*. De igual forma se presentó condensación nuclear, necrosis, células inflamatorias y congestión sanguínea de la vena central (Morad, 2013).

Al-Quraishy y colaboradores (2014) reportaron estrés oxidativo y apoptosis en células del hígado de ratas después inyectar veneno de *Naja haje* (DL₅₀). Se incrementaron significativamente los niveles de bilirrubina total, AST, gamma glutamil transpeptidasa (GGT), fosfatasa alcalina (ALP) y un aumento no significativo de ALT. En este mismo año, Asad y colaboradores reportaron daños drásticos por envenenamiento de *Naja naja karachiensis* en corazón, hígado y riñones.

En 2015 se reportaron procesos de apoptosis celular, degeneración de los hepatocitos, infiltración y necrosis celular en hígado, además del efecto de la melatonina para contrarrestar el estrés y las lesiones cardio-hepato-renales provocadas por el veneno de *Naja haje* inyectado en ratas (Abdel-Moneim et al., 2015). Por otro lado, se evaluaron la hepatotoxicidad y el estrés oxidativo inducido por el veneno de *Echis pyramidum* por medio de la actividad de diversos marcadores en suero sanguíneo de ratas. Encontraron incrementos significativos en la ALT cuando emplearon dosis altas de veneno (Asmari et al., 2015). De igual forma, para ese año, se reportó la presencia de un hematoma hepático provocado por el veneno de *Bothrops*, se realizó un constante seguimiento de los niveles de ALT y AST, los cuales tuvieron un incremento notable en los primeros días, pero luego descendieron hasta estabilizarse (Cunha et al., 2015).

5. OBJETIVOS

5.1. Objetivo General

Identificar la hepatotoxicidad inducida por el veneno de la serpiente de cascabel *C. d. cumanensis* (serpentes: viperidae) de la cuenca del río Magdalena - departamento de Huila (Colombia).

5.2. Objetivos Específicos

1. Determinar la hepatotoxicidad inducida por el veneno de *C. d. cumanensis*, utilizando los marcadores serológicos ALT y AST en sangre de *R. norvegicus* cepa Wistar.
2. Establecer los efectos histopatológicos del veneno de *C. d. cumanensis* en el hígado de *R. norvegicus* cepa Wistar.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1. Colecta de especímenes

La colecta de especímenes de *C. d. cumanensis* se realizó en el municipio de Tarqui (Huila-Colombia) en zonas rurales aledañas a la cuenca del río Magdalena, este proceso se llevó a cabo por medio de colecta libre en los horarios internacionales establecidos de 7:00 a.m. a 10:00 a.m. y de 4:00 p.m. a 7:00 p.m. se colectaron 3 individuos adultos (Almeida-Santos et al., 2004; Almeida-Santos and Graca-Salomao, 1997).

6.2. Obtención del veneno

En el Centro de Investigaciones Biomédicas de la Universidad del Cauca (CIBUC) se extrajo el veneno de tres especímenes de *C. d. cumanensis*. Para ello, las serpientes se inmovilizaron manualmente y se les indujo a morder una película de papel vinipel, el cual simuló una membrana, dispuesto sobre un embudo de cristal y conectado a un tubo tipo Falcón. Se realizó una mezcla de los venenos, la cual fue liofilizada y conservada a -20°C.

6.3. Análisis enzimático en suero sanguíneo

Al cabo de 8 horas post-inyección de veneno, las ratas se sedaron y se anestesiaron con pentobarbital sódico (Penthal, Invet, S.A.). Posteriormente se realizaron cirugías a las ratas, iniciando por la parte ventral, retirando la piel y disecando hasta llegar al tórax. Se tomaron muestras de sangre de la vena cava ascendente, ubicada en la parte posterior de la masa visceral, la sangre se recogió con un yelco de 20G en tubos separadores de suero (microtainer IMPROMINI, tapa amarilla Gel and clot activator 0,5 ml) con el fin de facilitar la separación entre el suero y el contenido celular. Las muestras se dejaron reposar a temperatura ambiente por 15 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, el cual se separó y se refrigeró durante 12 horas. La actividad enzimática de ALT y AST en suero se determinó empleando 500 µL de los sustratos

enzimáticos Cromatest del laboratorio Linear y 25 μ L del suero sanguíneo, el procedimiento se realizó en un Analizador Bioquímico Semi-Automático URIT-810.

6.4. Histopatología

Las ratas se eutanasiaron una vez se realizó la extracción de la muestra sanguínea, se extrajo el hígado y se cortó transversalmente, posteriormente se fijó con formol tamponado al 10% durante 24 horas. Se continuó con la fase de deshidratación, dejando la muestra en una serie de alcoholes ascendentes una hora por cada uno, de la siguiente manera: 1 alcohol al 80%, 3 alcoholes absolutos (96%) y 3 alcoholes n-propanol, luego se hizo la aclaración de las muestras con xilol (2 veces) y posteriormente estas se infiltraron en un bloque de parafina a 59°C. Los cortes se realizaron a un grosor de 4 μ m 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 hepático; este proceso se realizó comparando la totalidad de las placas histopatológicas de los grupos expuestos a las tres dosis de veneno, así como el grupo control: se observaron los acinos hepáticos y se reportaron alteraciones como infiltrados inflamatorios y degeneración hidrópica.

6.5. Diseño Experimental

28 machos de ratas *R. norvegicus* cepa Wistar con pesos entre 170-230 gramos se distribuyeron aleatoriamente en cuatro grupos de siete individuos los cuales se inyectaron intraperitonealmente (i.p.) con 200 μ L de las dosis de 20%, 40% y 80% de la DL₅₀ (0,166 μ g/g de rata) previamente determinada por Beltrán-Vidal et al. (2011). El grupo control se inyectó con solución salina al 0,9%.

El análisis estadístico se realizó usando los programas BioEstat versión 5.3. y GraphPad Prism versión 5, 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: Distribución de las pruebas estadística según los parámetros evaluados

PARÁMETRO	ALTERACIÓN	PRUEBA ESTADÍSTICA	PRUEBA COMPLEMENTARIA
ENZIMAS HEPÁTICAS	Enzima ALT	ANOVA	Dunnett
	Enzima AST	ANOVA	Dunnett
ALTERACIONES HISTOLÓGICAS	Vacuolización	Chi Cuadrado	
	Infiltrados	Chi Cuadrado	
	Inflamatorios		

7. RESULTADOS

7.1. Análisis enzimático en suero sanguíneo

Con el propósito de determinar el efecto hepatotóxico causado por el veneno de *C. d. cumanensis* se cuantificaron los niveles de las enzimas ALT y AST en sangre de los biomodelos experimentales.

7.1.1. Alanina aminotrasferasa (ALT)

Los resultados se muestran en la figura 2, en la cual no se observa incremento o disminución de los niveles de la enzima ALT asociados a la cantidad de veneno inyectada en el modelo biológico; esto sugiere que en las dosis evaluadas no se genera daño hepático.

