

**DETERMINACIÓN DEL EFECTO NEFROTÓXICO EN RIÑÓN AISLADO DE RATA WISTAR INDUCIDO POR EL VENENO DE LA SERPIENTE *Bothrops rhombeatus* (GARCÍA, 1896) DEL VALLE GEOGRÁFICO DEL RÍO CAUCA EN COLOMBIA**



**MARY LUZ BUENO OSPINA**

**UNIVERSIDAD DEL CAUCA  
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES EXACTAS Y DE LA EDUCACIÓN  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA  
POPAYÁN  
2018**

**DETERMINACIÓN DEL EFECTO NEFROTÓXICO EN RIÑÓN AISLADO DE RATA WISTAR INDUCIDO POR EL VENENO DE LA SERPIENTE *Bothrops rhombeatus* (GARCÍA, 1896) DEL VALLE GEOGRÁFICO DEL RÍO CAUCA EN COLOMBIA.**

**Trabajo de grado para optar al título de Bióloga**

**MARY LUZ BUENO OSPINA**

**Director:**

**JIMMY ALEXANDER GUERRERO VARGAS, Ph. D.  
CO-DIRECTOR**

**ALEXANDRE HAVT BINDÁ, Ph. D.**

**Asesores:**

**JESSICA DAYANA GALINDEZ CERÓN, B.Sc.**

**ALEJANDRA VELASCO REYES, M.Sc.**

**UNIVERSIDAD DEL CAUCA  
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES EXACTAS Y DE LA EDUCACIÓN  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA  
POPAYÁN  
2018**

**Nota de aceptación**

---

---

---

---

Director \_\_\_\_\_

JIMMY ALEXANDER GUERRERO  
VARGAS, PhD.

Jurado \_\_\_\_\_

ASTRID LORENA URBANO CANO,  
PhD.

Jurado *Diana Lorena Mora Obando*

Diana Lorena Mora Obando,  
MSc.

Fecha y lugar de sustentación: Popayán, Abril de 2018

*Dedicatoria:*

*A mi Madre Alcira Espina, mi primer maestra.*

*“No debemos olvidar que cuando se descubrió el radio nadie sabía que iba a ser útil en hospitales. Era un trabajo de ciencia pura. Y ello es prueba de que el trabajo científico no debe considerarse desde el punto de vista de su uso directo. Se debe realizar por sí mismo, por la belleza de la ciencia y luego siempre existirá la posibilidad de que un descubrimiento científico se convierta, como el radio, en un beneficio para la humanidad.”*

*- Marie Curie*

## AGRADECIMIENTOS

- A Dios, por iluminarme, por ser mi guía en cada paso 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.
- A la Vicerrectoría Académica (VRA) de la Universidad del Cauca por apoyarme con parte de los recursos para mi viaje a Brasil, especialmente al Vicerrector Edgar Velásquez.
- 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 Universidad Federal de Ceará (UFC) por hacer posible la realización de mis experimentos y por velar por mi bienestar.
- Al laboratorio de toxicología molecular (LTM) de la UFC por acogerme y brindarme su conocimiento.
- Al Laboratorio de Farmacología de Venenos y Toxinas (LFAVET), de la UFC, por el apoyo al permitir el desarrollo de parte de mis experimentos.
- Al Biotério de la UFC, por su apoyo y por brindarme las instalaciones para la realización de los experimentos.
- A mi Director Jimmy Guerrero Vargas, por sus grandes aportes, colaboración, consejos, por su paciencia, por su apoyo para la realización de mi trabajo, por todas sus enseñanzas, por transmitir sus conocimientos, por su amistad.
- A mí Co-director Alexandre Havt Bindá, por compartir sus conocimientos y darme la oportunidad de desarrollar mis experimentos en la Universidad Federal de Ceará.
- A mi asesoras Jessica Dayana Galindez y Alejandra Velasco, por todo lo enseñado, su apoyo incondicional, su tiempo dedicado en la realización de este trabajo, sus consejos, por ayudarme en la construcción como profesional pero sobre todo por su amistad.
- A mis evaluadoras PhD. Lorena Urbano y MSc. Diana Mora por tomarse el tiempo de evaluar mi trabajo y por sus valiosos aportes.
- A mis compañeros en Brasil, Delvane, Roberta, João Vitor, Rafael, Natasha, Letícia, Pedro Mateus, Herlice, Mara, por su ayuda y consejos brindados en mis experimentos y por compartir sus conocimientos durante mi estancia en Fortaleza –Brasil.
- A la coordinadora del Biotério de UFC Gabriela, por su ayuda.

- A la Patóloga Ana Costa, por compartirme parte de su conocimiento y ayudarme con la lectura de las placas histológicas.
- A mi mamá una guerrera incansable, por luchar y estar cuando más la he necesitado, por enseñarme el valor de la vida, a mi padre por su apoyo incondicional y por enseñarme el valor del conocimiento, por brindarme amor.
- A mi hermano Luis Antonio por su apoyo y su cariño.
- A mi familia especialmente; Rubby, Dora y Obed, gracias por creer en mí.
- A mis grandes amigas Karen Ángel, Laura Gutiérrez, Katherine Bedoya, por su amistad incondicional, compañía, consejos, siempre ocuparán un lugar en mi corazón, siempre tendré una semilla positiva de ustedes en mí.
- A mis amigos y compañeros Paola Samboní, Karen Castillo, Jairo Gamboa, Juan Pablo Bonilla por compartir todo tipo de grandes experiencias, por su amistad y gran compañerismo.
- A mis compañeros y amigos monitores del CIBUC y GIHT; Karen, Daniela, Andrés, Angie, Yula, Valentina y Miguel por todas las buenas experiencias y la construcción de amistad durante los últimos años.
- A mis compañeros, por su apoyo y compañía durante la carrera.
- A dos grandes personas, Don Rodrigo y Doña Blanca, por su apoyo y cariño en el transcurso de la carrera.

## Contenido

RESUMEN .....	9
1 INTRODUCCIÓN.....	10
2 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	11
3 JUSTIFICACIÓN.....	12
4 OBJETIVOS.....	13
4.1 Objetivo general .....	13
4.2 Objetivos específico .....	13
5 MARCO TEÓRICO .....	14
5.1 Genero <i>Bothrops</i> .....	14
5.2 Veneno Botrópico.....	15
5.3 Estructura y función del riñón.....	17
5.4 Parámetros fisiológicos renales .....	19
6 ANTECEDENTES.....	21
7 MATERIALES Y MÉTODOS.....	24
7.1.1 Mantenimiento de animales.....	24
7.2 TIPO DE ESTUDIO .....	24
7.3 OBTENCIÓN DEL VENENO.....	24
7.3.1 Extracción del veneno .....	24
7.4 BIOMODELOS EXPERIMENTALES.....	25
7.5 COMITÉ DE ÉTICA.....	25
7.6 GRUPOS EXPERIMENTALES .....	25
7.6.1 Jaulas metabólicas .....	25
7.6.2 Perfusión renal.....	26
7.7 PRUEBAS EXPERIMENTALES.....	26
7.7.1 Jaulas metabólicas .....	26
7.7.2 Perfusión de riñón aislado .....	29
7.8 ANÁLISIS ESTADÍSTICO .....	33
8 RESULTADOS .....	34
8.1 Jaulas metabólicas.....	34
8.1.1 Ácido Úrico en Plasma .....	35

8.1.2	Ácido Úrico en Orina.....	35
8.1.3	Urea en Plasma .....	36
8.1.4	Proteína Urinaria.....	36
8.1.5	Creatinina en Orina.....	37
8.1.6	Depuración de Creatinina .....	38
8.1.7	Flujo Urinario .....	38
8.1.8	Histología de riñón en jaulas metabólicas .....	39
8.2	Perfusión renal .....	41
8.2.1	Presión de Perfusión .....	42
8.2.2	Resistencia Vascular Renal.....	42
8.2.3	Flujo urinario.....	43
8.2.4	Ritmo de Filtración Glomerular .....	43
8.2.5	Porcentaje de Transporte de Sodio .....	44
8.2.6	Porcentaje de Transporte de Potasio .....	44
8.2.7	Porcentaje de Transporte de Cloro.....	45
8.2.8	Histología de riñón perfundido.....	46
9	DISCUSIÓN.....	50
10	CONCLUSIONES.....	60
11	RECOMENDACIONES .....	61
12	BIBLIOGRAFÍA.....	62

## RESUMEN

En Colombia existe una gran diversidad de serpientes, donde el 17% de especies son venenosas. El género *Bothrops* causa el 95% de los accidentes ofídicos en el país según el Sistema Nacional de Vigilancia en Salud Pública-SIVIGILA. Entre los factores agravantes del accidente ofídico está el difícil acceso y/o desconocimiento de su tratamiento en los centros de salud, esto puede con llevar al desarrollo de diferentes patologías. Las nefropatías son una de las afecciones más comunes después de un accidente ofídico, el sistema renal puede comprometerse seriamente y producir fallo renal en humanos; por lo anterior, el objetivo central de este trabajo fue identificar la acción del veneno de la serpiente *Bothrops rhombeatus* localizada en el valle geográfico del río Cauca, mediante un sistema *in vivo* de jaulas metabólicas, donde se colectó orina y sangre 24 horas después de la inoculación (I.P) del veneno en ratas Wistar en tres grupos de tratamiento de n= 8 (3 dosis de la DL<sub>50</sub> 25%, 50% y 75%) y 3 grupos control de n=8, en los cuales no se encontraron alteraciones significativas en los parámetros de ácido úrico, creatinina, proteína urinaria, depuración de creatinina, flujo urinario, pero se presentó un cambio significativo en el parámetro renal de urea en la dosis correspondiente al 50% de la DL<sub>50</sub>, y un segundo sistema *in vitro* en el que se realizó la perfusión de riñón aislado de ratas Wistar, con un grupo experimental de n=5 y se evaluaron diferentes parámetros renales a los 30 (control interno sin veneno), 60, 90 y 120 minutos (solución perfusora con 1 mg de veneno de *B. rhombeatus*), los resultados muestran una disminución significativa en la presión de perfusión (PP), la resistencia vascular renal (RVR), el porcentaje transportado (%T ) Na<sup>+</sup>, Cl<sup>-</sup> y un aumento significativo en el flujo urinario FU y el ritmo de filtración glomerular (RFG). En ambos sistemas, a través de histopatología, se determinaron daños del tejido renal; en las jaulas metabólicas se observó focos de vacuolización del epitelio tubular y áreas de degeneración del revestimiento tubular y en el ensayo de perfusión renal se observaron cilindros hialinos, aumento del espacio de Bowman, descamación de túbulos y glomérulos y procesos necróticos (picnosis, cariólisis, cariorrexis), lo anterior sugiere que el veneno de *B. rhombeatus* a nivel *ex vivo* ocasiono IRA, reflejada en las alteraciones de los parámetros e histología y a nivel *in vivo* tiene un efecto indirecto sobre el riñón reflejado en las alteraciones histológicas y no en los parámetros renales.

## 1 INTRODUCCIÓN

Existen más de 3 000 especies de serpientes distribuidas por todo el mundo y solo la sexta parte de estas son venenosas; Colombia cuenta con aproximadamente 8 familias, 71 géneros y 272 especies, de las cuales 49 especies son venenosas y pertenecen a dos familias (Viperidae, Elapidae) y nueve géneros (Wallach, 2014; Lancet, 2017). La familia Viperidae incluye géneros de serpientes como *Lachesis*, *Crotalus*, *Porthidium*, *Bothriechis*, *Bothriopsis*, *Bothrocophias*, *Bothrops*, siendo este último género el causante de la mayoría de envenenamientos (Lynch, 2012). En el departamento del Cauca tres especies son consideradas como las causantes de la mayoría de los casos de ofidismo: *Bothrops ayerbei* (43%), *Bothrops rhombeatus* (27%) y *Bothrops asper* (8%) (Ayerbe & Rodríguez, 2008; Nuñez León, 2016).

En el 2017 la Organización Mundial de la Salud (OMS), clasifica al ofidismo como una enfermedad tropical desatendida, se estima que cada año, más de 95 000 personas mueren por mordedura de serpiente, y otras 300 000 sobreviven pero desarrollan una enfermedad clínica grave después del accidente ofídico (The Lancet, 2017).

El accidente botrópico es uno de los accidentes más comunes en Colombia, sus síntomas varían de acuerdo con el grado de envenenamiento, desde 0-4 (ausente, leve, moderado, severo), siendo el último el más grave. Entre los síntomas locales se destacan edema, mionecrosis, dermonecrosis, hemorragia, formación de ampollas y alteraciones sistémicas tales como sangrado, coagulopatías, efectos hemodinámicos e insuficiencia renal aguda (IRA) que empeoran la gravedad del accidente y en ocasiones conducen a la muerte (Cardoso & França, 2003; Ayerbe & Latorre, 2010).

La IRA, es una de las complicaciones sistémicas más frecuentes después de un accidente ofídico por *Bothrops*. A nivel renal, se presenta una disminución de la filtración glomerular por hipovolemia, glomerulonefritis hemorrágica, necrosis tubular aguda, necrosis cortical bilateral, nefrosis hemoglobinúrica y mioglobulinuria, complicaciones que pueden llevar a la muerte del paciente (Otero *et al.*, 1992; Incio & Incio, 1993; Machado *et al.*, 2008; Sifuentes *et al.*, 2008; Linardi *et al.*, 2011). Sin embargo, la sintomatología y los efectos pos envenenamiento varían de acuerdo a la especie de serpiente; por lo que es relevante indagar más acerca de los cuadros clínicos presentados por los pacientes víctimas de accidente ofídico y en particular sobre el daño renal, a fin de esclarecer este efecto sistémico causado por envenenamientos de especies del género *Bothrops*, aportar al conocimiento fisiopatológico renal pos ofidismo en Colombia, y contribuir con el mejoramiento del tratamiento clínico.

## 2 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Anualmente en el mundo se presentan alrededor de 5.400.000 de accidentes ofídicos, de los cuales el 50% resulta en envenenamiento y el 2,5% en muerte. Para Latinoamérica se estiman 150.000 accidentes ofídicos y la muerte de 5.000 personas por esta causa (Walteros & Paredes, 2014). En Colombia se notificaron al **Sistema Nacional de Vigilancia en Salud Pública- SIVIGILA** hasta la semana 48 de 2017 un total de 5066 casos, de los cuales, 104 fueron registrados en el departamento del Cauca, la proporción promedio de accidentalidad nacional fue de 97.4 casos por semana (León-Nuñez & Rojas, 2017).