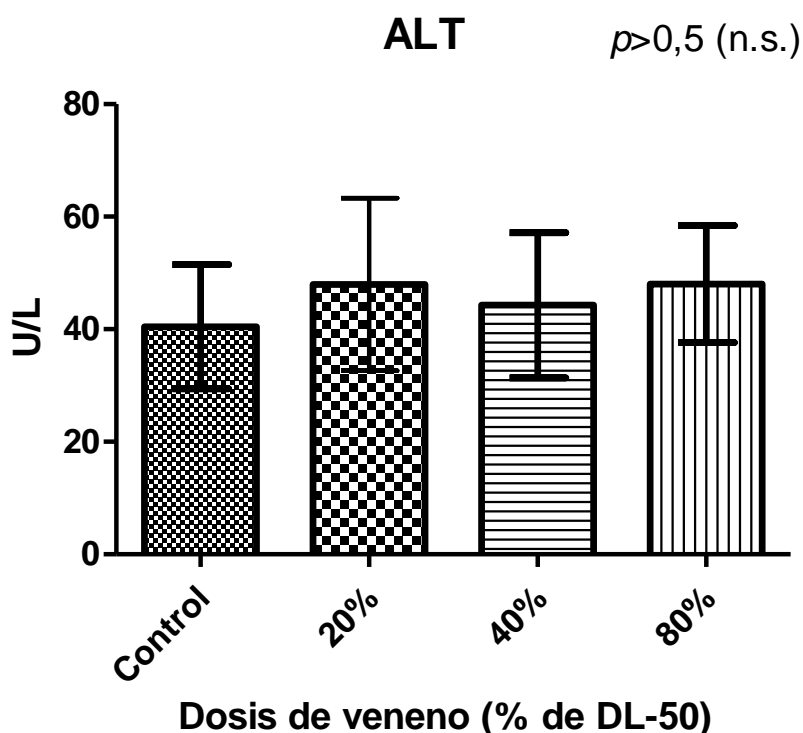


Figura 3: Contraste por ANOVA de una vía de los valores de concentración en suero sanguíneo de la enzima ALT tras ocho horas post inoculación del veneno de *C. d. cumanensis*. No se observan diferencias significativas (n.s.) en los niveles de esta enzima como marcador de daño hepático. El eje de

las coordenadas muestra la concentración de ALT y la desviación estándar de siete repeticiones.

7.1.2. Aspartato aminotrasferasa (AST)

La figura 3 muestra un incremento de los niveles de la enzima AST directamente proporcional a la dosis de veneno inyectada. Se encontraron diferencias altamente significativas al comparar la dosis más alta (80%) respecto al grupo control. Estos resultados sugieren daño principalmente miotóxico, como resultado de la liberación de AST desde las células musculares.

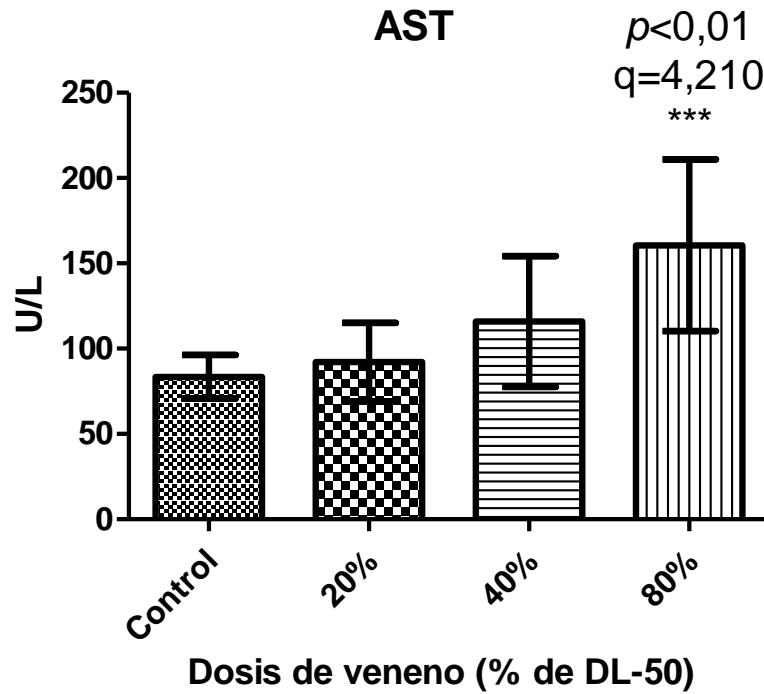


Figura 4. Contraste por ANOVA de una vía de los valores de concentración en suero sanguíneo de la enzima AST tras ocho horas post inoculación del veneno de *C. d. cumanensis*. *** ($p < 0,01$) diferencia altamente significativa en la dosis del 80% respecto al grupo control. El eje de las coordenadas muestra la concentración de AST y la desviación estándar de siete repeticiones.

7.1.3. Relación o cociente AST/ALT

Tomando el promedio de cada grupo expuesto al veneno se realizó la relación AST/ALT y se obtuvieron los siguiente valores.

Grupo de ratas expuestos a la dosis del 20% de veneno de *C. d. cumanensis*

Relación AST/ALT (20%) = $90.81/49.33 = 1.84$

Grupo de ratas expuestos a la dosis del 40% de veneno de *C. d. cumanensis*

Relación AST/ALT (40%) = $126.6/45.99 = 2.75$

Grupo de ratas expuestos a la dosis del 80% de veneno de *C. d. cumanensis*

Relación AST/ALT (80%) = $166.4/49.38 = 3.36$

Lo anterior podría sugerir enfermedad hepática avanzada, pero se descarta ya que el tiempo de exposición al veneno es de sólo 8 horas. Asimismo se puede sospechar de esteatohepatitis no alcohólica pero con los análisis histopatológicos se descarta ya que no se observan acumulaciones grasas en las placas con exposición al veneno.

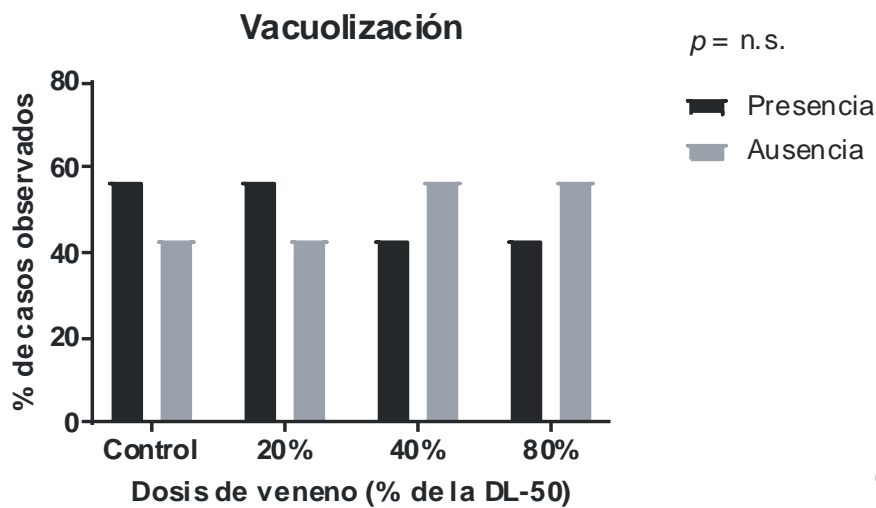
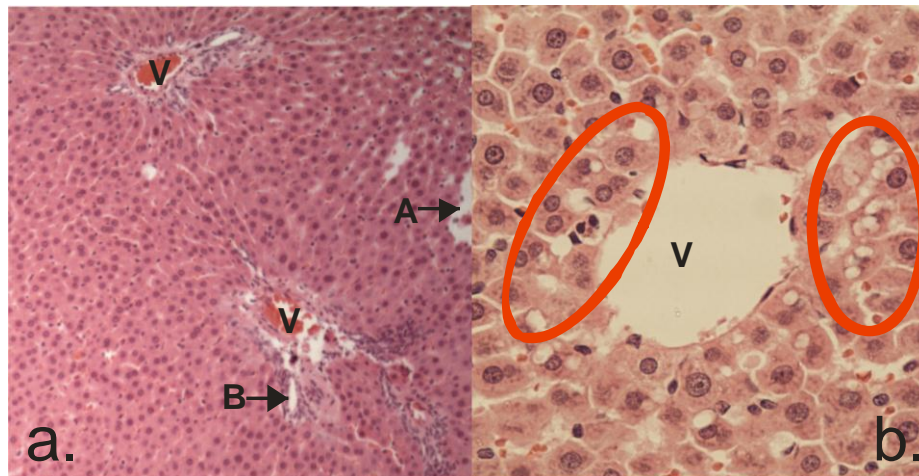
7.2. ANÁLISIS HISTOPATOLÓGICO

Adicional a las muestras de sangre para la medición de los niveles enzimáticos de ALT y AST, se extrajo el hígado de los biomodelos y se realizó un análisis

histopatológico. En los tejidos hepáticos se observaron procesos de vacuolización e infiltrados inflamatorios como se indica en las figuras 4 y 5 respectivamente.

7.2.1. Vacuolización

La degeneración hidrópica o vacuolización se presenta en la figura 4, en la cual no se observa diferencia significativa respecto al grupo control, lo que sugiere que no se genera daño hepático.



C.

Figura 5. Proceso de Vacuolización. **a.** Tejido normal de hígado de ratas control H-E 10X, **b.** Tejido hepático con degeneración hidrópica en círculos rojos, H-E 40X. **c.** Análisis estadístico de la vacuolización por la prueba de

Chi-Cuadrado indicando que la presencia de esta alteración no depende del veneno. (V: Vena, A: Arteria, B: Conducto Biliar,)

7.2.2. Infiltrado Inflamatorio

La presencia de infiltrados inflamatorios en el tejido hepático se presenta en la figura 5, en la cual no se observa diferencia significativa, lo que sugiere que no se genera daño hepático, pero si se presenta una respuesta general a la presencia de veneno.

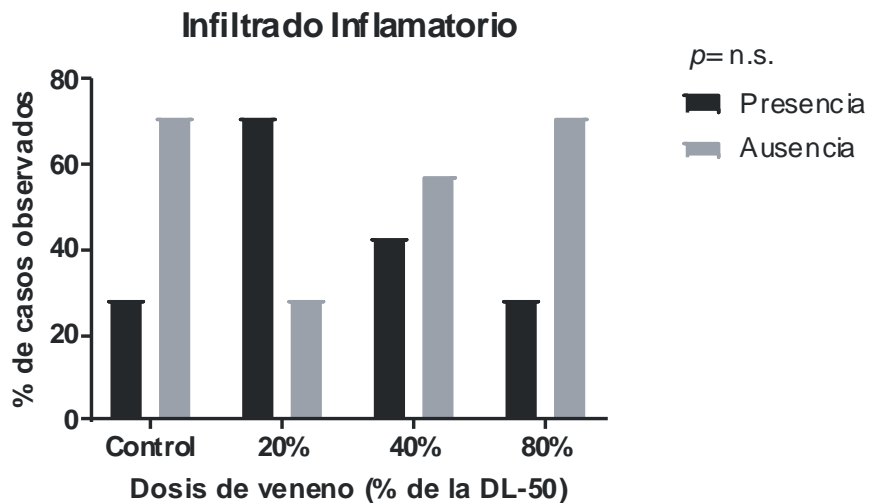
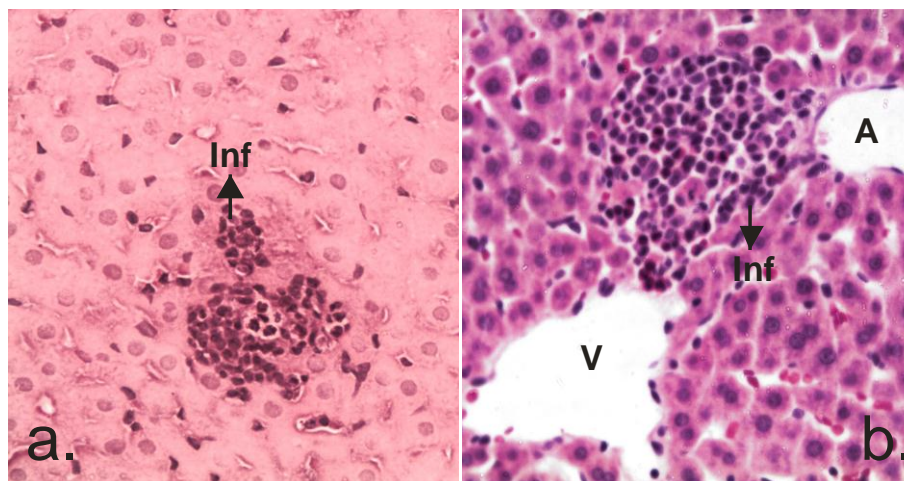


Figura 6. Infiltrados Inflamatorios. **a. y b.** Tejido hepático con presencia de infiltrados inflamatorios, H-E 40X. **c.** Análisis estadístico de la presencia de infiltrados inflamatorios por la prueba de Chi-Cuadrado indicando que la

presencia de esta alteración no depende del veneno. (V: Vena, A: Arteria, Inf: Infiltrado Inflamatorio)

8. DISCUSIÓN

La serpiente suramericana *Crotalus durissus* se caracteriza por generar envenenamientos con efectos sistémicos neurotóxico y miotóxico graves (Azevedo-Marques et al., 1985) que en algunos casos conlleva a falla renal aguda (Azevedo-Marques et al., 1987, 1985) y es acompañado por la elevación en los niveles séricos de enzimas intracelulares como AST, ALT, ALP, CK-Total (Azevedo-Marques et al., 1987, 1985; Barraviera et al., 1995; Dasilva et al., 2011; França et al., 2009; Noriega-Alvarado et al., 2009).

Los efectos ocasionados por el veneno de la *C. d. cumanensis* se deben a la presencia de componentes como nucleotidasa (AMPasa), adenosin trifosfatasa (ATPasa), fosfodiesterasa, nucleótido pirofosfatasa, L-amino ácido oxidasa, hialuronidasa, proteasas dependientes de caseína, ADNAsas, Esterasas, Crotamina, PLA₂ y crotoxina. Las esterazas y la PLA₂ son responsables de la actividad neurotóxica (Grillo-Rodriguez et al., 1974); la crotoxina, compuesta por dos subunidades: una PLA₂ básica, responsable del efecto miotóxico del veneno (Gopalakrishnakone et al., 1984) por la alteración de la organización estructural de la membrana celular como resultado de la liberación de ácidos grasos y lisofosfolípidos (Valente et al., 1998), y una subunidad ácida, la cual es una chaperona llamada crotapotina, la cual favorece la unión de la subunidad básica a las células blanco, lo cual potencia el efecto miotóxico de la PLA₂ (Faure and Bon, 1988).

Con respecto a las alteraciones en la actividad enzimática, se encontró que el veneno de *C. d. cumanensis* tiene la capacidad de alterar los niveles séricos de AST, pero no de ALT en suero sanguíneo de ratas *R. norvegicus*.