Los accidentes ofídicos son comunes en regiones tropicales como Colombia; sin embargo gran parte de la información de este tipo de accidentes es desconocida debido al sub-registro o al manejo empírico que se les da (Ayerbe & Rodríguez, 2008; Portilla *et al.*, 2014). En Colombia, el accidente ofídico constituye un problema de salud pública que tiene mayor incidencia en la zona rural, de difícil acceso a las instituciones de salud, donde se ha observado desconocimiento del diagnóstico y tratamiento del ofidismo, así como un inadecuado manejo de los sueros antiofídicos (Sarmiento, 2012)

Tres géneros de la familia Viperidae: *Lachesis*, *Bothrops* y *Crotalus* son los responsables del 99% de los accidentes ofídicos en el país (Pinho & Burdmann, 2008). El envenenamiento bothrópico es catalogado como uno de los más graves y frecuentes, ya que representa el 95% según los reportes del **SIVIGILA**. Una de las complicaciones o efectos más graves que produce el envenenamiento ocasionado por serpientes del género *Bothrops* es la insuficiencia renal aguda (IRA) (Perez & Coppo, 2004; Ayerbe & Latorre, 2010), además se observan otros efectos entre los que se destacan la alteración de la coagulación sanguínea e hipotensión arterial (Incio & Incio, 1993). Al ser el género *Bothrops*, el principal responsable de la afectación renal en el accidente ofídico en América del Sur (Albuquerque *et al.*, 2013), es importante describir el efecto nefrotóxico que produce, debido a que el riñón es un órgano sensible a las sustancias tóxicas por su gran vascularización y su propia función como depurador de sustancias (Cetina, 2012). Aunque se conocen las manifestaciones sistémicas y locales junto con hallazgos paraclínicos que sugieren una afectación renal por el veneno del género *Bothrops*, existen pocos estudios vinculados directamente a la serpiente *B. rhombatus* del valle geográfico del río Cauca, cuya posición taxonómica aún no está dilucidada por completo. Por lo tanto, es fundamental investigar acerca de los efectos directos producidos por el veneno sobre el riñón, y generar herramientas para el manejo de las alteraciones renales como la insuficiencia renal aguda,

siendo esta una de las principales causas de muerte después de un accidente ofídico (Oliveira *et al.*, 2013a).

### 3 JUSTIFICACIÓN

Aunque las fallas renales cobran una importancia significativa después de un accidente ofídico es poco lo que se reporta acerca de la acción del veneno de diferentes géneros y especies de serpientes a nivel renal. Actualmente el accidente ofídico es un problema de salud, considerado como una enfermedad desatendida por la Organización Mundial de la Salud, que solo hasta el año 2004, a través de la circular 092, fue considerado de reporte obligatorio por el Ministerio Nacional de Salud de Colombia (Castrillón-Estrada *et al.*, 2007; Ayerbe & Rodríguez, 2008; Portilla *et al.*, 2014; Walteros & Paredes, 2014), Dada la relevancia del ofidismo, el Ministerio Nacional de Salud procura implementar diseños de mejoramiento para el tratamiento del accidente ocasionado por los diferentes géneros de serpientes, con el fin de disminuir la morbi-mortalidad a nivel nacional (Zambrano, 2012).

La insuficiencia renal aguda es una de las complicaciones sistémicas más frecuentes después de un accidente ofídico por *Bothrops*; el envenenamiento botrópico ocasiona alteraciones locales como edema, hemorragia, necrosis muscular, y sistémicas como los trastornos de la coagulación. Existen diversos estudios que han reportado una disminución de la filtración glomerular por hipovolemia, glomerulonefritis hemorrágica y proliferativa, necrosis tubular aguda por nefrotoxinas, choque prolongado o daño vascular, necrosis cortical bilateral, nefrosis hemoglobinúrica y mioglobulinuria; desencadenando insuficiencia renal aguda que podría llevar a la muerte del paciente (Otero *et al.*, 1992; Incio & Incio, 1993; Machado *et al.*, 2008; Sifuentes *et al.*, 2008; Linardi *et al.*, 2011).

Debido a los daños a nivel renal que se han reportado durante el accidente botrópico es de vital importancia conocer los efectos directos e indirectos causados por el veneno de las diferentes especies de serpientes colombianas con el fin de conocer si existen diferencias sintomatológicas locales y sistémicas entre los diferentes venenos, actualmente no se toma en cuenta las diferencias entre sintomatologías en la aplicación del tratamiento en contra del accidente ofídico, es por ello que las entidades de salud implica acciones y esfuerzos encaminados hacia el mejoramiento del estado de salud de la población colombiana y el goce efectivo del derecho a la salud requiere del aumento del acceso, del mejoramiento de la calidad de los servicios y del aumento de conocimiento sobre el origen de diferentes enfermedades causantes de mortalidad como lo es el accidente ofídico (Departamento Nacional De Planeación, 2011); al no existir estudios referentes al

efecto nefrotóxico de la serpiente *B. rhombeatus* del valle geográfico del río Cauca, se hace necesario incursionar y cerrar la brecha de desconocimiento sobre esta temática, con el fin de aportar a modelos de salud nacional en el mejoramiento del tratamiento por accidente ofídico y brindar una adecuada y precisa atención médica, cumpliendo así con el objetivo de Plan Nacional de Salud Pública sobre atención y prevención de los principales factores de riesgo para la salud y la promoción de condiciones y estilos de vida saludables como lo establece La Ley 1122 de 2007 (El Congreso de la República de Colombia, 2007).

## **4 OBJETIVOS**

### **4.1 Objetivo general**

- Determinar el efecto nefrotóxico generado por el veneno de la serpiente *B. rhombeatus* (García, 1896) del valle geográfico del río Cauca, empleando sistemas de jaulas metabólicas y perfusión renal en ratas Wistar.

### **4.2 Objetivos específico**

- Identificar las alteraciones a nivel renal generadas por el veneno de la serpiente *B. rhombeatus* del valle geográfico del río Cauca a través de biomarcadores como: ácido úrico, urea, creatinina, depuración de creatinina, proteína urinaria.
- Establecer las alteraciones funcionales en riñón aislado, generadas por el veneno de la serpiente *B. rhombeatus* del valle geográfico del río Cauca, a partir de parámetros como: presión de perfusión, resistencia vascular renal, tasa de filtración glomerular, flujo urinario y transporte de electrolitos de sodio, potasio, cloro.
- Identificar alteraciones histológicas causadas por el veneno de la serpiente *B. rhombeatus* del valle geográfico del río Cauca en sistemas *in vivo* y *ex vivo*.

## 5 MARCO TEÓRICO

### 5.1 Género *Bothrops*

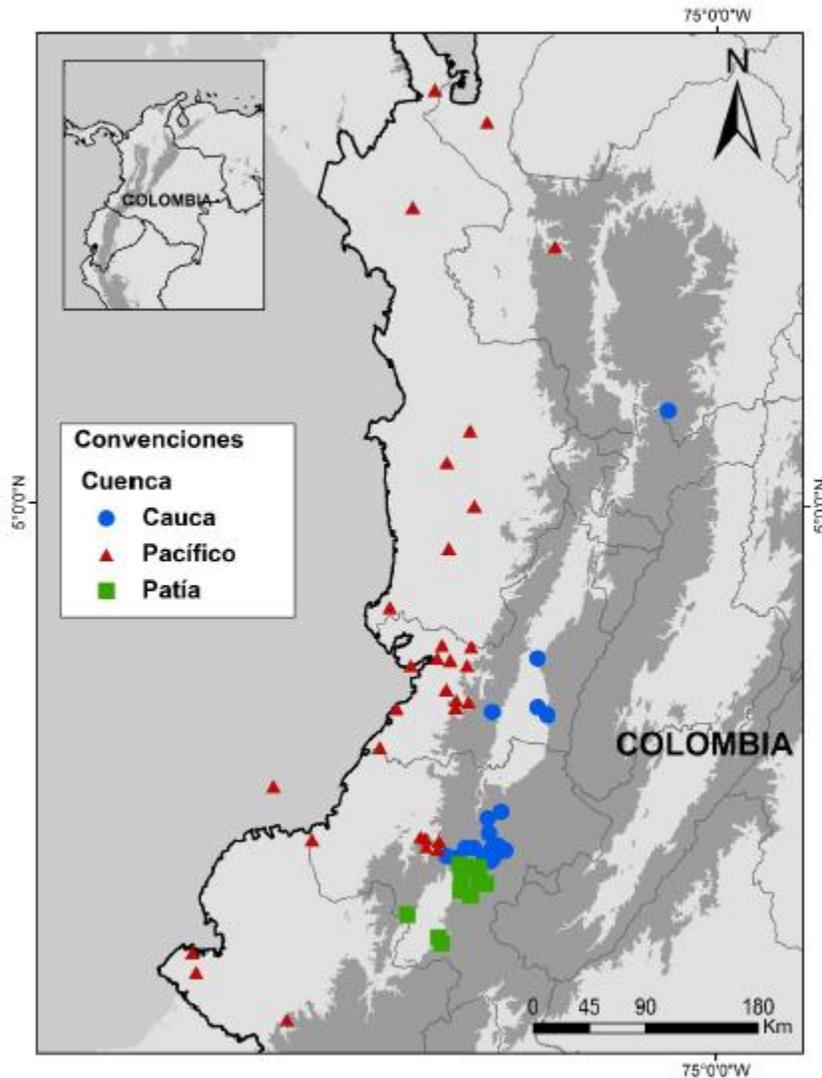
El género *Bothrops* está conformado por 37 especies distribuidas desde México hasta Argentina (Campbell & Lamar, 2004). El tamaño de ejemplares adultos fluctúa entre 1,5 y 2,2 metros, cuerpo cilíndrico, largo y grueso, cabeza en forma triangular (Figura 1A), ojos del mismo color de la cara, pupila elíptica y una escama grande supra-ocular, tienen fosas termo-receptoras, su cabeza puede poseer configuración más ancha o alargada, con diseño supra-cefálico o no (Figura 1C), se ha encontrado especímenes con colmillos de 2,8 cm; son solenoglifos (Figura 1B), poseen el aparato venenoso mejor desarrollado y por lo tanto son mayores productoras de veneno (Patiño, 2002), pueden presentar sobre el dorso manchas en forma triangular, cuando se unen por sus vértices en la línea media dorsal forma una equis, de ahí su nombre común (Folleco, 2010).



**Figura 1.** Especimen adulto de *B. rhombeatus*. **A.** Vista dorsal, **B.** Colmillos solenoglifos; **C.** Vista dorsal de la cabeza. Cortesía: Centro de Investigaciones Biomédicas de la Universidad del Cauca-CIBUC (Fotografía: Liévano-Bonilla, 2017).

*B. rhombeatus* habita desde 950 hasta 2600 m.s.n.m, en zonas de selva neotropical inferior y selva subandina ubicadas desde el divorcio de aguas de los Ríos Patía y Cauca hasta la región norte del país denominada “La Mojana” en los departamentos de Antioquia, Caldas, Risaralda Bolívar y Córdoba (Wallach, 2014; Liévano-Bonilla, 2016). La serpiente *B. rhombeatus* se encuentra aislada de *B. asper* por la cordillera central y occidental (Figura 2), lo que ha ocasionado que

tengan un posible flujo génico diferente, esto llevó a concluir a una parte de la comunidad científica que existe una división de estas serpientes como especies (Folleco, 2010), mientras que otra parte de la comunidad científica la considera como una población aislada de *B. asper* ya que las variabilidades morfológicas dificultan la discriminación entre poblaciones, indicando que corresponden a una misma especie, e indicando que la variación fenotípica a nivel geográfico está relacionada a la ecología y hábitat de cada población (Liévano-Bonilla, 2016).



**Figura 2.** Mapa de distribución de *B. asper* (Pacífico), *B. ayerbei* (Patía) y *B. rhombeatus* (Cauca). Imagen extraída de (Liévano-Bonilla, 2016)

## 5.2 Veneno botrópico

Con frecuencia los envenenamientos causados por *Bothrops* afectan la hemostasia e inducen a un síndrome de desfibrinación. El principio tóxico son enzimas del tipo trombina, proteasas, hidrolasas y esterases, las cuales tienen un

efecto coagulante, hemorrágico y/o necrotizante. Entre las alteraciones que puede generar esta la insuficiencia renal que pueden conllevar a la muerte de la víctima (Maruñak, 2006). Existen variaciones cuantitativas en el efecto proteolítico no sólo entre especies, sino que también se observan diferencias al comparar los venenos de ejemplares de distintas zonas geográficas dentro de una misma especie. Un ejemplo de esta variación cuantitativa intraespecífica e interespecífica manifestada son los venenos de *Lachesis muta* y *Bothrops asper* donde no solo presentan variaciones toxinológicas si no también inmunológicas.

Hasta el momento se han realizado un par de estudios sobre las actividades biológicas del veneno de *B. rhombeatus*; se evaluó la neutralización de la acción del veneno en ratones con el extracto etanólico de *Piper auritum* y el suero de la sangre de *Didelphis marsupialis*, gracias a estos estudios se ha dado un acercamiento a los posibles componentes del veneno (Muñoz, 2016; Rengifo-Rios, 2017) pero no se han realizado estudios específicos sobre la proteómica del veneno de esta serpiente; sin embargo para especies como *B. asper* y *B. ayerbei*, distribuidas también en el departamento del Cauca, se ha realizado estudios a nivel proteómico.

En *Bothrops ayerbei* predominan proteínas como metaloproteinasas (SVMP, 53,7%), fosfodiesterasas (PDE, 0,7%), serina proteinasas (SP, 9,3%) y péptidos potenciadores de bradiginina (BPP, 8,3%) y se encuentran componentes menos abundantes como fosfolipasas A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>, 0,7%), lectinas de tipo C (CTL, 10,1%), proteínas secretoras ricas en cisteína (CRISP, 1,1%), L-aminoácido oxidasas (LAO, 3,3%), desintegrinas (DIS, 2,3%), otros péptidos (PEP, 8,7%) y factores de crecimiento (NGF, 0,1%) (Mora-Obando *et al.*, 2014). El veneno de adultos de *B. asper* de la región del Pacífico de Costa Rica está conformado por fragmentos desintegrina / rico en cisteína tipo PIII (DC, 0,1%), metaloproteinasas (SVMP, 44,0%), lectinas de tipo C (C-lectina, 0,5%); fosfolipasas A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>, 45,1%); proteínas secretoras ricas en cisteína (CRISP, 0,1%); L-aminoácido oxidasas (LAO, 4,6%), serina proteínasa (SP, 4,4%) (Alape-Girón *et al.*, 2008; Angulo & Lomonte, 2009).

En general, la composición de los venenos de *B. ayerbei* y *B. asper* del departamento del Cauca son similares, pero existe variación en la abundancia de algunos componentes, aspecto que se refleja en las actividades biológicas que producen. Las metaloproteinasas son las proteínas más abundantes, con un 53% y 44% respectivamente en estas serpientes; se conoce que las metaloproteinasas de tipo uno (SVMPs P-I), causan una reducción de la actividad hemorrágica y SVMPs P-III que incluyen dominios desintegrina y ricos en cisteína, actúan esencialmente como potentes toxinas hemorrágicas. También se observan diferencias significativas en la abundancia de fosfolipasas A<sub>2</sub>, con un porcentaje

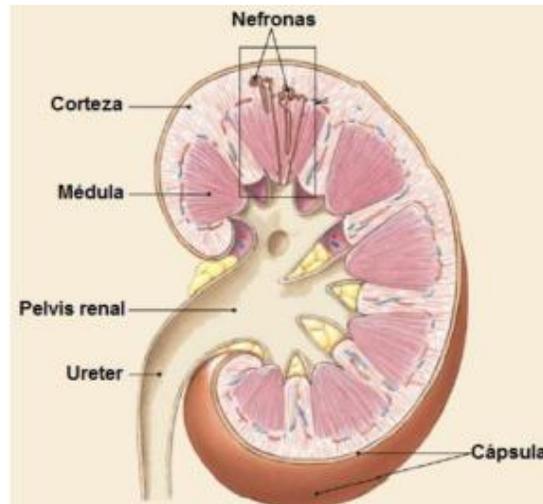
de 0.7% para *B. ayerbei* y 45% *B. asper*, lo que se traduce en un escaso efecto mitotóxico producido por el veneno de *B. ayerbei* (Alape-Girón *et al.*, 2009; Angulo & Lomonte, 2009; Mora-Obando *et al.*, 2014).