Con relación a los niveles de AST se produjo un incremento altamente significativo ($p < 0,001^{***}$) en las ratas inyectadas con la dosis más alta de veneno (80% de la DL₅₀) en contraste con el grupo control. Estos datos son similares a los reportados para la población venezolana de *C. d. cumanensis* (Noriega-Alvarado et al., 2009)

quienes reportan incrementos significativos en los valores serológicos de AST a partir de las tres horas post inoculación de veneno. Lo mismo ocurre con *C. d. terrificus*, se observaron incrementos significativos en las dosis más altas (200 µg/kg y 300 µg/kg) tres horas después de inyectar el veneno por vía I.P. a los bimodelos (Dasilva et al., 2011; França et al., 2009)

La AST es una enzima intracelular, considerada como marcador de daño hepático, aunque no es tan específica como ALT, ya que se encuentra principalmente en las mitocondrias de las células del músculo cardíaco, hepáticas, y en mayor cantidad en las células del músculo esquelético (Barraviera et al., 1995). La elevación de esta enzima podría explicarse por el efecto miotóxico de la crotoxina, cuyo mecanismo de acción se basa en la unión electrostática de la subunidad B o PLA₂ sobre las membranas de los miocitos, debido a la presencia de aminoácidos básicos como la lisina, arginina e histidina, responsables de la interacción específica de esta enzima con los glicerofosfolípidos de las membranas celulares cargadas negativamente (Pereañez et al., 2009). Una vez unida a la membrana, la PLA₂ hidroliza los glicerofosfolípidos liberando ácidos grasos y lisofosfolípidos a la matriz extracelular, lo cual provoca inestabilidad estructural a la membrana y ruptura de la misma (Asmari et al., 2015). Lo anterior conduce a la liberación de AST, CK, mioglobina y lactato deshidrogenasa al torrente sanguíneo ocasionando mioglobinemia y mioglobinuria (Azevedo-Marques et al., 1985; Dasilva et al., 2011).

Además del daño miotóxico, la PLA₂ también está relacionada con la disfunción hepática. Se ha propuesto que esta enzima contribuye con la pérdida de la integridad en la membrana celular de los hepatocitos, ya que en la región de los sinusoides hepáticos no existe una membrana basal lo suficientemente resistente para evitar la propagación de la PLA₂ (Dasilva et al., 2011). Asimismo, se ha demostrado que la PLA₂ interfiere en los procesos de respiración mitocondrial en los hepatocitos, generando pérdida progresiva de energía celular y lisis de la mitocondria lo que se traduce en un extravasamiento de la enzima AST al citoplasma y finalmente al torrente sanguíneo (Azevedo-Marques et al., 1987; Barraviera et al., 1995; França et al., 2009; Valente et al., 1998).

Otro de los parámetros serológicos evaluados fue el nivel de la enzima ALT, esta enzima usualmente se emplea como marcador serológico para el diagnóstico de las enfermedades hepáticas como la hepatotoxicidad (Bénichou, 1990; Dasilva et al., 2011; França et al., 2009). No se encontraron diferencias significativas entre los niveles de ALT de las concentraciones evaluadas y el grupo control ($p>0,5$). Los valores observados contrastan con los reportados para la misma especie *C. d. cumanensis* que habitan en la zona costera de Venezuela, los cuales presentan incrementos significativos respecto al control en ensayos de una, tres y seis horas de exposición (dosis I.P. 0,75 mg de veneno crudo/Kg de ratón) (Noriega-Alvarado et al., 2009). Los valores de ALT también son contrarios a los inducidos por el veneno de otra especie de vipérido: *Echis pyramidum*, procedente de la península arábiga. Las ratas tratadas con tres dosis de este veneno (0.25, 0.50 and 1.00 mg/kg de rata) mostraron diferencias altamente significativas respecto al control en las dosis media y alta entre las 3 y las 6 horas de exposición (Asmari et al., 2015). De igual manera, estos resultados contrastan con los reportados para el veneno de *C. d. terrificus* del sureste brasileño, ya que este veneno genera un incremento significativo en los valores de ALT a partir de las 3 horas en la dosis de 300 μ g/kg (Barraviera et al., 1995, 1989; Dasilva et al., 2011; França et al., 2009). Por otro lado, los valores serológicos de ALT fueron similares a los reportados por Al-Quraishy y colaboradores (2014), quienes emplearon la misma vía de inoculación y los mismos biomodelos para evaluar el efecto del veneno de *Naja haje* del sureste de Egipto, especie de familia Elapidae (Al-Quraishy et al., 2014). Esto se puede deber a que la cobra egipcia al igual que la cascabel colombiana, posee un veneno altamente neurotóxico y miotóxico, efectos asociados a la presencia de PLA₂.

En la mayoría de los casos la lesión en los hepatocitos se asocia con el incremento en los niveles de ALT. Pero es importante evaluar estos casos de manera integral, para ello se debe tener en cuenta la relación de AST sobre ALT, ya que al observar un índice mayor a dos, como se observó en los resultados de esta investigación, se sugiere necrosis hepática inducida por las toxinas así como una hepatitis isquémica asociada a un shock circulatorio (Gopal and Rosen, 2000;

Moseley, 1996; Nyblom et al., 2006). La necrosis hepática se descartó ya que tras el tiempo de exposición al veneno no se observaron células necrosadas en el estudio histopatológico, ya que en otros estudios estos efectos se observan después de las primeras 3 horas de exposición al veneno (Al-Quraishy et al., 2014; Barraviera et al., 1995; Boldrini-França et al., 2010).

En el estudio histopatológico se reportaron dos alteraciones, vacuolización y aparición de infiltrados, los cuales son indicadores de una afectación hepática inducida por fármacos o toxinas, las dos alteraciones no presentaron diferencia significativa respecto al grupo control, descartando así un daño a las células hepáticas. Los presentes resultados son contrarios a los reportados por otros autores para el veneno de *C. d. terrificus* (Barraviera et al., 1995; Dasilva et al., 2011; França et al., 2009), esto puede explicarse por la variación en la composición de los venenos; estudios proteómicos muestran que el veneno de *C. d. cumanensis* presenta mayor cantidad de metaloproteinasas y menor cantidad de crotoxina y PLA₂ que *C. d. terrificus* de Brasil (Calvete et al., 2010; Grillo-Rodriguez et al., 1974). Estas proteínas tiene una relación directa con la alta especificidad que proporciona la crotopotina a la PLA₂ sobre las proteínas receptoras en la membrana celular de los miocitos y no sobre los hepatocitos (Faure and Bon, 1987; Pereañez et al., 2009).

La presencia de infiltrados inflamatorios se puede explicar cómo una respuesta del organismo al veneno de *C. d. cumanensis* ya que, como se ha reportado en otros estudios se desencadena una reacción inflamatoria, con presencia de leucocitos polimorfonucleares, neutrófilos y macrófagos (Gutiérrez et al., 1990, 1984), estas células inflamatorias son atraídas por la liberación de citocinas, interleucina-2 (IL-2) e interleucina-6 (IL-6) por las células afectadas en el tejido hepático y las células de Kupffer después de las primeras horas de envenenamiento ya que estas células son moduladoras de la respuesta inflamatoria al actuar como células presentadoras de antígenos (Clària and Titos, 2004; Lomonte et al., 1993).

La población de *C. d. cumanensis* se distingue del resto de las poblaciones del país por encontrarse en el valle interandino del Río Magdalena en Colombia,

localizado entre las cordilleras Central y Oriental, cuya formación tuvo origen durante el cuaternario con el levantamiento de la cordillera de los Andes (Lobo Guerrero Uscátegui, 1994). Este aislamiento geográfico y las diferencias ecosistémicas propias del valle, pueden ser factores que influyen en la abundancia de los componentes del veneno de la especie, variaciones que se reflejan en las actividades biológicas y por lo tanto, ser determinantes en los niveles de AST y ALT observados *in vivo*. Estas variaciones intraespecíficas (e.g. geográficas, ontogénicas e individuales) son reconocidas en diferentes especies de la familia Viperidae (Saldarriaga et al., 2003; Tu and Adams, 1968), así como en especies del género *Crotalus*, como por ejemplo *C. oreganus helleri* (Sunagar et al., 2014), y *C. viridis concolor* de Estados Unidos (Aird and Kaiser, 1985; Glenn and Straight, 1977; Mackessy, 2010; Pook, 2001; Pook et al., 2000), *C. durissus durissus* de Suramérica (Lomonte et al., 1983) y *C. d. cumanensis* procedente de la costa caribe colombiana y venezolana (Arévalo-Páez et al., 2017; Calvete et al., 2010).

Las variaciones geográficas en la composición de los venenos han sido reportadas exhaustivamente (Chippaux et al., 1991); se resaltan las diferencias encontradas en la actividad de las PLA₂ y L-amino ácido oxidasa en poblaciones aisladas de *Echis carinatus* (Taborska, 1971) y del género *Crotalus* (Calvete et al., 2010). La hipótesis del aislamiento geográfico podría explicar las variaciones en la hepatotoxicidad entre los venenos de *C. d. cumanensis* de Colombia y Venezuela, como un proceso de adaptación de estas dos poblaciones a la disponibilidad de alimento y a las condiciones ambientales, tal como lo reporta Barrio y Brazil para *C. d. terrificus*, quienes observaron variaciones en las actividades biológicas del veneno de esta especie entre poblaciones con distinta distribución geográfica, por lo que proponen la existencia de dos grupos, el primero caracterizado por generar convulsiones, hipotonía y parálisis y el segundo grupo por presentar hipotonía y flacidez muscular (Barrio and Brazil, 1951).

En general, esta investigación evidencia que el veneno de *C. d. cumanensis* distribuida al sur del Valle del río Magdalena se caracteriza por presentar un efecto principalmente miotóxico, que podría estar asociado a la presencia de PLA₂ como es el caso de la población venezolana de la misma especie y contrasta con los

efectos hepatotóxicos y miotóxicos observados en el veneno de *C. d. terrificus* de Brasil; por lo anterior se considera que la distribución geográfica, la disponibilidad de alimento y las condiciones medioambientales en las que habitan los organismos, son factores que pueden contribuir con las variaciones en la composición del veneno y en los efectos nocivos que producen en la víctima durante el envenenamiento (Calvete et al., 2010).

9. CONCLUSIONES

- El veneno de *C. d. cumanensis* no generó alteraciones significativas en los niveles de la enzima ALT ni a nivel histopatológico en el hígado respecto al control.
- A pesar de generar un incremento significativo en los valores de la enzima AST, no se observaron lesiones histopatológicas a nivel hepático que soporten alteraciones en el hígado, lo que sugiere que el veneno de *C. d. cumanensis* no presenta efecto hepatotóxico aparente en las ratas durante las primeras 8 horas de exposición al veneno.
- La elevación en los valores de la enzima AST sugiere que el veneno de la serpiente de cascabel distribuida al sur del Valle del río Magdalena genera daño miotóxico severo por alteraciones estructurales a la membrana celular de los miocitos.

10. RECOMENDACIONES

- Realizar estudios de los niveles en sangre de fosfatasa alcalina, gamma glutamil transferasa y bilirrubina total ya que permitirían esclarecer el efecto del veneno de *C. d. cumanensis* en el hígado y descartar colestasis. También es importante determinar los niveles séricos de lactato deshidrogenasa (LDH) para observar procesos de hipoxia y complementar los estudios miotóxicos realizando un perfil de creatina quinasa (CK).
- Realizar un análisis funcional (actividad miotóxica, proteolítica desfibrinante, DL50, etc...) del veneno de *C. d. cumanensis* en los diferentes órganos del

cuerpo. De ser posible, soportar mediante la descripción exhaustiva de un caso clínico de un paciente mordido por *Crotalus*.

- Realizar un análisis proteómico y funcional del veneno de *C. d. cumanensis* con el objetivo de conocer su composición y las actividades biológicas que produce por medio de ensayos in vitro e in vivo.
- Fraccionar el veneno total de *C. d. cumanensis* de Colombia y Venezuela y *C. d. terrificus* de Brasil, para determinar cuáles son las moléculas causantes del daño hepático.
- Realizar la cuantificación de las enzimas y los análisis histológicos a 3, 6, 9, 12 y 24 horas post inyección de las dosis de veneno.
- Evaluar los protocolos de manejo médico del accidente ofídico crotálico y las enfermedades asociadas al mismo con el fin de mejorar la atención médica y asegurar la calidad de vida de los pacientes afectados por esta enfermedad.

11. BIBLIOGRAFÍA

Abdel-Moneim, A.E., Ortiz, F., Leonardo-Mendonca, R.C., Vergano-Villodres, R., Guerrero-Martínez, J.A., López, L.C., Acuña-Castroviejo, D., Escames, G., 2015. Protective effects of melatonin against oxidative damage induced by Egyptian cobra (*Naja haje*) crude venom in rats. *Acta Trop.* 143, 58–65. doi:10.1016/j.actatropica.2014.12.007

Acosta, O., Koscinczuk, P., Teibler, P., Marcial Sanchez, Ruiz, R., Maruñak, S., Bogarín, G., 1998. Actividades hemorrágica y edematizante y alteraciones histológicas en almohadilla plantar del ratón inducidas por venenos de serpientes de los géneros *Bothrops* y *Crotalus* de Argentina. *Toxicon* 36, 1165–1172.

Aguilar, I., Guerrero, B., Salazar, A.M., Girón, M.E., Pérez, J.C., Sánchez, E.E., Rodríguez-Acosta, A., 2007. Individual venom variability in the South

- American rattlesnake *Crotalus durissus cumanensis*. *Toxicon* 50, 214–224.
doi:10.1016/j.toxicon.2007.03.012
- Aird, S.D., Kaiser, I.I., 1985. Comparative studies on three rattlesnake toxins.
Toxicon 23, 361–374. doi:10.1016/0041-0101(85)90020-0
- Al-Quraishy, S., Dkhil, M.A., Abdel Moneim, A.E., 2014. Hepatotoxicity and oxidative stress induced by *Naja haje* crude venom. *J. Venom. Anim. Toxins Incl. Trop. Dis.* 20, 1–10. doi:10.1186/1678-9199-20-42
- Alexander, G., Grothusen, J., Zepeda, H., Schwartzman, R.J., 1988. Gyroxin, a toxin from the venom of *Crotalus durissus terrificus*, is a thrombin-like enzyme. *Toxicon* 26, 953–960. doi:10.1016/0041-0101(88)90260-7
- Almeida-Santos, S.M., Graca-Salomao, M. Da, 1997. Long-Term Sperm Storage in the Female Neotropical Rattlesnake *Crotalus durissus terrificus* (Viperidae: Crotalinae). *Japanese J. Herpetol.* 17, 46–52.
- Almeida-Santos, S.M., Laporta-Ferreira, I.L., Antoniazzi, M.M., Jared, C., 2004. Sperm storage in males of the snake *Crotalus durissus terrificus* (Crotalinae: Viperidae) in southeastern Brazil. *Comp. Biochem. Physiol. - A Mol. Integr. Physiol.* 139, 169–174. doi:10.1016/j.cbpb.2004.08.004
- Arévalo-Páez, M., Rada-Vargas, E., Betancur-Hurtado, C., Renjifo, J.M., Renjifo-Ibáñez, C., 2017. Neuromuscular effect of venoms from adults and juveniles of *Crotalus durissus cumanensis* (Humboldt, 1811) from Guajira, Colombia. *Toxicon* 139, 41–44. doi:10.1016/j.toxicon.2017.09.016
- Asad, M.H.H. Bin, Murtaza, G., Ubaid, M., Durr-E-Sabih, Sajjad, A., Mehmood, R., Mahmood, Q., Ansari, M.M., Karim, S., Mehmood, Z., Hussain, I., 2014. *Naja naja karachiensis* Envenomation: Biochemical parameters for cardiac, liver, and renal damage along with their neutralization by medicinal plants. *Biomed Res. Int.* 2014. doi:10.1155/2014/970540
- Asmari, A.K. Al, Khan, H.A., Banah, F.A., Buraidi, A.A. Al, Manthiri, R.A., 2015. Serum biomarkers for acute hepatotoxicity of *Echis pyramidum* snake venom in rats. *Int. J. Clin. Exp. Med.* 8, 1376–1380.