(Lomonte & Gutiérrez, 1983). El veneno de *B. asper* del Caribe se considera hemorrágico y mionecrótico, mientras que el de *B. asper* del Pacífico es más proteolítico; sin embargo actividades biológicas como la letalidad, actividad edematizante y efecto hemolítico son similares; adicionalmente se ha observado variación intraespecífica a nivel ontogénico, entre adultos y neonatos de las dos regiones (Gutiérrez, Chaves, & Bolaños, 1980). Se estima que la similitud de las proteínas del veneno de *B. asper* del Caribe y *B. asper* del Pacífico es solo del 52%, las diferencias de composición entre los venenos de las diferentes regiones geográficas pueden deberse a la presión ambiental evolutiva que actúa sobre las poblaciones aisladas (Coates & Obando, 1996; Alape-Girón *et al.*, 2008).

### **5.3 Estructura y función del riñón**

En general, la función del riñón es mantener la homeostasia del medio interno. El riñón mantiene el medio interno adecuado, tanto en composición como en volumen, gracias a tres grupos de funciones: (1) depuración, mediante filtración glomerular y secreción tubular, (2) regulación, mediante secreción y reabsorción tubular, (3) funciones hormonales y metabólicas realizadas por el propio riñón (Botella, 2002).

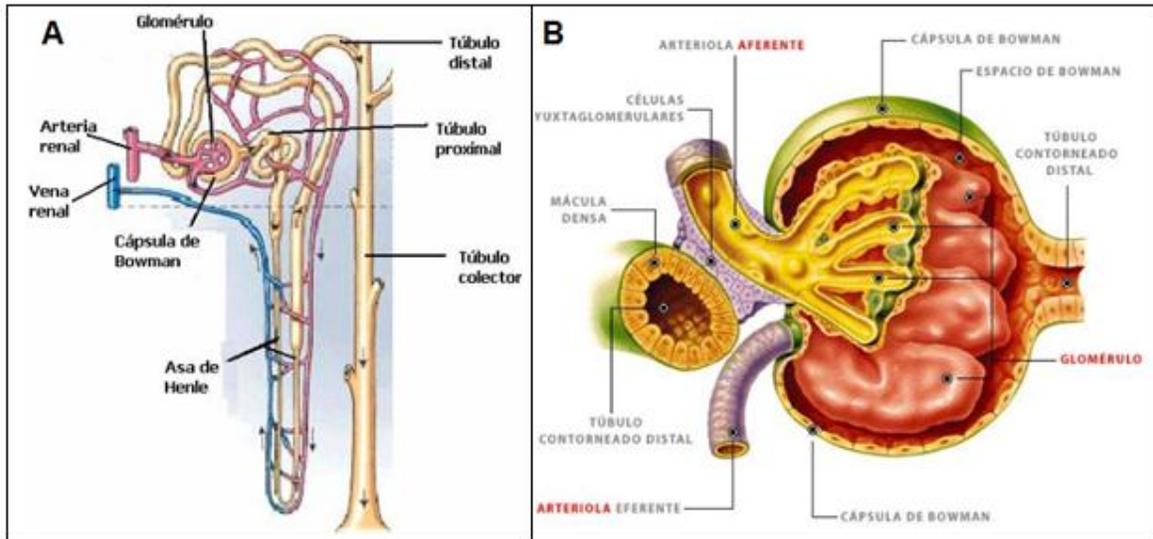
A nivel macroscópico, el riñón puede dividirse en dos grandes áreas: la corteza renal y la médula renal. La corteza contiene los glomérulos, los tubos contorneados proximales y distales, y las arterias interlobulillares y peritubulares (Figura 3). La médula contiene las asas de Henle, los tubos colectores y la *vasa recta*. La corteza tiene toda ella una osmolaridad semejante a la de la sangre, unos 280 mOs/l; en cambio, la médula presenta una osmolaridad que se incrementa progresivamente, desde su unión con la corteza hasta la papila, pasando de los 280 mOs/l de la corteza a los 1200 de la papila. La sangre llega al riñón por la arteria renal, que nace de la aorta y se subdivide después en las arterias interlobulares, arqueadas e interlobulillares; de ésta emerge la arteriola aferente que forma el ovillo capilar glomerular. Estos capilares se reúnen en la arteriola eferente, que continúa alrededor de los tubos contorneados formando la red peritubular (Martínez *et al.*, 1993; Botella, 2002; Avendaño, 2009).



**Figura 3.** Sección transversal, riñón dividido en corteza (externa) y médula (interna). Imagen modificada de (Silverthorn, 2010)

La unidad funcional del riñón es la nefrona (Figura 4A). En cada riñón existen aproximadamente un millón de nefronas. Cada nefrona se divide en cuatro elementos: el glomérulo, el tubo proximal, el tubo distal y el colector. El glomérulo es un ovillo de capilares, formado por la división de la arteriola aferente, que posteriormente se vuelve a reunir formando la arteriola eferente. El ovillo glomerular que está dentro de la cápsula de Bowman, entre los capilares, se llama *espacio urinoso*. Las arteriolas aferente y eferente entran y salen del glomérulo una al lado de la otra, formando un ángulo, en el llamado polo *vascular del glomérulo*; generalmente, en el lado opuesto está el polo tubular, donde comienza el tubo renal proximal. El tubo renal proximal se subdivide en dos partes: el tubo contorneado proximal, de gran actividad bioquímica, que discurre en su totalidad por la corteza renal, y el asa de Henle, con forma de horquilla, que desciende en línea recta desde la corteza casi hasta la papila donde describe una inflexión y asciende. En este punto se considera que comienza el tubo distal, el cual asciende en línea recta hasta la corteza, llegando a un punto entre las arteriolas aferente y eferente del mismo glomérulo que origina el tubo; la parte descendente del asa de Henle, entre las arteriolas, el tubo distal, adopta una forma muy característica, la *mácula densa* (Figura 4B), llamada así porque los núcleos de las células tubulares son muy evidentes y dan una imagen de gran densidad; después, continúa por el túbulo contorneado distal; todo él discurre por la corteza para dirigirse finalmente a la médula renal y transformarse en el túbulo colector. Varios tubos colectores se van uniendo hasta terminar en la papila renal y drenar la orina en los cálices. También debe considerarse el aparato yuxtglomerular, que está formado por el conjunto de arteriola aferente y eferente y la *mácula densa*, ya que es un punto

clave donde, seguramente, se regula el balance glomerulotubular (Botella, 2002; Avendaño, 2009).



**Figura 4. A.** Partes de una nefrona; **B.** Corpúsculo renal. Imagen extraída de (Aranalde, 2015).

#### 5.4 Parámetros fisiológicos renales

La función renal puede estudiarse mediante el análisis preciso y detallado de la orina y determinados exámenes sanguíneos, evaluando parámetros renales que determinan el adecuado funcionamiento del riñón, las variaciones de los parámetros indican alteraciones fisiológicas generalmente importantes, que sugieren nefropatías (Pinho & Burdmann, 2008). Los siguientes son parámetros de alteraciones renales:

**Presión de perfusión (PP);** está determinada por la presión media en la arteria renal y el estado contráctil del músculo liso de las arteriolas renales de la corteza (M. Martínez *et al.*, 1993).

**Flujo urinario (FU);** es el volumen de la orina por unidad de tiempo de recogida y se mide en mL/min (Avendaño, 2009).

**Tasa de filtración glomerular (TFG);** el volumen de filtrado formado por unidad de tiempo (Botella, 2002).

**Resistencia vascular renal (RVR);** la resistencia se determina por la viscosidad de la sangre, las longitudes y los radios de los vasos sanguíneos del órgano (Martínez *et al.*, 1993).

**% iones excretados (Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Cl<sup>-</sup>);** porcentaje de iones encontrados en el fluido urinario. Sodio y cloro son excretados en forma de sal, a diferencia del potasio que es excretado en forma de ion (K<sup>+</sup>). La reabsorción de estos iones se da en el túbulo distal y proximal (Martínez *et al.*, 1993).

**Creatinina;** la creatinina es derivada del metabolismo de la creatina del músculo, es decir el producto final, por degradación enzimática, sólo 2% de ella es convertida cada día a creatinina y excretada por la orina. La excreción de creatinina es proporcional a la masa muscular y es relativamente constante en cada individuo (Bhowmik, 2011).

**Urea;** es el principal producto final del metabolismo proteico. Es formado en el hígado por hidrólisis de la arginina por efecto de la arginasa. Es libremente filtrada por el glomérulo y reabsorbida (60%) por el túbulo proximal, principalmente a nivel colector. El 90% de la urea excretada por el organismo corresponde a los riñones, y el 10% restante, al tubo digestivo. Los valores de urea se elevan en insuficiencia renal sólo después de una reducción sustancial de la velocidad de filtración glomerular (Athappan, 2008).

**Depuración de creatinina;** debido a la secreción de creatinina, el aclaramiento de creatinina es ligeramente más alto que el ritmo de filtración glomerular. La fracción segregada es normalmente de alrededor de 10-20% de lo que se excreta, por lo que el aclaramiento de creatinina medido sobrestima la filtración glomerular en el mismo porcentaje (Botella, 2002).

**Proteína urinaria o albúmina;** la micro-albuminuria, un signo de alerta temprana de enfermedades glomerulares, se asocia con varios factores de riesgo como la hipertensión, la hiperlipidemia, la diabetes mellitus pero es un indicador de la enfermedad renal crónica (Botella, 2002).

## 6 ANTECEDENTES

Teniendo en cuenta las complicaciones sistémicas y locales producidas por el envenenamiento por serpientes de la familia Viperidae, las cuales incluyen alteraciones renales, se han realizado diferentes estudios que han contribuido a una adecuación del modelo del tratamiento del accidente ofídico. Actualmente existen diversos estudios sobre el género *Bothrops* respecto al efecto nefrotóxico causado por la inoculación de veneno, pero ninguno sobre la serpiente *B. rhombeatus* aislada geográficamente en el valle geográfico del río Cauca.

Havt y colaboradores en el 2001, evaluaron los efectos del veneno de *Bothrops jararacussu* en riñón aislado de rata cepa Wistar a concentraciones de 3,10 y 30  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Encontraron que las alteraciones más severas se presentaron en el mayor tiempo transcurrido y con la mayor concentración. En la concentración de 30  $\mu\text{g}/\text{mL}$  a los 120 minutos, se encontró que la presión de perfusión (PP) y la resistencia vascular renal (RVR) disminuyen drásticamente mientras que la filtración glomerular (GFR) y el flujo urinario (FU) aumentan significativamente y por el contrario el porcentaje de transporte tubular de sodio (%Na<sup>+</sup>) y potasio (%K<sup>+</sup>) decrecen.

Perez y Coppo, en el 2004, realizaron un estudio sobre el efecto a nivel renal del veneno de *Bothrops neuwiedii diporus* en ratas macho Wistar vía intramuscular en el músculo gastrocnemio con 700  $\mu\text{g}$ . Los tiempos de exposición al veneno fueron de 3, 6, 12 y 24 horas, 1 y 4 semanas. Se hicieron extracciones de sangre de la vena cava posterior y se evaluaron los parámetros creatina- fosfoquinasa (CK), urea, creatinina, fósforo, calcio. Cortes histológicos demostraron daños renales, entre 3 y 6 horas, apareció degeneración hidrópica en las células epiteliales de los túbulos proximales y congestión renal. A las 24 horas, se observó necrosis difusa del epitelio tubular acompañada por daño glomerular. A la cuarta semana se encontró tumefacción de células del epitelio tubular sin daño glomerular.

Barbosa y colaboradores en el 2005 evaluaron el efecto nefrotóxico de la miotoxinas I (BthTx-I; Lys 49) y II (BthTX-II; Asp 49) del veneno de *Bothrops jararacussu* en riñón de rata aislado perfundido. Se encontró que al inocular 5 mg/ml miotoxina I (BthTx-I) y II (BthTX-II) aumenta la presión de perfusión (PP), la resistencia vascular renal (RVR), el flujo urinario (FU) y la filtración glomerular (GFR) mientras que decrece el porcentaje del transporte tubular de sodio (%TNa<sup>+</sup>) y potasio (%TK<sup>+</sup>).

Machado y colaboradores en el 2008, aislaron la fosfolipasa (PLA<sub>2</sub>) del veneno de *Bothrops insularis* a fin de determinar su efecto renal en riñón de rata cepa Wistar aislado perfundido. Se midió la presión de perfusión (5 min), se realizaron

exámenes de orina para analizar el equilibrio  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  y se hicieron cortes de histopatología donde se observó necrosis tubular aguda. Se obtuvo una alta PP, RVR, FU y GFR y una baja reabsorción tubular de sodio ( $\% \text{TNa}^+$ ) y cloro ( $\% \text{TCl}^-$ ) a los 120 minutos sin ninguna alteración en el porcentaje de transporte de potasio.

Reyes, (2009) evaluó las alteraciones en riñones de ratas, inoculando  $2.1 \mu\text{g/g}$  de veneno de la serpiente *B. asper* por vía intraperitoneal (I.P.); los tiempos de exposición al veneno fueron 1, 48, 96, 144 y 288 horas. Después de la primera hora, la histología mostró glomérulos congestionados con tumefacción, a las 48 horas glomerulonefritis, a las 96 horas colapso glomerular, a las 144 horas se observó glomerulonefritis membranosa y proliferativa, finalmente a las 288 horas se observó la desaparición de la cápsula de Bowman y la estructura total del glomérulo.

Dos años más tarde, en el 2011, Linardi y colaboradores realizaron un estudio donde se evaluaron las alteraciones y cambios a nivel renal, por medio de histología y parámetros funcionales de  $\text{Na}^+ / \text{K}^+ \text{-ATPasa}$  causados por el veneno de *Bothrops alternatus*. Se utilizaron ratas Wistar inoculándoles veneno ( $0.8 \text{ mg / kg}$ ). La función renal se evaluó 6, 24, 48, 72 horas y 7 días post inyección del veneno. A nivel histopatológico se encontraron alteraciones como lobulación de penachos capilares, dilatación del espacio capsular de Bowman e interrupción de F-actina en la cápsula de Bowman. La excreción de sodio y potasio aumentó, en contraste disminuyó la reabsorción de sodio proximal y se redujo transitoriamente la tasa de filtración glomerular (GFR).

En el año 2013, Oliveira y colaboradores tuvieron como objetivo investigar los efectos del veneno de *Bothrops leucurus* en el sistema de perfusión renal y en células tubulares renales cultivadas del MDCK (Madin-Darby Canine kidney). El veneno ( $10 \text{ mg / ml}$ ) redujo la presión de perfusión (PP) a los 90 y 120 minutos, mientras que la resistencia vascular renal (RVR) decreció a los 120 minutos, el efecto sobre el flujo urinario (FU) y la tasa de filtración glomerular (TFG) comenzó 30 minutos después de la inoculación del veneno, fue transitoria y volvió a la normalidad a los 120 min de la perfusión; también se observó una disminución en el transporte tubular porcentual de sodio ( $\% \text{TNa}^+$ ) a los 120 minutos y de cloruro ( $\% \text{TCl}^-$ ) a los 60 y 90 min.