- Ayerbe, S., 2009. Ofidismo en Colombia. Enfoque Diagnóstico y Tratamiento, in: Ordoñez, C.A., Ferrada, R., Buitrago, R. (Eds.), CUIDADO INTENSIVO Y TRAUMA. Distribuna Editorial, Bogotá, pp. 1143–1170.
- Ayerbe González, S., Latorre Ledezma, J.P., 2010. Manual Para La Prevención Y Mejoramiento En La Atención Del Paciente Con Accidente Ofídico. Gobernación del Departamento del Cauca, Secretaría Departamental de Salud, Popayán.
- Azevedo-Marques, M.M., Cupo, P., Coimbra, T.M., Hering, S.E., Rossi, M.A., Laure, C.J., 1985. Myonecrosis, myoglobinuria and acute renal failure induced by south american rattlesnake (*Crotalus durissus terrificus*) envenomation in brazil. *Toxicon* 23, 631–636. doi:10.1016/0041-0101(85)90367-8
- Azevedo-Marques, M.M., Hering, S.E., Cupo, P., 1987. Evidence that *Crotalus durissus terrificus* (South American rattlesnake) envenomation in humans causes myolysis rather than hemolysis. *Toxicon* 25, 1163–1168. doi:10.1016/0041-0101(87)90134-6
- Barraviera, B., 1999. Acidentes por Serpentes dos Gêneros *Crotalus* e *Micrurus* e Acidentes por Serpentes do Gênero *Lachesis*, in: Barraviera, B. (Ed.), Venenos, Aspectos Clínicos E Terapêuticos. EPUB, pp. 6–297.
- Barraviera, B., Bonjorno Junior, J.C., Arkaki, D., Domingues, M.A., Pereira, P.C., Mendes, R.P., Machado, J.M., Meira, D.A., 1989. A retrospective study of 40 victims of *Crotalus* snake bites. Analisis of the hepatic necrosis observed in one patient. *Rev Soc Bras Med Trop* 22, 5–12. doi:10.1590/S0037-86821989000100002
- Barraviera, B., Coelho, K.Y.R., Curi, P.R., Meira, D.A., 1995. Liver dysfunction in patients bitten by *Crotalus durissus terrificus* (Laurenti, 1768) snakes in Botucatu (state of Sao Paulo, Brazil). *Rev. Inst. Med. trop. Sao Paulo* 37, 63–69.
- Barrio, A., Brazil, V.O., 1951. Neuromuscular action of the *Crotalus terrificus* (*Laur.*) poisons. *Acta Physiol. Lat. Am.* 1, 291–308.

- Batuwangala, T., Leduc, M., Gibbins, J.M., Bon, C., Jones, E.Y., 2004. Structure of the snake-venom toxin convulxin. *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* 60, 46–53. doi:10.1107/S0907444903021620
- Beltrán-Vidal, J., Ayerbe-González, S., Arenas-Belalcázar, C., Coral-Plaza, R., Hurtado, F., Morales, H., Sarmiento, B., Torres-C., M., Tobar-R., J., 2011. Evaluación cardiotoxica del veneno de la serpiente *Crotalus durissus cumanensis*, en ratas *Rattus norvegicus*. Popayán.
- Bénichou, C., 1990. Criteria of drug-induced liver disorders Report of an International Consensus Meeting. *J. Hepatol.* 11, 272–276. doi:10.1016/0168-8278(90)90124-A
- Bergmeyer, H.U., Scheibe, P., Wahlefeld, A.W., 1978. Optimization of methods for aspartate aminotransferase and alanine aminotransferase. *Clin. Chem.* 24, 58–73.
- Boldrini-França, J., Corrêa-Netto, C., Silva, M.M.S., Rodrigues, R.S., De La Torre, P., Pérez, A., Soares, A.M., Zingali, R.B., Nogueira, R.A., Rodrigues, V.M., Sanz, L., Calvete, J.J., 2010. Snake venomomics and antivenomics of *Crotalus durissus* subspecies from Brazil: Assessment of geographic variation and its implication on snakebite management. *J. Proteomics* 73, 1758–1776. doi:10.1016/j.jprot.2010.06.001
- Brazil, O. V., 1966. Pharmacology of crystalline crotoxin. II. Neuromuscular blocking action. *Mem. Inst. Butantan* 33, 981–992.
- Bucarechi, F., De Capitani, E.M., Branco, M.M., Fernandes, L.C.R., Hyslop, S., 2013. Coagulopathy as the main systemic manifestation after envenoming by a juvenile South American rattlesnake (*Crotalus durissus terrificus*): case report. *Clin. Toxicol.* 51, 505–508. doi:10.3109/15563650.2013.802796
- Bucarechi, F., De Capitani, E.M., Hyslop, S., Mello, S.M., Fernandes, C.B., Bergo, F., Nascimento, F.B.P., 2014. Compartment syndrome after South American rattlesnake (*Crotalus durissus terrificus*) envenomation. *Clin. Toxicol.* 52, 639–641. doi:10.3109/15563650.2014.913177