En Colombia, específicamente en el departamento del Cauca, se han realizado dos estudios a nivel nefrotóxico con las especies del género *Bothrops*, *B. asper* y *B. ayerbei*, mencionadas previamente. El primer estudio fue realizado por Velasco en el 2013, quien evaluó la nefrotoxicidad del veneno de *B. ayerbei* en ratas Wistar y ratones *Mus musculus*. Los resultados *ex vivo* mostraron disminución del transporte de sodio ( $\% \text{TNa}^+$ ), presión de perfusión (PP) a los 60, 90 y 120 minutos y de la resistencia vascular renal (RVR) a los 60 y 90 minutos, un incremento del

flujo urinario (FU) a los 90, 120 minutos y de la tasa de filtración glomerular (GFR) a los 120 minutos en donde los primeros 30 minutos fueron de control (sin veneno). En el sistema *in vivo* 24 horas pos veneno (tratamientos de 25, 50 y 75% de la DL<sub>50</sub>) se encontró que el tratamiento del 75% tuvo un incremento en la depuración de creatinina. Para el 2017 (Velasco-Reyes) se realiza un experimento *in vivo* esta vez con ratas, con el tratamiento del 75% de la DL<sub>50</sub> del veneno de *B ayerbei* evaluado en 8, 16 y 24 horas pos veneno, se encuentra un aumento de ácido úrico a las 8 horas, un aumento de proteinuria a las 8 y 16 horas, aumento de urea a las 16 y 24 horas, aumento de creatinina a las 24 horas y una disminución de depuración de creatinina a las 8 horas con un aumento a las 16 horas; histológicamente se presenta, vacuolización del epitelio renal, hemorragia intersticial y tumefacción del epitelio.

El segundo estudio lo realizó Rivera, en el 2014, quien evaluó la actividad nefrotóxica del veneno de *B. asper* (Garman, 1883) en ratas cepa Wistar, células MDCK y LLC-MK2. Empleó un sistema *in vivo* denominado jaulas metabólicas (tratamientos de 25, 50 y 75% de la DL<sub>50</sub>) para evaluar los parámetros de orina recolectada y sangre, 24 horas pos veneno se encontró que la depuración de creatinina decreció en los tratamientos del 50 y 75% de la DL<sub>50</sub>, la proteinuria, creatinina, ácido úrico aumentaron en el tratamiento de 75%. A nivel histopatológico, se observó dilatación del espacio de Bowman, inflamación y lobulación glomerular. En el sistema *ex vivo*, en riñón aislado perfundido, hubo un incremento de sodio (%Na<sup>+</sup>) a los 90 minutos, incremento del flujo urinario (FU) a los 90 y 120 minutos, en histología se halló glomerulonefritis y necrosis tubular aguda.

## **7 MATERIALES Y MÉTODOS**

### **7.1.1 Mantenimiento de animales**

El veneno se obtuvo de seis ejemplares adultos de la especie *B. rhombeatus* del valle geográfico del río Cauca. Los especímenes se mantienen en cautiverio en el Centro de Investigaciones Biomédicas de la Universidad del Cauca (CIBUC) en terrarios, utilizando papel como sustrato y suministro de agua permanente. La alimentación se lleva a cabo cada 30 días con 2-3 ratones albino suizo por individuo.

### **7.2 TIPO DE ESTUDIO**

Se realizó un estudio de tipo experimental que constó de dos sistemas uno *in vivo* y otro *ex vivo*. En el sistema *in vivo* se evaluó el efecto nefrotóxico del veneno de *B. rhombeatus*, por medio de diferentes pruebas de función renal, en ratas cepa Wistar inoculadas intraperitonealmente con dosis sub-letales de veneno. El sistema *ex vivo* consistió en un sistema de riñón aislado en el cual se mantuvieron constante los parámetros de la función renal.

### **7.3 OBTENCIÓN DEL VENENO**

#### **7.3.1 Extracción del veneno**

La extracción de veneno de la serpiente *B. rhombeatus* se llevó a cabo en el CIBUC; para ello se inmovilizó a cada una de las serpientes (6) con la ayuda de ganchos herpetológicos y personal especializado; posteriormente se indujo a los especímenes a morder un embudo de vidrio previamente cubierto con papel parafilm y se recolectó el pool de veneno en un tubo falcon estéril (Figura 5). El pool de veneno se mezcló, se alícuotó y se centrifugó a 15000 rpm a 8°C durante 15 minutos para limpiar impurezas del mismo; posteriormente se liofilizó en tubos eppendorf con alícuotas de aproximadamente 0,8 mL de veneno y finalmente se almacenó a 20°C hasta el momento de realizar las pruebas.



**Figura 5.** Extracción de veneno de *B. rhombeatus* en tubos falcon. Cortesía: Centro de Investigaciones Biomédicas de la Universidad del Cauca-CIBUC (Fotografía: Andrés F. Olaya, 2017).

#### **7.4 BIOMODELOS EXPERIMENTALES**

Para los experimentos o pruebas de jaulas metabólicas y riñón aislado, se utilizó ratas macho, *R. norvegicus*, cepa Wistar, de  $280 \pm 40$ g. Los animales se mantuvieron con agua *ad libitum* hasta 12 horas previas al experimento.

#### **7.5 COMITÉ DE ÉTICA**

Estos biomodelos fueron proporcionados por el Biotério sectorial del Departamento de Fisiología y Farmacología de la Universidad Federal de Ceará-Brasil, siguiendo las normas del Consejo Nacional de Control de Experimentación Animal (CONCEA), aprobado por el Comité de Ética de uso de Animales (CEUA) de la Universidad Federal de Ceará-Brasil mediante la resolución número 104/2016.

#### **7.6 GRUPOS EXPERIMENTALES**

##### **7.6.1 Jaulas metabólicas**

Los parámetros renales fueron medidos por medio del sistema de jaulas metabólicas en tres grupos tratados con veneno ( $n=8$ ) y tres grupos control ( $n=8$ ) de la siguiente manera:

- Control: biomodelos experimentales inoculados con solución salina 0.9%, en paralelo a cada tratamiento experimental de 25, 50 y 75%.
- Grupo tratado con el 25% de la dosis letal del veneno de *B. rhombeatus*.
- Grupo tratado con el 50% de la dosis letal del veneno de *B. rhombeatus*.
- Grupo tratado con el 75% de la dosis letal del veneno de *B. rhombeatus*.

Los experimentos se diseñaron a partir de la  $DL_{50}$  ( $7.119 \mu\text{g/g}$ ) determinada previamente por Navia-Pizo (2005).

### **7.6.2 Perfusión renal**

Los parámetros fueron evaluados en un grupo experimental (n=5) de ratas macho Wistar (280 ± 40 g). Se trataron con 1 mg de veneno de la serpiente *B. rhombeatus* en un periodo de tiempo de 120 minutos, divididos en cuatro tiempos, los primeros 30 minutos de perfusión se utilizaron como control interno y los siguientes tiempos, 60, 90 y 120 minutos fueron tratados con las dosis de veneno.

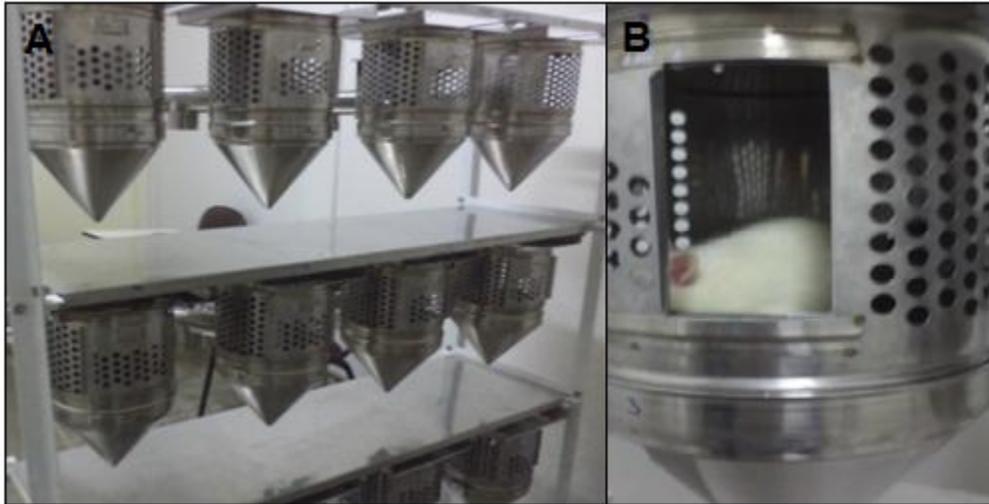
## **7.7 PRUEBAS EXPERIMENTALES**

### **7.7.1 Jaulas metabólicas**

Las jaulas metabólicas comerciales son uno de los métodos para la recolección de orina más efectivos en pruebas *in vivo* ya que permite la recolección de orina sin ninguna alteración externa, lo cual se asegura la estabilidad del experimento durante las 24 horas, permitiendo detectar anomalías a nivel renal (Kurien, Everds, & Scofield, 2004).

#### **7.7.1.1 Protocolo experimental**

Estos experimentos se realizaron en el Biotério sectorial del Departamento de Fisiología y Farmacología de la Universidad Federal de Ceará-Brasil. Los modelos experimentales fueron introducidos de manera individual en cada jaula metabólica, con acceso a agua *ad libitum* y alimento durante 24 horas, con el fin de que tuvieran un periodo de adaptación o ambientación (Figura 6), lo anterior contribuyó a disminuir los niveles de estrés por manipulación (Kurien *et al.*, 2004). Pasadas las 24 horas de adaptación se inocularon los diferentes tratamientos del veneno de *B. rhombeatus* (25, 50 y 75%) por vía intraperitoneal (I.P) y se retiró el alimento dejando cada animal con agua *ad libitum*. Pasadas 24 horas más se tomaron muestras de orina a fin de examinar parámetros renales como creatinina, proteína urinaria, ácido úrico y urea. Luego, los biomodelos fueron anestesiados con Tiopental Sódico en polvo para solución inyectable a una dosis de 30 mg/Kg administrado por vía intraperitoneal (I.P) a fin de intervenir quirúrgicamente, realizar la recolección de 5 mL de sangre de la vena cava y analizar los parámetros renales. Adicionalmente, los riñones fueron cortados longitudinalmente para estudios histopatológicos.



**Figura 6. A.** Jaulas metabólicas **B.** Periodo de adaptación de ratas Wistar en jaulas metabólicas. Cortesía: Biotério Sectorial del Departamento de Fisiología y Farmacología de la Universidad Federal de Ceará (Fotografía: Mary L. Bueno, 2017).

#### 7.7.1.2 Análisis bioquímico

**Jaulas metabólicas:** las pruebas bioquímicas se realizaron en la Universidad Federal de Ceará- Brasil en el laboratorio de toxicología molecular (LTM).

La sangre y la orina se centrifugaron a 3500 rpm durante 12 minutos a 4°C. El plasma de la sangre y el sobrenadante de la orina fue separado y almacenado a -80°C hasta el momento de la realización de las pruebas bioquímicas. Se hizo un análisis bioquímico en sangre y orina midiendo parámetros como ácido úrico, urea, creatinina, proteína urinaria o albúmina siguiendo el protocolo estandarizado por Labtest® con modificaciones de (Velasco-Reyes, 2017).

**Perfusión renal:** los niveles de sodio, cloro y potasio obtenidos de las muestras de orina y solución perfusora se midieron mediante un analizador de electrolitos 9180 (Roche, Brasil), a través del método electrodo ion selectivo.

La Inulina se determinó con hidrólisis directa como lo describe Walser *et al.*, (1955) y Fonteles *et al.*, (1983). La osmolaridad se midió utilizando un osmómetro de presión de vapor (modelo 5100c WESCOR).

### 7.7.1.3 Cálculos de parámetros renales

**Tabla 1.** Fórmulas para hallar parámetros renales a partir de datos de perfusión renal (extraído de (Pereira, 2009) y jaulas metabólicas (extraído Labtest® con modificaciones de (Velasco-Reyes, 2017).

<b>Parámetro renal</b>	<b>Ecuación</b>
<b>PP = Presión de perfusión (mmHg) PP</b>	<b>PP = Lectura del manómetro</b>
<b>FU (mL.g-1. Min-1) = Flujo urinario</b>	<b>FU = (Peso del volumen urinario/ Peso del riñón izquierdo) x 10</b>
<b>TFG (mL.g-1.min-1) = Tasa de filtración glomerular RFG</b>	<b>TFG = (DOU in / DOP in x FU) siendo DOU in = Densidad óptica de la inulina en la orina y DOP in = Densidad óptica de la inulina en el perfundido</b>
<b>FPR (mL.g-1.min-1) = Flujo de perfusión renal</b>	<b>FPR = Registrado cada 10 min/peso del riñón/ a intervalos de tiempo) RVR = PP (mmHg) / FPR</b>
<b>RVR (mmHg/mL.g-1.min-1) = Resistencia vascular renal</b>	<b>RVR = PP (mmHg) / FPR</b>
<b>FNa+ (¿Eq.g-1. Min-1) = Sodio filtrado</b>	<b>Fna+ = RFG x PNa+ (PNa+ = Concentración de sodio en el perfundido)</b>
<b>ENa+ = (¿Eq.g-1. Min-1) = Sodio excretado</b>	<b>ENa+ = FU x UNa+ (UNa+ = Concentración en la orina) TNa+ = FNa+ - ENa+</b>
<b>TNa+ = (¿Eq.g-1. Min-1) = Sodio transportado</b>	<b>TNa = FNa+ - ENa+</b>
<b>%TNa+ = Porcentaje de sodio transportado</b>	<b>%TNa+ = TNa+ x 100 / FNa+</b>
<b>FK+ (μEq.g-1. Min-1) = Potasio filtrado</b>	<b>FK+ = RFG x PK+ (PK+ = concentración de potasio en el perfundido)</b>
<b>EK+ (μEq.g-1. Min-1) = Potasio excretado</b>	<b>EK+ = FU x UK+ (UK+ = Concentración de potasio en la orina) TK+ = FK+ x EK+</b>
<b>TK+ (μEq.g-1. Min-1) = Potasio transportado</b>	<b>%TK+ = TK+ x 100 / FK+</b>
<b>%TK+ (μEq.g-1. Min-1) = Porcentaje de potasio transportado</b>	<b>FK+ = RFG x PK+ (PK+ = concentración de potasio en el perfundido)</b>
<b>FCI- (μEq.g-1. Min-1) = Cloro filtrado</b>	<b>FCI- = RFG x PCI- (PCI- = concentración de cloro en el perfundido)</b>
<b>% TCI- (μEq.g-1. Min-1) = Cloro excretado</b>	<b>ECl- = FU x UCl- (UCl- = concentración de cloro en la orina)</b>
<b>TCl- (μEq.g-1. Min-1) = Cloro</b>	<b>TCl- = FCI- x ECl-</b>

transportado	
<b>Cosm (mL.g-1.min-1) = Aclaramiento osmótico</b>	<b>(Uosm / Posm) x FU ( Uosm = osmolaridad urinaria y Posm = osmolaridad del perfundido)</b>
<b>Ácido Úrico (mg/dL)</b>	= Absorbancia del test/Absorbancia del reactivo estándar x 6
<b>Urea (mg/dL)</b>	= Absorbancia del test/Absorbancia del reactivo estándar x 70
<b>Creatinina (mg/dL)</b>	$\Delta$ Absorbancia del test/ $\Delta$ Absorbancia del reactivo estándar x 70/ $\Delta$ Absorbancia del reactivo estándar= A90segundos - A30segundos
<b>Proteína (mg/dL)</b>	= Absorbancia del test/Absorbancia del reactivo estándar x 50
<b>C<sub>icr</sub> = Concentración de creatinina urinaria (mg/dL), V = Volumen de orina por min (mL/min/100g), Cr<sub>P</sub> = Concentración plástica de creatinina (mg/dL), V<sub>urina</sub>= Volumen de orina por min (mL/min).</b>	<b>C<sub>cr</sub> = (Cr<sub>U</sub> x V / Cr<sub>P</sub>)</b> <b>V= V<sub>urina</sub>/ [(Peso/100) X Tempo] X 1000</b>
<b>FU= Flujo Urinario</b>	= Orina (ml) / Tiempo de evaluación (min).

#### 7.7.1.4 Histología de riñones proceso *in vivo*

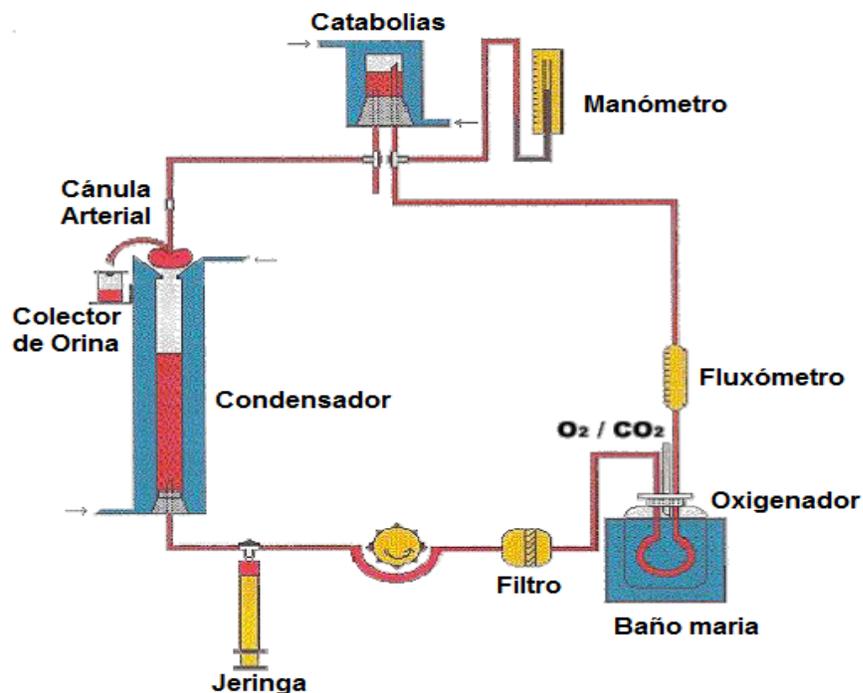
Los riñones se extrajeron a través de una disección y fueron preservados en formol bufferado al 10% por 24 horas, para luego hacer una inclusión en parafina. Se realizaron cortes longitudinales con espesor de 5  $\mu$ m, seguido de una coloración con hematoxilina-eosina para luego hacer un examen histológico por medio de un microscopio óptico. La histología fue procesada y analizada en el Laboratorio de Anatomía Patológica y Biopsia en el Departamento de Patología y Medicina Forense de la Universidad Federal de Ceará.

#### 7.7.2 Perfusión de riñón aislado

El sistema consiste en la perfusión aislada de riñón con recirculación en un circuito cerrado, la perfusión *in vitro*, se mantiene a una temperatura de 37°C. Este sistema tiene la ventaja de mantener constantes parámetros de la función renal con el uso de albúmina en solución perfusora en volumen más pequeño, manteniendo constante las sustancias dializables con oxígeno (95% O<sub>2</sub> / 5% CO<sub>2</sub>) (García-Lledó & López Del Cañizo, 2002; Pereira, 2009). El sistema de perfusión está conformado por (Figura 7):

- Baño maría: mantiene constante la temperatura de pulmón silástico (36-37°C).

- Bomba de perfusión de Watson: bombea la solución perfusora a lo largo del sistema.
- Bomba calentadora con termostato: mantiene una temperatura constante en el sistema entre 36-37 °C.
- Catabolias: evita la entrada de burbujas en el riñón.
- Frasco colector: acumula la orina que sale del uréter.
- Filtro miliporo 5 $\mu$ : filtra la solución perfusora.
- Fluxómetro: medición de flujo de perfusión (mL/Hora).
- Manómetro de mercurio: medición de la presión de perfusión (mmHg)
- Pulmón silástico: promueve el intercambio de gases (95% O<sub>2</sub> y 5% CO<sub>2</sub>)
- Jeringa: recolecta la solución perfusora



**Figura 7.** Sistema de perfusión y sus partes, extraído de (Pereira, 2009).

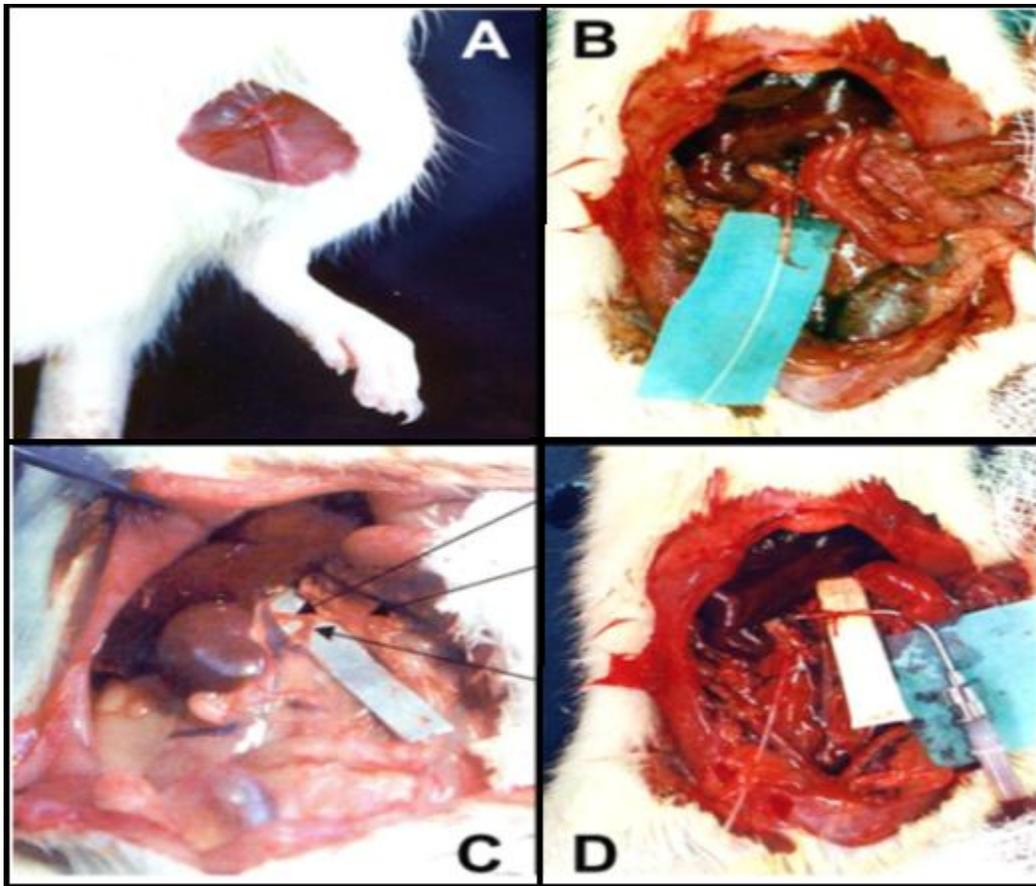
### 7.7.2.1 Preparación de la solución de perfusión

Se utilizó solución perfusora de Krebs-Henseleit modificada (MKHS), concentrada a 20% y 6% de albúmina bovina. Con la siguiente composición para dos litros: NaCl = 138g, KCl = 7g, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> · H<sub>2</sub>O = 3.2g, MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O = 5.8g, NaHCO<sub>3</sub> = 4.2g, CaCl<sub>2</sub> · 2H<sub>2</sub>O = 0.74g, glucosa = 2g y urea = 10g. La solución fue dializada por 48 horas, se adicionó 0.15g de inulina y se ajustó el pH entre 7.3 y 7.4.

### 7.7.2.2 Procedimiento quirúrgico para riñón aislado

La perfusión renal fue realizada en el Núcleo de Investigación y Desarrollo de Medicamentos (NPDM) de la UFC, en el laboratorio de farmacología de Venenos, Toxinas y Lectinas (LFAVET).

Los biomodelos se anestesiaron con Ketamina (90mg/kg) y Xilacina (10 mg/kg) por vía I.P. Se administró 3mL de manitol al 20% a través de la vía femoral para facilitar la fijación de la cánula al uréter para la colecta de orina. Después se aisló la arteria renal y se canalizó a través de la arteria mesentérica superior. Se encapsuló el riñón con el uréter, el cual estuvo fijado a la cánula perfusora sin interrupción de flujo (Figura 8.)



**Figura 8.** Procedimiento quirúrgico para extraer el riñón. **A.** aislamiento de arteria femoral para administración de manitol; **B.** aislamiento y fijación de la cánula al uréter; **C.** aislamiento de las arterias mesentéricas y renal; **D.** cánula fijada a la arteria renal. Cortesía: LFAVET-UFC.

### 7.7.2.3 Protocolo experimental

En la calibración del sistema se utilizó solución fisiológica 0.9%. A cada unidad de la bomba de perfusión (1, 2, 3, 4 y 5) se conectó la solución por un minuto en probeta milimetrada y anotada la medida del fluxómetro y la presión de perfusión, a través del manómetro de mercurio ligado al sistema.

Una vez estabilizado el sistema se iniciaron los experimentos ( $t=0$ ) con la recirculación de la solución de Krebs- Henseleit, después de transcurridos los primeros 30 minutos (control), se adicionó 1 mg de veneno a la solución perfusora con el fin de evaluar los efectos en la presión de perfusión (PP), la resistencia vascular renal (RVR), la tasa de filtración glomerular (TFR), el flujo urinario (FU), el transporte de sodio ( $TNa^+$ ), el transporte de potasio ( $TK^+$ ) y el transporte de cloro ( $TCl^-$ ). Cada cinco minutos se registraron los datos de flujo y presión, con el fluxómetro y manómetro respectivamente, se colectó orina y solución perfusora cada 10 minutos de manera intercalada, para análisis de sodio, cloro, potasio, inulina y osmolaridad. El tiempo total de la experimentación fue de 120 minutos.



**Figura 9.** Sistema de perfusión. Cortesía: Laboratorio de Farmacología de Venenos y Toxinas-LFAVET, UFC. (Fotografía: Mary L. Bueno, 2017).

### 7.7.2.4 Histología de riñones sistema *ex vivo*

Los riñones se extrajeron mediante disección, fueron preservados en formol al 10% y posteriormente incluidos en parafina. Se realizaron cortes longitudinales con espesor de 5  $\mu$ m, seguido de tinción con hematoxilina-eosina para el análisis histológico por medio de un microscopio óptico. La histología fue procesada en el Laboratorio de Anatomía Patológica y Biopsia en el Departamento de Patología y Medicina Forense de la Universidad Federal de Ceará y analizada por la patóloga

Ana Costa del departamento de medicina Veterinaria de la Universidad Antonio Nariño en Colombia.

## **7.8 ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

### **Jaulas metabólicas**

A fin de evaluar los parámetros renales como ácido úrico, urea, creatinina, depuración de creatinina, proteína urinaria y flujo urinario, los datos se expresaron como la media  $\pm$  SEM, se evaluó la normalidad con Shapiro-Wilk y posteriormente se utilizó ANOVA de dos vías seguido de un pos-test de comparaciones múltiples de Bonferroni por pares, con una significancia de (\*)  $P < 0,01$ . Todos los datos fueron analizados con el programa estadístico GraphPad Prism 5.0 ®.

### **Perfusión renal**

Para evaluar los parámetros de PP, RVR, TFG, FU y  $\%TNa^+, K^+, Cl^-$ , los datos se expresaron como la media  $\pm$  SEM, se evaluó la normalidad con Shapiro-Wilk y posteriormente se utilizó ANOVA de una vía con un test de Dunnett para comparaciones múltiples ,con una significancia de (\*)  $p < 0,01$ . Todos los datos fueron analizados con el programa estadístico GraphPad Prism 5.0 ®.

## 8 RESULTADOS

### 8.1 Jaulas metabólicas

La tabla (2) muestra la medición de los parámetros (ácido úrico, urea, creatinina, depuración de creatinina, proteína urinaria) empleados para evaluar la función renal. La figura (10) a la figura (17) representa gráficamente la comparación estadística

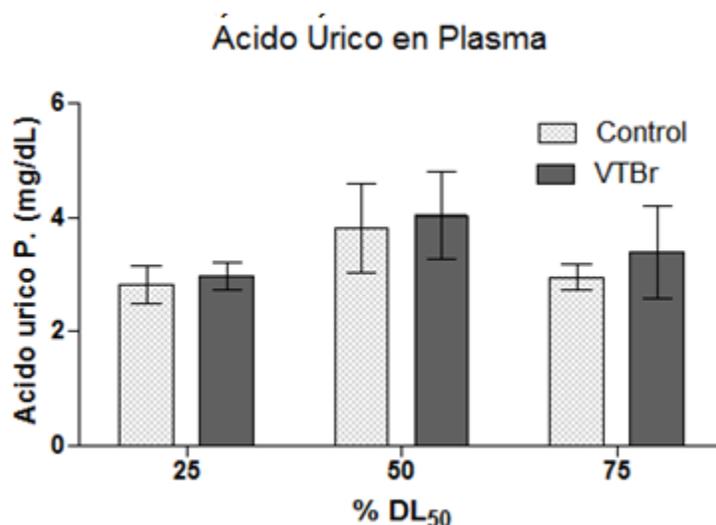
**Tabla 2.** Mediciones parámetros de función renal en jaulas metabólicas.

Parámetros	TRATAMIENTOS			
	DL <sub>50</sub> (%)	DL25	DL50	DL75
Ácido Úrico Plasma	Control	2.527±0.1904	3.063±0.2538	2.807±0.1727
	DL VTBr	2.980±0.2394	3.336±0.3825	2.611±0.1723
Ácido Úrico Orina	Control	5.773±1.484	2.460±0.1824	2.824±0.5766
	DL VTBr	2.567±0.1320	2.460±0.1824	2.880±0.08474
Urea Plasma	Control	11.06±0.8555	13.95±2.389**	12.19±0.5547
	DL VTBr	9.733±0.5134	8.882±0.2854**	9.752±0.3769
Proteína Urinaria	Control	25.95±1.952	30.52±1.272	26.08±1.984
	DL VTBr	28.69±2.478	32.03±1.657	26.66±1.228
Creatinina en Plasma	Control	0.2186±0.0126	0.2675±0.0201	0.2600±0.0119
	DL VTBr	0.2175±0.0142	0.2713±0.0215	0.3200±0.0069
Creatinina en Orina	Control	59.85±4.021	67.62±2.694	144.0±4.990
	DL VTBr	49.43±3.896	65.56±6.305	60.00±5.634
Depuración de Creatinina	Control	0.3755±0.0383	0.7904±0.0335	0.4897±0.0958
	DL VTBr	0.3683±0.0408	0.9790±0.1325	0.4637±0.0673
Flujo Urinario	Control	0.0062±0.0005	0.013±0.00084	0.0079±0.0020
	DL VTBr	0.006±0.00047	0.014±0.00084	0.0090±0.0012

Cada medición es expresada como la media ± SEM, de tres grupos control (n=8) y tres grupos tratados (n=8) con la DL del veneno total de *B. rhombeatus* (VTBr).