- Calvete, J.J., Sanz, L., Cid, P., de la Torre, P., Flores-Díaz, M., Dos Santos, M.C., Borges, A., Bremo, A., Angulo, Y., Lomonte, B., Alape-Girón, A., Gutiérrez, J.M., 2010. Snake Venomics of the Central American Rattlesnake *Crotalus simus* and the South American *Crotalus durissus* Complex Points to Neurotoxicity as an Adaptive Paedomorphic Trend along *Crotalus* Dispersal in South America. *J. Proteome Res.* 9, 528–544. doi:10.1021/pr9008749
- Campbell, J.A., Lamar, W.W., Brodie, E.D., 2004. The venomous reptiles of the western hemisphere. Comstock Pub. Associates.
- Chippaux, J.P., Williams, V., White, J., 1991. Snake Venom Variability : Methods of Study, Resultados and Interpretation. *Toxicon* 29, 1279–1303.
- Clària, J., Titos, E., 2004. La célula de Kupffer. *Gastroenterol. Hepatol.* 27, 264–273. doi:10.1016/S0210-5705(03)70457-9
- Cunha, F.C., Heerdt, M., Torrez, P.P.Q., França, F.O. de S., Molin, G.Z.D., Battisti, R., Zannin, M., 2015. First report of hepatic hematoma after presumed Bothrops envenomation. *Rev Soc Bras Med Trop* 48, 633–635.
- Dasilva, J.G., Dasilva, S.B., Gris, V., Pires, A.R.A., Silvia, M.S.C., Eler, G.J., Hermoso, A.P.M., Bracht, A., Dalsenter, P.R., Acco, A., Silva, J.G. Da, Soley, B.D.S., Gris, V., Pires, A.D.R.A., Caderia, S.M.S.C., Eler, G.J., Hermoso, A.P.M., Bracht, A., Dalsenter, P.R., Acco, A., 2011. Effects of the *Crotalus durissus terrificus* snake venom on hepatic metabolism and oxidative stress. *J. Biochem. Mol. Toxicol.* 25, 195–203. doi:10.1002/jbt.20376
- De Oliveira, D.G.L., Murakami, M.T., Cintra, A.C.O., Franco., J.J., Sampaio, S. V., Arni, R.K., 2009. Functional and structural analysis of two fibrinogen-activating enzymes isolated from the venoms of *Crotalus durissus terrificus* and *Crotalus durissus collilineatus*. *Acta Biochim. Biophys. Sin. (Shanghai)*. 41, 21–29. doi:10.1093/abbs/gmn003
- de Sousa-e-Silva, M.C.C., Tomy, S.C., Tavares, F.L., Navajas, L., Larsson, M.H.M.A., Lucas, S.R.R., Kogika, M.M., Sano-Martins, I.S., 2003. Hematological, hemostatic and clinical chemistry disturbances induced by

- Crotalus durissus terrificus* snake venom in dogs. *Hum. Exp. Toxicol.* 22, 491–500. doi:Doi 10.1191/0960327103ht392oa
- Faure, G., Bon, C., 1988. Crotoxin, a phospholipase A2 neurotoxin from the South American rattlesnake *Crotalus durissus terrificus*: purification of several isoforms and comparison of their molecular structure and of their biological activities. *Biochemistry* 27, 730–738.
- Faure, G., Bon, C., 1987. Several isoforms of crotoxin are present in individual venoms from the South American rattlesnake *Crotalus durissus terrificus*. *Toxicon* 25, 229–234. doi:10.1016/0041-0101(87)90246-7
- França, R., Vieira, R., Ferrari, E., Souza, R., Osorio, R., Prianti-Jr, A., Hyslop, S., Zamuner, S., Cogo, J., Ribeiro, W., 2009. Acute hepatotoxicity of *Crotalus durissus terrificus* (South American rattlesnake) venom in rats. *J. Venom. Anim. Toxins Incl. Trop. Dis.* 15, 61–78. doi:10.1590/S1678-91992009000100007
- García Martín, M., Zurita Molina, A., 1998. Transaminasas: Valoración y significación clínica. *Protoc. diagnóstico-terapéuticos Gastroenterol. Hepatol. y Nutr. Pediátrica SEGHNP-AEP* 267–275.
- Georgieva, D., Michaela, Ö., Seifert, J., Bergen, M. Von, Arni, R.K., Genov, N., Betzel, C., 2010. Snake Venomic of *Crotalus durissus terrificus* sCorrelation with Pharmacological Activities. *J. Proteome Research* 9, 2302–2316.
- Glenn, J.L., Straight, R., 1977. The midget faded rattlesnake (*Crotalus Viridis Concolor*) venom: Lethal toxicity and individual variability. *Toxicon* 15, 129–132. doi:10.1016/0041-0101(77)90031-9
- Gomes-da-Silveira, V., Ribeiro-Filho, J., 2006. Anatomia y Fisiologia Hepatica, in: *El Transplante Hepático En El Comienzo Del Milenio*. Atheneu Hispânica, Rio de Janeiro, pp. 13–36.
- Gopalakrishnakone, P., Dempster, D.W., Hawgood, B.J., Elder, H.Y., 1984. Cellular and mitochondrial changes induced in the structure of murine skeletal muscle by crotoxin, a neurotoxic phospholipase A2 complex. *Toxicon* 22, 85–

98. doi:10.1016/0041-0101(84)90141-7

- Gopal, D. V., Rosen, H.R., 2000. Abnormal findings on liver function tests: Interpreting results to narrow the diagnosis and establish a prognosis. *Postgrad. Med.* 107, 100–114. doi:10.3810/pgm.2000.02.869
- Grillo-Rodriguez, O., Scannone, H.R., Parra, N.D., 1974. Enzymatic activities and other characteristics of *Crotalus durissus cumanensis* venom. *Toxicon* 12, 297–302. doi:10.1016/0041-0101(74)90073-7
- Gutiérrez, J.M., Arce, V., Brenes, F., Chaves, F., 1990. Changes in myofibrillar components after skeletal muscle necrosis induced by a myotoxin isolated from the venom of the snake *Bothrops asper*. *Exp. Mol. Pathol.* 52, 25–36. doi:10.1016/0014-4800(90)90055-I
- Gutiérrez, J.M., Ownby, C.L., Odell, G. V., 1984. Skeletal muscle regeneration after myonecrosis induced by crude venom and a myotoxin from the snake *Bothrops asper* (Fer-de-Lance). *Toxicon* 22, 719–731. doi:10.1016/0041-0101(84)90155-7
- Guyton, A.C., Hall, J.E., 2011. *Fisiología Médica*, 12a edició. ed. Elsevier, Barcelona.
- Hendon, R.A., 1975. Preliminary studies on the neurotoxin in the venom of *Crotalus scutulatus* (Mojave rattlesnake). *Toxicon* 13, 477–482.
- Instituto Nacional de Salud INS, 2009. *Protocolo de vigilancia de accidente ofídico*.
- Jaeschke, H., Gores, G.J., Cederbaum, A.I., Hinson, J.A., Pessayre, D., Lemasters, J.J., 2002. Mechanisms of hepatotoxicity. *Toxicol. Sci.* 65, 166–176. doi:10.1093/toxsci/65.2.166
- Jarrar, B.M., 2011. Histological alterations and biochemical changes in the liver of sheep following *Echis coloratus* envenomation. *Saudi J. Biol. Sci.* 18, 169–174. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.sjbs.2010.12.002
- Jiménez-Porras, J.M., 1970. Biochemistry of snake venoms. *Clin. Toxicol.* 3, 389–431. doi:10.3109/15563657008990116