### 8.1.1 Ácido úrico en plasma

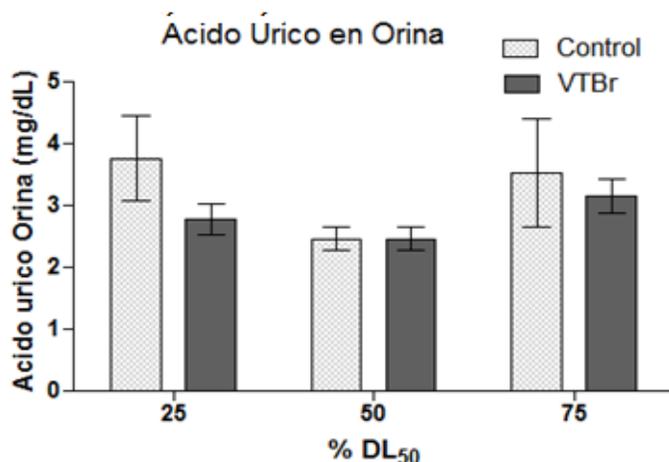
El veneno total de *B rhombeatus* (VTBr) no causó alteraciones significativas en el ácido úrico plasmático; sin embargo se observa un leve incremento del parámetro en los grupos tratados con la DL<sub>50</sub> (25, 50 y 75%) comparados con el grupo control (Figura 10).



**Figura 10.** Ácido úrico en plasma evaluado tres subdosis (25, 50 y 75%) de la DL<sub>50</sub> del veneno total de *B. rhombeatus* (VTBr) y sus respectivos controles.

### 8.1.2 Ácido úrico en orina

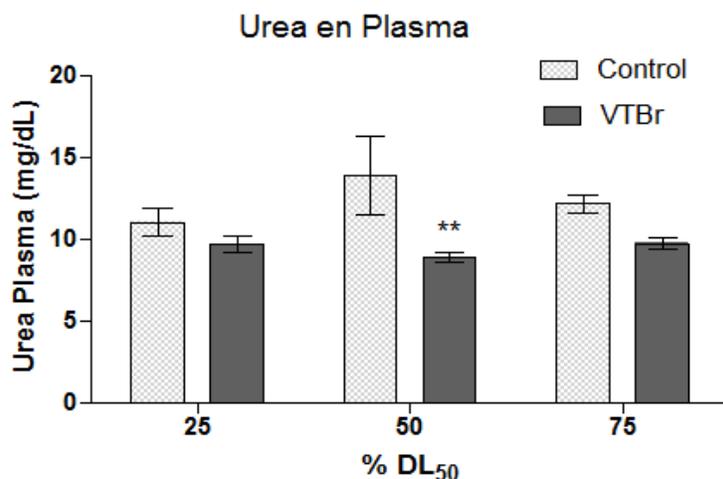
El veneno total de *B rhombeatus* (VTBr) no causó alteraciones significativas en el ácido úrico en orina; sin embargo se observa una disminución no significativa en los grupos tratados con la DL<sub>50</sub> (25 y 75%) (Figura 11).



**Figura 11.** Ácido úrico en orina evaluado en tres subdosis de la DL<sub>50</sub>, 25, 50 y 75% del veneno total de *B. rhombeatus* (VTBr) y sus respectivos controles.

### 8.1.3 Urea en plasma

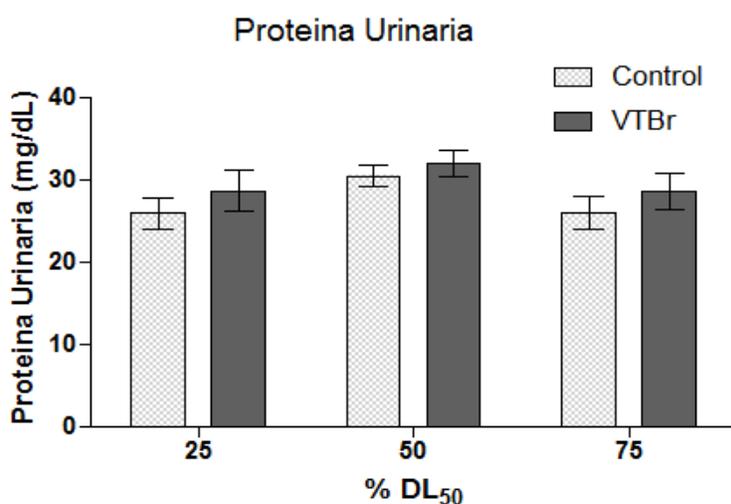
El veneno total de *B rhombeatus* (VTBr) causó alteraciones significativas en la urea en plasma en el tratamiento de 50% de la DL<sub>50</sub> comparado con su grupo control (50%). Los tratamientos del 25 y 75% mostraron una tendencia a disminuir con respecto a su grupo control pero sin cambios significativos (Figura 12).



**Figura 12.** Urea en plasma evaluada tres subdosis de la DL<sub>50</sub>, 25, 50 y 75% del veneno total de *B. rhombeatus* (VTBr) y sus respectivos controles (\*p<0.01).

### 8.1.4 Proteína urinaria

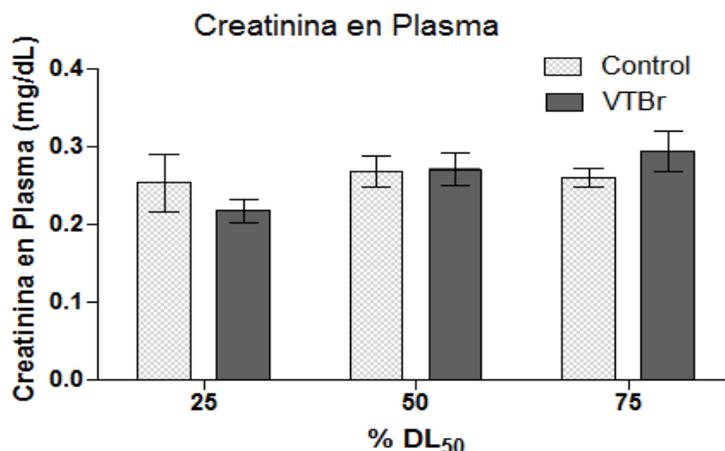
El veneno total de *B rhombeatus* (VTBr) no causó alteraciones significativas en la proteína urinaria; sin embargo observa un leve aumento de este parámetro en los grupos tratados con la DL<sub>50</sub> (25% y 75%) comparados con el grupo control (Figura 13).



**Figura 13.** Proteína urinaria evaluada en tres subdosis de la DL<sub>50</sub>, (25, 50 y 75%) del veneno total de *B. rhombeatus* (VTBr) y sus respectivos controles.

### 8.1.5 Creatinina en plasma

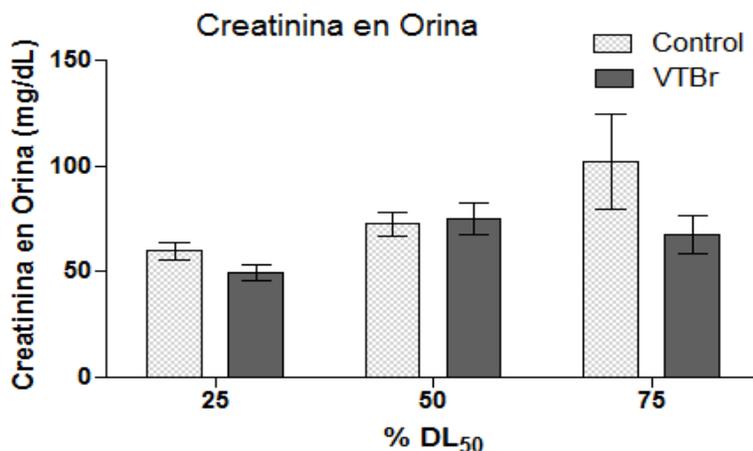
El veneno total de *B rhombeatus* (VTBr) no causó alteraciones significativas en el creatinina plasmática; sin embargo se observa una fluctuación del parámetro en los grupos tratados con la subdosis de la DL<sub>50</sub> (25 y 75%) comparados con los grupos control (Figura 14).



**Figura 14.** Creatinina en plasma evaluada en tres subdosis de la DL<sub>50</sub>, 25, 50 y 75% del veneno total de *B. rhombeatus* (VTBr) y sus respectivos controles.

### 8.1.6 Creatinina en Orina

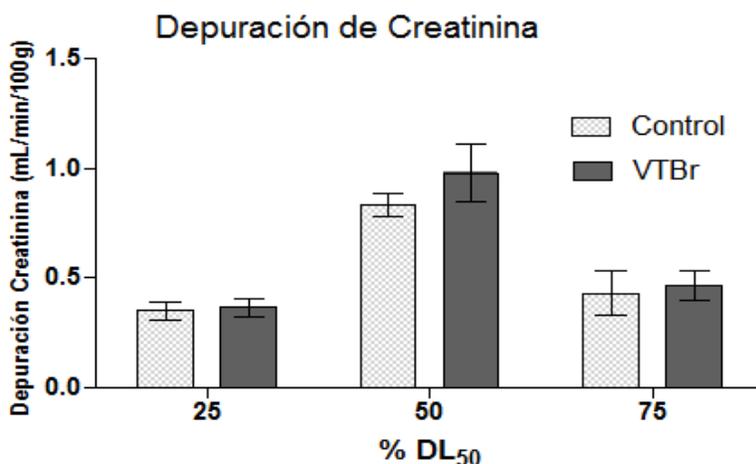
El veneno total de *B rhombeatus* (VTBr) no causó alteraciones significativas en la creatinina en orina, pero se observa una fluctuación del parámetro en los grupos tratados con la DL<sub>50</sub> (25 y 75%) comparados con los grupo control (Figura 15).



**Figura 15.** Creatinina en Orina evaluada en tres subdosis de DL<sub>50</sub>, 25, 50 y 75% del veneno total de *B. rhombeatus* (VTBr) y sus respectivos controles.

### 8.1.7 Depuración de creatinina

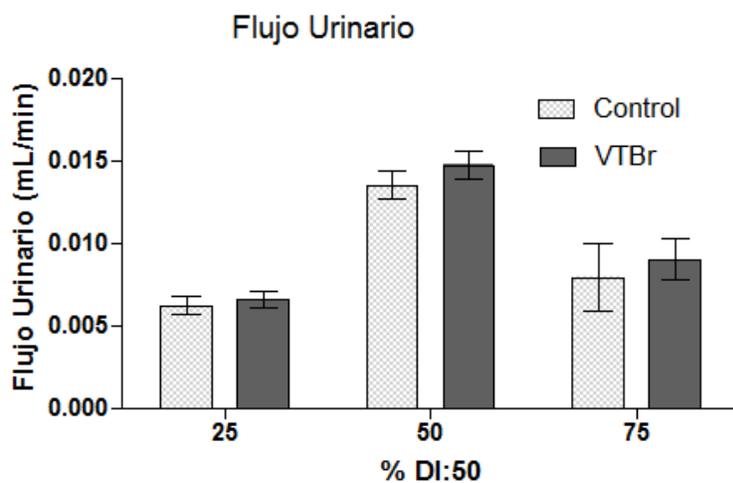
El veneno total de *B rhombeatus* (VTBr) no causó alteraciones significativas en la depuración de creatinina, sin embargo se observa un aumento del parámetro en la en los grupos tratados de DL<sub>50</sub>: 50% comparados con los grupos control (Figura 16).



**Figura 16.** Depuración de creatinina evaluada en tres subdosis de la DL<sub>50</sub> 25, 50 y 75% del veneno total de *B. rhombeatus* (VTBr) y sus respectivos controles.

### 8.1.8 Flujo urinario

El veneno total de *B rhombeatus* (VTBr) no causó alteraciones significativas en el flujo urinario; sin embargo se observa un aumento del parámetro de los grupos tratados con subdosis de las DL<sub>50</sub>: 50 y 75% comparados con los grupos control (Figura 17).



**Figura 17.** Flujo urinario evaluado en tres subdosis de la DL<sub>50</sub>, 25, 50 y 75% del veneno total de *B. rhombeatus* (VTBr) y sus respectivos controles.

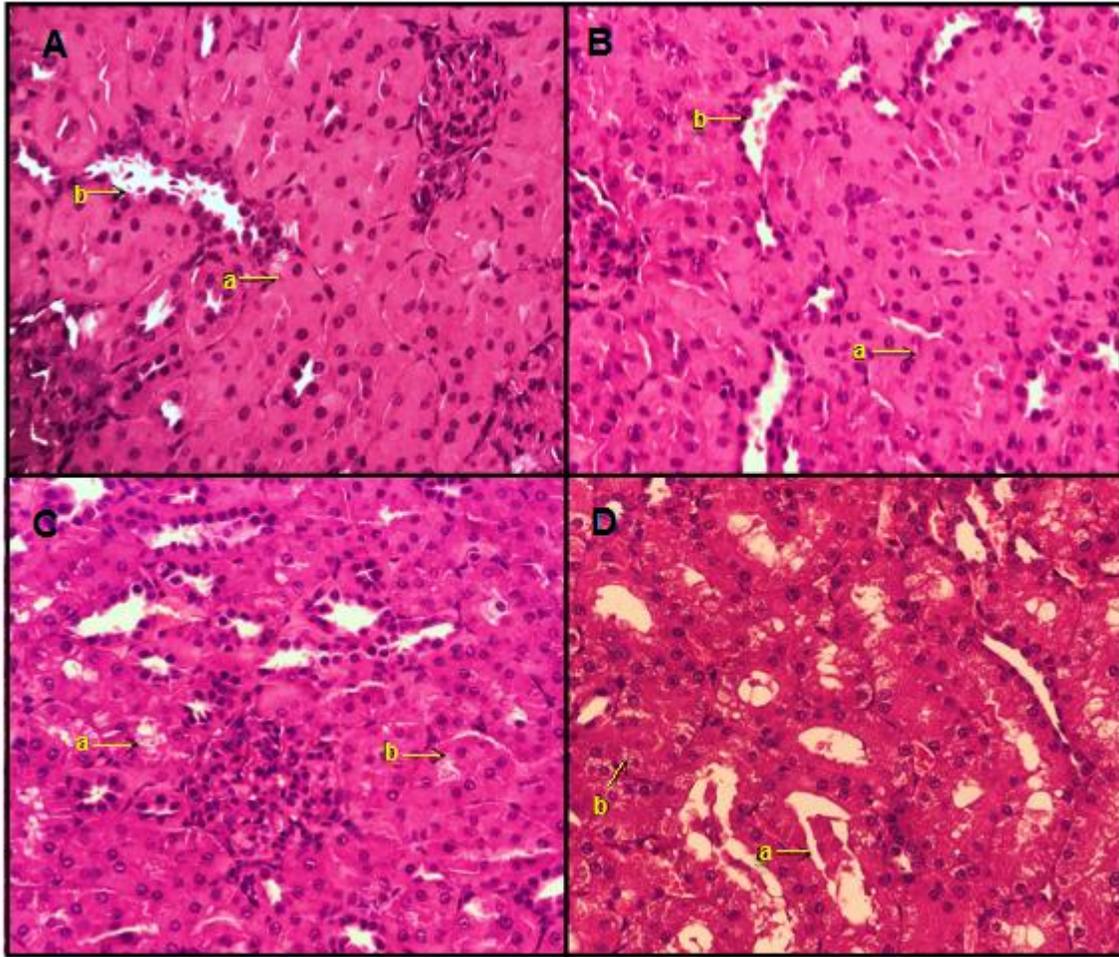
### 8.1.9 Histología de riñón en jaulas metabólicas

No se observaron marcadas diferencias entre los controles y tratamientos, por lo que se no reporta daño nefrotóxico causado por el veneno de *B. rhombeatus* (Tabla 3.); sin embargo, se notaron algunas áreas con degeneración del revestimiento tubular y focos de vacuolización tubular, únicas alteraciones que fueron diferentes a las de los grupos control (Figura 18).

**Tabla 3.** Alteraciones histológicas en riñón de rata (sistema *in vivo*)

Alteraciones histológicas	Grupos control (solución salina) 25, 50, 75%	Grupos tratados con DL <sub>50</sub> del VTBr		
		25%	50%	75%
Estructura cortical, medular y glomerular	P	P	P	P
Tumefacción del epitelio tubular	L	L	L	A
Túbulos dilatados, descamación células epiteliales	P	P	P	P
Material eosinófilo proteico en lumen	P	P	P	P
Focos de hemorragia intersticial	D	D	D	D
Focos de vacuolización del epitelio tubular	A	P	P	P
Áreas de degeneración del revestimiento tubular	A	P	P	P
Necrosis	A	A	A	A

Clasificación de las alteraciones; leve (L), discreto (D), presente (P), ausente (A). Alteraciones de tres grupos tratados y sus respectivos controles con la DL del veneno total de *B. rhombeatus* (VTBr) (25, 50 y 75%).



**Figura 18.** Análisis histológico de riñón derecho de ratas Wistar en un sistema *in vivo* (jaulas metabólicas) tratado con el veneno de *B. rhombeatus* con DL<sub>50</sub>: 25%, 50% y 75% (aumento en microscopio óptico 40x), **A.** Grupo control (25, 50 y 75%), **a.** leve tumefacción epitelial tubular, **b.** túbulos dilatados, células epiteliales descamadas. **B.** Grupo tratado con la DL<sub>50</sub>: 25%, **a.** leve tumefacción epitelial tubular, **b.** túbulos dilatados, células epiteliales descamadas. **C.** Grupo tratado con la DL<sub>50</sub>: 50%, **a.** focos de vacuolización del epitelio tubular, **b.** áreas de degeneración celular del revestimiento tubular; **D.** Grupo tratado con la DL<sub>50</sub>: 75%, **a.** acumulación de eosinófilos en el área del lumen, de aspecto proteináceo, **b.** vacuolización del epitelio tubular.

## 8.2 Perfusión renal

La tabla (4) muestra la medición de los parámetros (PP, RVR, RFG, FU, %TNa<sup>+</sup>, %TK<sup>+</sup>, %TCI<sup>-</sup>) empleados para evaluar la función renal. La figura (19) a la figura (25) representa gráficamente la comparación estadística.

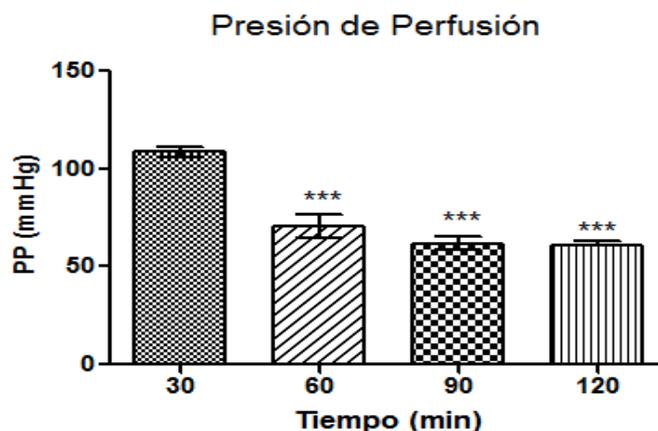
Tabla 4. Mediciones parámetros de función renal en perfusión renal.

Variables, VTBr (1 mg)	Tiempo (min)			
	30	60	90	120
PP (mmHg)	108.6±2.710	70.76±6.138***	61.80±3.515***	60.88±2.579***
RVR (mmHg.mL. min)	6.142±0.505	5.127±0.6743	4.177±0.609*	3.582±0.3129*
RFG (mmHg.mL. min)	0.490±0.080	0.2740±0.0716	0.5421±0.121	1.158±0.164***
FU (mL.g.min)	0.121±0.010	0.1245±0.0312	0.2970±0.060*	0.489±0.077***
%TNa <sup>+</sup>	77.08±2.895	63.51±1.931**	61.92±2.893**	61.37±3.497***
%TK <sup>+</sup>	61.20±4.071	56.45±3.658	56.69±3.728	60.64±4.048
%TCI <sup>-</sup>	77.73±2.602	60.56±3.515**	62.83±5.046*	63.32±3.900*

Cada medición se expresan como la media ± SEM de cinco riñones de ratas Wistar diferentes (n=5) con la DL del VTBr (1 mg).

### 8.2.1 Presión de Perfusión

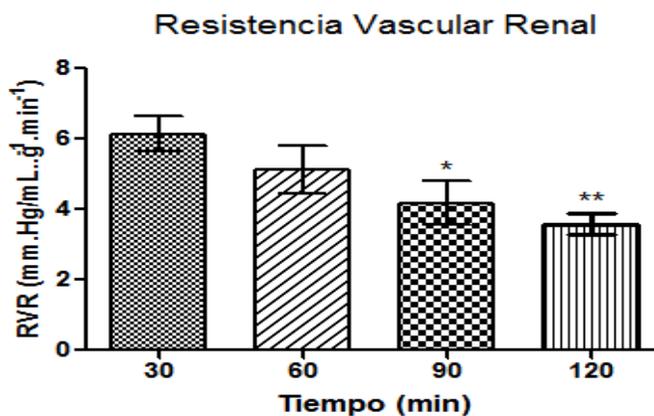
A partir de la inoculación del veneno total de *B. rhombeatus* (VTBr) en el sistema de perfusión se estiman las alteraciones de los parámetros renales con respecto al tiempo. La presión de perfusión (PP) disminuyó a los 60, 90 y 120 minutos, presentando una diferencia significativa al ser comparado con los primeros 30 minutos o control interno (Figura 19).



**Figura 19.** Efecto del veneno total de *B. rhombeatus* (1 mg con solución perfusora) sobre la presión de perfusión (PP), evaluada en cuatro tiempos. Control interno sin veneno (30 minutos) y tres tiempos con veneno (60, 90, 120 minutos).

### 8.2.2 Resistencia Vascular Renal

La resistencia vascular renal (RVR) disminuyó comparado con el tiempo control (30 minutos) a partir de la inoculación del veneno total de *B. rhombeatus* (VTBr) al sistema de perfusión, presentando una diferencia significativa a los 90 minutos y 120 minutos (Figura 20).

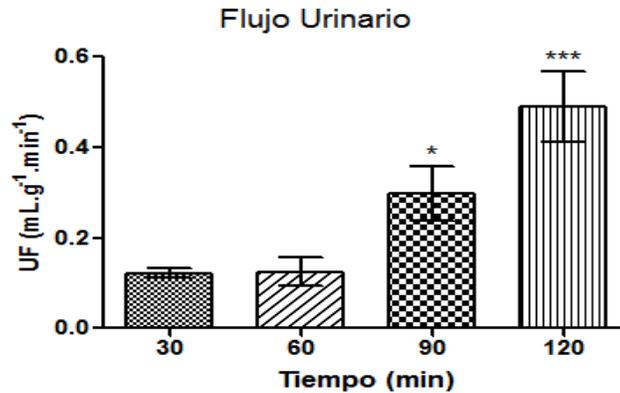


**Figura 20.** Efecto del veneno total de *B. rhombeatus* (1 mg con solución perfusora) sobre la resistencia vascular renal (RVR), evaluada en cuatro tiempos.

Control interno sin veneno (30 minutos) y tres tiempos con veneno (60, 90, 120 minutos).

### 8.2.3 Flujo urinario

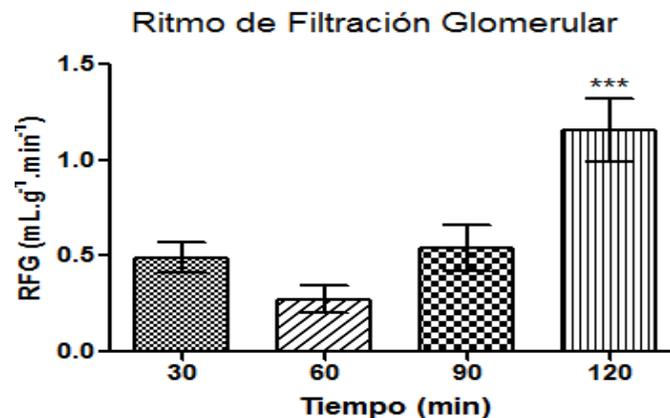
El flujo urinario (FU) aumentó considerablemente hacia los 90 y 120 minutos de inoculado del veneno total de *B. rhombeatus* (VTBr) respecto al control interno (30 minutos) por lo que se presentan diferencias significativas; mientras que el tiempo de 60 minutos se mantuvo constante con respecto al control interno (Figura 21)



**Figura 21.** Efecto del veneno total de *B. rhombeatus* (1 mg con solución perfusora) sobre el flujo urinario (FU), evaluada en cuatro tiempos. Control interno sin veneno (30 minutos) y tres tiempos con veneno (60, 90, 120 minutos).

### 8.2.4 Ritmo de filtración glomerular

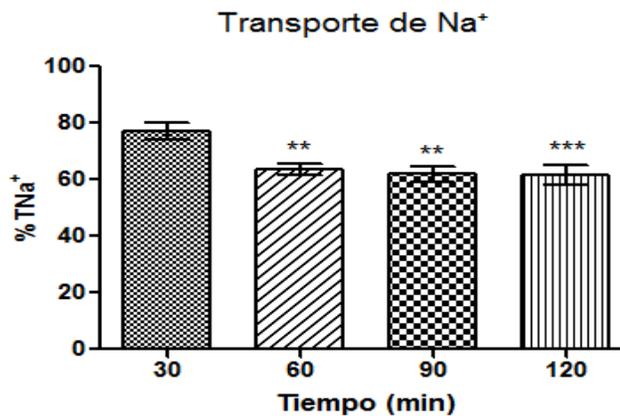
El ritmo de filtración glomerular (RFG) a partir de la inoculación del veneno total de *B. rhombeatus* (VTBr) disminuyó levemente en el minuto 60 frente al control interno (30 minutos), mientras que hacia los 90 y 120 minutos tuvo un incremento, con diferencias significativas a los 120 minutos respecto al control interno (Figura 22).



**Figura 22.** Efecto del veneno total de *B. rhombeatus* (1 mg con solución perfusora) sobre el RFG, evaluada en cuatro tiempos. Control interno sin veneno (30 minutos) y tres tiempos con veneno (60, 90, 120 minutos).

### 8.2.5 Porcentaje de transporte de sodio

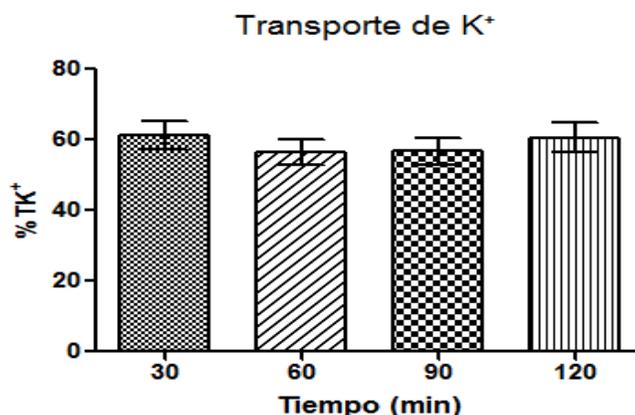
Parámetros renales como el porcentaje de transporte tubular de sodio (%TNa<sup>+</sup>), presentó una disminución significativa a partir de la inoculación del veneno total de *B. rhombeatus* (VTBr) en todo los tiempos frente al control interno (30 minutos) (Figura 23).



**Figura 23.** Efecto del veneno total de *B. rhombeatus* (1 mg con solución perfusora) sobre el porcentaje de transporte tubular de sodio (%TNa<sup>+</sup>), evaluada en cuatro tiempos. Control interno sin veneno (30 minutos) y tres tiempos con veneno (60, 90, 120 minutos).

### 8.2.6 Porcentaje de transporte de potasio

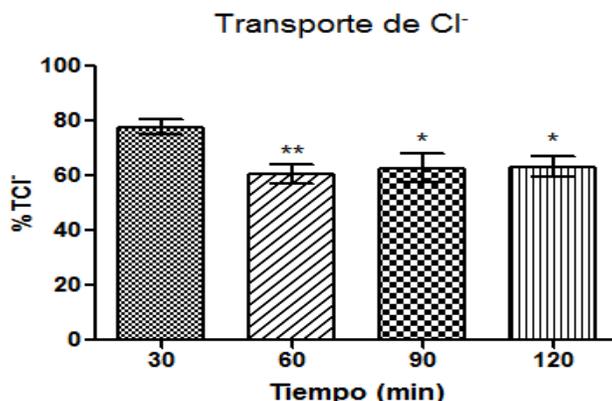
El porcentaje de transporte tubular de potasio (%TK<sup>+</sup>) a partir de la inoculación del veneno total de *B. rhombeatus* (VTBr) presentó una leve disminución, sin significancia estadística, en los minutos 60 y 90, pero en el tiempo final (120 minutos) se recupera y se mantiene igual que el control interno (30 minutos) (Figura 24).



**Figura 24.** Efecto del veneno total de *B. rhombeatus* (1 mg con solución perfusora) sobre el porcentaje del transporte tubular de potasio (%TK<sup>+</sup>), evaluada en cuatro tiempos. Control interno sin veneno (30 minutos) y tres tiempos con veneno (60, 90, 120 minutos).

### 8.2.7 Porcentaje de transporte de cloro

Finalmente el porcentaje de transporte tubular de cloro (%TCl<sup>-</sup>) a partir de la inoculación del veneno total de *B. rhombeatus* (VTBr) disminuyó significativamente en los minutos 60, 90 y 120 minutos frente al control interno (30 minutos) (Figura 25).