- Lillywhite, H.B., 2014. *How Snakes Work: Structure, Function and Behavior of the World's Snakes*. New York.
- Lobo Guerrero Uscátegui, A., 1994. *La Infraestructura de Colombia - Memorias*, Sociedad Colombiana de Geotécnica. Medellín.
- Lomonte, B., Gené, J.A., Gutiérrez, J., Cerdas, L., 1983. Estudio comparativo de los venenos de serpiente Cascabel (*Crotalus durissus durissus*) de ejemplares adultos y recién nacidos. *Toxicon* 21, 379–384. doi:10.1016/0041-0101(83)90094-6
- Lomonte, B., Mora-Obando, D., Fernández, J., Sanz, L., Pla, D., María Gutiérrez, J., Calvete, J.J., 2015. First crotoxin-like phospholipase A2 complex from a New World non-rattlesnake species: Nigroviriditoxin, from the arboreal Neotropical snake *Bothriechis nigroviridis*. *Toxicon* 93, 144–154. doi:10.1016/j.toxicon.2014.11.235
- Lomonte, B., Tarkowski, A., Hanson, L.Å., 1993. Host response to *Bothrops asper* snake venom: analysis of edema formation, inflammatory cells, and cytokine release in a mouse model. *Inflammation* 17, 93–105. doi:10.1007/BF00916097
- Lynch, J.D., 2012. El Contexto De Las Serpientes De Colombia Con Un Análisis De Las Amenazas En Contra De Su Conservación. *Rev. la Acad. Colomb. Ciencias ...* 36, 435–449.
- Mackessy, S.P., 2010. Evolutionary trends in venom composition in the Western Rattlesnakes (*Crotalus viridis sensu lato*): Toxicity vs. tenderizers. *Toxicon* 55, 1463–1474. doi:10.1016/j.toxicon.2010.02.028
- Morad, T.S., 2013. Histopathological Changes Induced by Single Dose of LD50 *Naja naja* Snake Venom on the Liver of Male Albino Rats. *Iraqi J. Med. Sci.* 11, 18–23.
- Moseley, R.H., 1996. Evaluation of abnormal liver function tests. *Manag. Chronic Liver Dis.* 80, 887–906. doi:10.1136/pmj.79.932.307
- Murakami, M.T., Zela, S.P., Gava, L.M., Michelin-Duarte, S., Cintra, A.C.O., Arni, R.K., 2003. Crystal structure of the platelet activator convulxin, a disulfide-

linked $\alpha_4\beta_4$ cyclic tetramer from the venom of *Crotalus durissus terrificus*.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 310, 478–482.
doi:10.1016/j.bbrc.2003.09.032

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.

Nyblom, H., Björnsson, E., Simrén, M., Aldenborg, F., Almer, S., Olsson, R., 2006.
The AST/ALT ratio as an indicator of cirrhosis in patients with PBC. Liver Int.
26, 840–845. doi:10.1111/j.1478-3231.2006.01304.x

OMS, 2013. Mordeduras de serpiente [WWW Document]. Mordeduras Anim. URL
<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs373/es/>

Otero-Patiño, R., 2011. Epidemiología, Clínica y Terapéutica del Envenenamiento
Ofídico en Colombia, in: D'Suze, G., Corzo-Burgete, G.A., Paniagua-Solis,
J.F. (Eds.), Emergencias Por Animales Ponzosñosos En Las Américas.
Instituto Bioclón, Mexico D.F., p. 537.

Pereañez, J.A., Núñez, V., Huancahuire-Vega, S., Marangoni, S., Ponce-Soto,
L.A., 2009. Biochemical and biological characterization of a PLA2 from
crotoxin complex of *Crotalus durissus cumanensis*. Toxicon 53, 534–542.
doi:10.1016/j.toxicon.2009.01.021

Ponce-Soto, L.A., Martins, D., Novello, J.C., Marangoni, S., 2007. Structural and
biological characterization of two crotoxin isoforms IV-2 and IV-3 isolated
from the *Crotalus durissus cumanensis* venom. Protein J. 26, 533–540.
doi:10.1007/s10930-007-9094-z

Pook, C.E., 2001. Evolutionary biology of the Western rattlesnake, (Serpentes:
Viperidae: *Crotalus viridis*): phylogeny, morphology, and venom evolution.
University of Wales.

Pook, C.E., Wü, W., Thorpe, R.S., 2000. Historical Biogeography of the Western
Rattlesnake (Serpentes: Viperidae: *Crotalus viridis*), Inferred from

Mitochondrial DNA Sequence Information. *Mol. Phylogenet. Evol.* 15, 269–282. doi:10.1006/mpev.1999.0756

Portella Silveira, P.V., de Andrade Nishioka, S., 1992. South American rattlesnake bite in a Brazilian teaching hospital. Clinical and epidemiological study of 87 cases, with analysis of factors predictive of renal failure. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 86, 562–564. doi:10.1016/0035-9203(92)90114-R

Prado-Franceschi, J., Vital Brazil, O., 1981. Convulxin, a new toxin from the venom of the South American rattlesnake *Crotalus durissus terrificus*. *Toxicon* 19, 875–887. doi:10.1016/0041-0101(81)90085-4

Romero-Vargas, F.F., Ponce-Soto, L.A., Martins-de-Souza, D., Marangoni, S., 2010. Biological and biochemical characterization of two new PLA2 isoforms Cdc-9 and Cdc-10 from *Crotalus durissus cumanensis* snake venom. *Comp. Biochem. Physiol. - C Toxicol. Pharmacol.* 151, 66–74. doi:10.1016/j.cbpc.2009.08.011

Saldarriaga, M.M., Otero, R., Núñez, V., Toro, M.F., Díaz, A., Gutiérrez, J.M., 2003. Ontogenetic variability of *Bothrops atrox* and *Bothrops asper* snake venoms from Colombia. *Toxicon* 42, 405–411. doi:10.1016/S0041-0101(03)00171-5

Sanchez, E.F., Freitas, T. V., Ferreira-Alves, D.L., Velarde, D.T., Diniz, M.R., Cordeiro, M.N., Agostini-Cotta, G., Diniz, C.R., 1992. Biological activities of venoms from South American snakes. *Toxicon* 30, 95–103.

Saravia, P., Rojas, E., Arce, V., Guevara, C., López, J.C., Chaves, E., Velásquez, R., Rojas, G., Gutiérrez, J.M., 2002. Geographic and ontogenic variability in the venom of the neotropical rattlesnake *Crotalus durissus*: Pathophysiological and therapeutic implications. *Rev. Biol. Trop.* 50, 337–346.

Saviola, A.J., Pla, D., Sanz, L., Castoe, T.A., Calvete, J.J., Mackessy, S.P., 2015. Comparative venomomics of the Prairie Rattlesnake (*Crotalus viridis viridis*) from Colorado: Identification of a novel pattern of ontogenetic changes in venom composition and assessment of the immunoreactivity of the commercial

antivenom CroFab®. *J. Proteomics* 121, 28–43.

doi:10.1016/j.jprot.2015.03.015

Sunagar, K., Undheim, E.A.B., Scheib, H., Gren, E.C.K., Cochran, C., Person, C.E., Koludarov, I., Kelln, W., Hayes, W.K., King, G.F., Antunes, A., Fry, B.G., 2014. Intraspecific venom variation in the medically significant Southern Pacific Rattlesnake (*Crotalus oreganus helleri*): Biodiscovery, clinical and evolutionary implications. *J. Proteomics* 1–16. doi:10.1016/j.jprot.2014.01.013

Taborska, E., 1971. Intraspecies variability of the venom of *Echis carinatus*. *Physiol. Bohemoslov.* 20, 307–318.

Tu, A.T., Adams, B.L., 1968. Phylogenetic Relationships among Venomous Snakes of the Genus *Agkistrodon* from Asia and the North American Continent. *Nature* 217, 760–762.

Uetz, P., Hallermann, J., Hamburg, Z.M., 2016. THE REPTILE DATABASE [WWW Document]. URL <http://reptile-database.reptarium.cz/>

Valente, R.H., Novello, J.C., Marangoni, S., Oliveira, B., Pereira-Da-Silva, L., MacEdo, D. V., 1998. Mitochondrial swelling and oxygen consumption during respiratory state 4 induced by phospholipase A2 isoforms isolated from the South American rattlesnake (*Crotalus durissus terrificus*) venom. *Toxicon* 36, 901–913. doi:10.1016/S0041-0101(97)00107-4

Zambrano, P., Hoz, F. de la, Martínez, M., Pacheco, O., Quijada, H., 2014. Protocolo de Vigilancia en Salud Pública. *Ins.Gov.Co* 29.