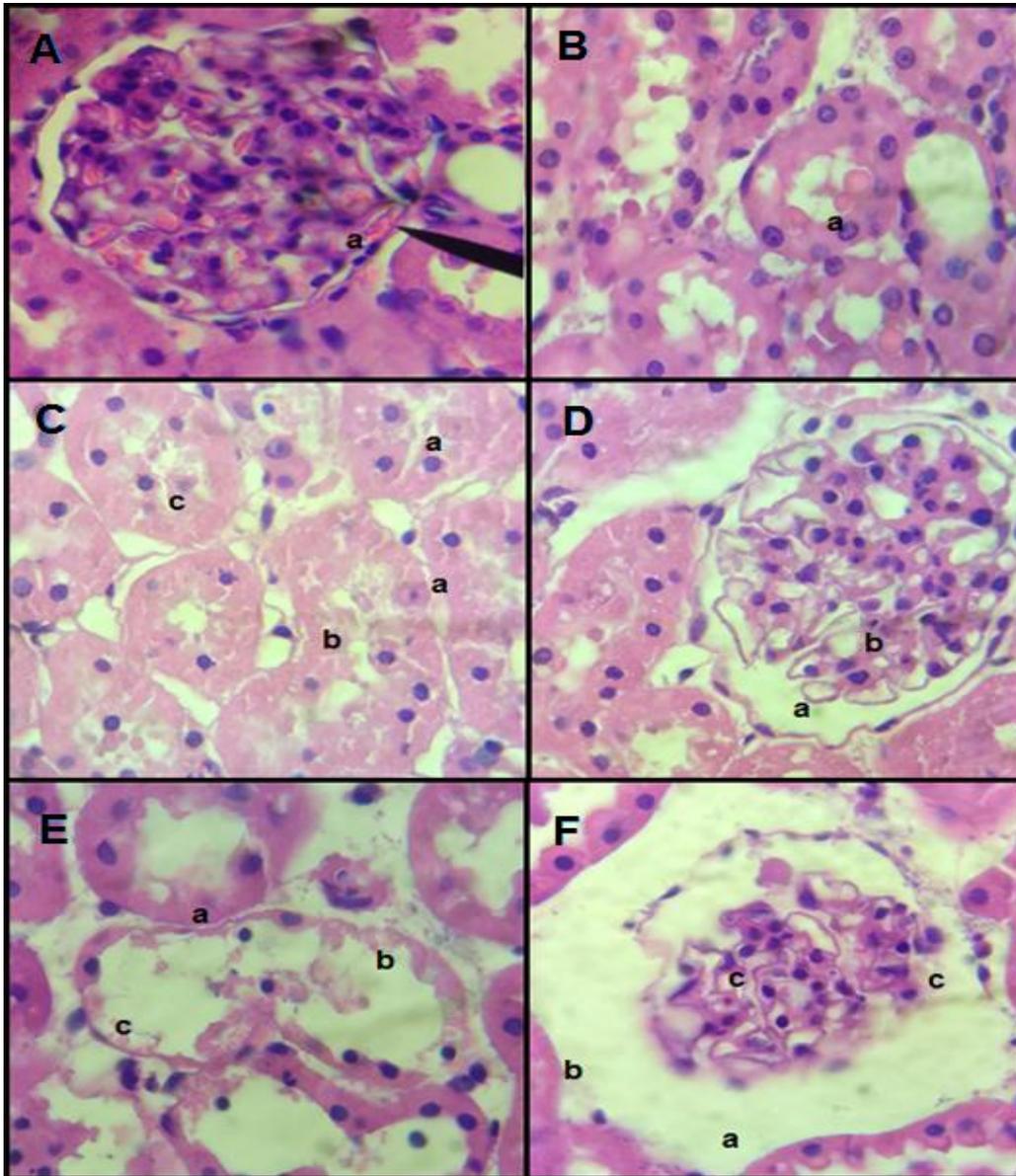


**Figura 25.** Efecto del veneno total de *B. rhombeatus* (1 mg con solución perfusora) sobre el porcentaje del transporte tubular de cloro (%TCl<sup>-</sup>), evaluada en cuatro tiempos. Control interno sin veneno (30 minutos) y tres tiempos con veneno (60, 90, 120 minutos).

### **8.2.8 Histología de riñón perfundido**

Se evaluaron las alteraciones histológicas en riñones de rata cepa Wistar. En los riñones control se observaron alteraciones como congestión tubular y glomerular leve, resultado de la cirugía, y en un caso particular presencia de un microtrombo, posiblemente a causa de la cirugía o un problema renal aislado de la experimentación, cilindros hialinos con presencia leve a moderada (Figura 14, A, B).

En los riñones perfundidos se encontraron diversas alteraciones que fueron de leves a severas, algunas de las cuales afectan directamente la funcionalidad del riñón, una de estas es la presencia de bacterias en túbulos, corteza, medula y glomérulo que varía entre distribución focal leve, moderada a severa (Figura 26), presencia leve de cilindros hialinos y moderada en túbulo y glomérulo, descamación del epitelio tubular y glomerular, afección tubular, en corteza y médula, cambios degenerativos en túbulo, material eosinófilo, atrofia glomerular aguda, aumento capsula de Bowman y cambios necróticos como picnosis, cariorrexis, cariólisis (Tabla 5).



**Figura 26.** Análisis histológico de riñón aislado de ratas Wistar. **A.** riñón izquierdo de grupo control (sin veneno, aumento de 100x en microscopio óptico); **a.** glomérulo normal con congestión leve. **B.** Túbulos (aumento de 100x en microscopio óptico); **a.** túbulos con presencia de cilindros hialinos. **C.** Riñón derecho de grupo tratado con VTBr (aumento de 40x en microscopio óptico); túbulos con procesos necróticos **a.** picnosis, **b.** cariólisis, **c.** cariorrexis. **D.** Riñón derecho de grupo tratado con VTBr (aumento de 100x en microscopio óptico); glomérulo **a.** aumento del espacio de Bowman, **b.** procesos necróticos **E.** Riñón derecho de grupo tratado con VTBr (aumento de 40x en microscopio óptico); procesos necróticos, **a.** picnosis, **b.** cariólisis, **c.** descamación. **F.** Riñón derecho de grupo tratado con VTBr (aumento de 100x en microscopio óptico); glomérulo, **a.** aumento del espacio de Bowman, **b.** descamación, **c.** reducción del glomérulo y procesos necróticos.

**Tabla 5.** Alteraciones histológicas de riñón aislado (sistema *ex vivo*).

Alteraciones		Riñón 1		Riñón 2		Riñón 3		Riñón 4		Riñón 5	
		D	I	D	I	D	I	D	I	D	I
Bacterias con distribución multifocal en túbulo		M	NP	S	NP	L	NP	S	NP	P	NP
Microtrombo		NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP	P
Congestión tubular		L	L	NP	L	NP	L	NP	L	NP	L
Cilindros hialinos tubular		L	NP	L	P	M	P	M	P	P	P
Descamación epitelio tubular		P	NP	P	NP	NP	NP	P	NP	P	NP
Degeneración del túbulo		NP	NP	NP	NP	P	NP	L	NP	P	NP
Material eosinófilo		NP	NP	NP	NP	P	NP	P	NP	NP	NP
Necrosis tubular	<b>Cariolisis</b>	M,Dif	NP	NP	NP	L-M	NP	M	NP	NP	NP
	<b>Cariorrexis</b>	M,Dif	NP	NP	NP		NP	NP	NP	M	NP
	<b>Picnosis</b>	M,Dif	NP	M	NP		NP	M	NP	NP	NP
Bacterias con distribución multifocal en glomérulo		P	NP	S	NP	L	NP	S	NP	P	NP
Congestión glomerular		L	NP	P	NP	NP	NP	NP	NP	NP	L-M
Cilindros hialinos glomerular		NP	NP	M	P	P	NP	M	NP	NP	NP
Descamación de la cápsula de Bowman		NP	NP	NP	NP	P	NP	NP	NP	NP	NP
Descamación glomérulo		NP	NP	NP	NP	M	NP	P	NP	NP	NP
Disminución glomérulo		P	NP	NP	NP	P	NP	NP	NP	NP	NP
Aumento del espacio de Bowman		P	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP
Degeneración del glomérulo		NP	NP	NP	NP	P	NP	P	NP	P	NP
Atrofia glomerular		NP	NP	NP	NP	A	NP	NP	NP	NP	NP
Necrosis glomerular	<b>Multifocal</b>	P	NP	M	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP
	<b>Picnosis</b>	NP	NP	NP	NP	P	NP	NP	NP	NP	NP

Clasificación de las alteraciones; presente (**P**), no presente (**NP**), leve (**L**), moderado (**M**), severo (**S**), leve a moderado (**L-M**), difusa (**Dif**), lesión tipo aguda(**A**). Alteraciones en 5 biomodelos experimentales. Riñón derecho perfundido (con veneno) (**D**), riñón izquierdo no perfundido o control (sin veneno) (**I**).

## 9 DISCUSIÓN

En el departamento del Cauca, las tres especies de serpientes del género *Bothrops* (*B. asper*, *B. ayerbei* y *B. rhombeatus*) son las causantes del 95% de los accidentes ofídicos. A nivel clínico, el envenenamiento producido por estas especies presenta grandes diferencias en sus sintomatologías locales y sistémicas (Ayerbe & Rodríguez, 2008; Ayerbe & Latorre, 2010; Velasco, 2013; Rivera, 2014; Rengifo-Rios, 2017; Velasco-Reyes, 2017), razón por la cual es fundamental describir las alteraciones que ocasionan, particularmente a nivel renal, reconociendo la similitud y diferencia en la acción del veneno cómo lo sugiere (Nuñez León, 2017).

Diferentes estudios abordan que las alteraciones renales pueden ser causadas por tres procesos o mecanismos fundamentales: 1. Alteración hemodinámica, 2. Una alteración o reacción inmunológica (mediadores inflamatorios y vasoactivos), 3. Alteración nefrotóxica directa. Los daños renales después de un accidente ofídico pueden ser promovidos por la coagulación intravascular diseminada (DIC), asociado a un efecto tubulotóxico directo y las lesiones sistémicas causadas por el proceso de coagulación después de una accidente botrópico está relacionado con casos de letalidad (Havt *et al.*, 2001; Sitprija, 2008; Sitprija & Sitprija, 2012). El riñón generalmente se considera una ruta importante de la eliminación del veneno del cuerpo y la acumulación de veneno en el tejido renal pueden causar daño morfológico y disfunción renal interfiriendo con su eliminación (Mello, 2011).

Para confirmar la existencia de un efecto nefrotóxico directo, causado por el veneno de la serpiente *B. rhombeatus* en riñón, este se aisló con el fin de observar cambios significativos en los parámetros renales (PP, RVR, TFG, FU, %TNa<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Cl<sup>-</sup>), sin que influyeran las alteraciones metabólicas producidas por los diferentes órganos durante el envenenamiento botrópico. Un estudio similar que analizó parámetros renales y probó algunos bloqueadores (WEB y dexametasona) fue el de Havt *et al.*, en el 2001, evaluaron los efectos nefrotóxicos producidos por el veneno de *B. jararacussu* a concentraciones de 3,10 y 30 µg/mL en riñón aislado de rata cepa Wistar; encontraron que las alteraciones más severas se presentan en el mayor tiempo transcurrido (120 min) y con la mayor concentración (30 µg/mL). La presión de perfusión (PP) y la resistencia vascular renal (RVR) disminuyeron drásticamente, mientras que la filtración glomerular (GFR) y el flujo urinario (FU) aumentaron significativamente y por el contrario el porcentaje de transporte tubular de sodio (%TNa<sup>+</sup>) y potasio (%TK<sup>+</sup>) decrecieron.

Se ha demostrado que serpientes de un mismo género presentan efectos diferentes en los parámetros renales, esto debido a la naturaleza de su veneno y su composición. En el estudio realizado por Havt *et al.*, en el 2001 con el veneno *B. jararacussu*, se evidenció alteración en todos los parámetros renales evaluados y se sugiere que el incremento de TFG y FU es independiente de los parámetros vasoactivos de PP y RVR, siendo promovidos por el factor activador de plaquetas (PAF), el transporte tubular de sodio es probable no haya sido influenciado por PAF, pero si los del potasio, adicionalmente se propone que las miotoxinas podría estar involucradas en estos efectos (Havt *et al.*, 2001). Otro estudio sobre la nefrotoxicidad inducida por el veneno de *Bothrops leucurus*, mostró una declinación en todos los parámetros renales evaluados (PP, FU, RF, RVR, %TNa<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> y Cl<sup>-</sup>), concluyen que estas alteraciones pueden conllevar a una IRA por nefrotoxicidad directa, implicada principalmente por el mecanismo de muerte celular por necrosis (Oliveira *et al.*, en el 2013).

Un estudio en el que se aisló la lectina-C del veneno de *Bothrops pirajai* sugiere que esta proteína tiene la capacidad de activar la liberación PAF y las prostaglandinas renales podrían interferir en el transporte tubular de sodio, potasio y cloruro (Havt *et al.*, 2005). Barbosa *et al.*, en el 2002 evaluaron el efecto nefrotóxico de las miotoxinas Bmtx-I y BmtxII aisladas del veneno de *Bothrops moojeni* sobre riñón perfundido de rata y encontraron alteraciones similares a las reportadas en varios estudios sobre daño renal por envenenamiento botrópico, como reducción en PP, RVR, transporte tubular de sodio, cloro y potasio. Machado *et al.*, en el 2008, aislaron una fosfolipasa (PLA<sub>2</sub>) del veneno de *Bothrops insularis* y determinaron el efecto renal sobre riñón de rata cepa Wistar aislado perfundido; observaron un incremento de los parámetros PP, RVR, FU y GFR, una baja reabsorción tubular de sodio (%TNa<sup>+</sup>) y cloro (%TCl<sup>-</sup>) a los 120 minutos y ninguna alteración en el porcentaje de transporte de potasio; en la histopatología se observó necrosis tubular aguda.

Por otra parte, estudios con especies del mismo género, distribuidas también en el departamento del Cauca, obtuvieron resultados similares a este estudio. Velasco (2013), evaluó la nefrotoxicidad inducida por el veneno de *B. ayerbei* y observó cambios significativos en los parámetros renales, de experimento *ex vivo e in vivo* algunos resultados fueron similares a los evaluados en este estudio (experimentos *ex vivo*), tales como, declinación de PP, RVR, %TNa<sup>+</sup>, Cl<sup>-</sup> y aumento de FU y RFG. Rivera (2014) evaluó la nefrotoxicidad de *B. asper* y observó que la PP y RVR tendieron a disminuir pero no se reportan diferencias significativas respecto al control, la TFG y el transporte tubular de K<sup>+</sup> fluctuó constantemente, el flujo urinario aumentó significativamente y el transporte tubular de Na<sup>+</sup> disminuyó significativamente.

Existe evidencia de que las variaciones interespecíficas de los venenos de las especies del género *Bothrops* se ven reflejadas sus perfiles funcionales, tal como se observa al evaluar la actividad nefrotóxica mediante diferentes parámetros renales; sin embargo, la mayoría de estos trabajos sugieren la acción de las prostaglandinas, las bradicininas, el óxido nítrico y las citocinas, en la disminución de la PP y el RVR e incremento de FU y TFG. Las prostaglandinas (PGE<sub>2</sub>, PGI<sub>2</sub>) son vasodilatadores intrínsecos y actúan de modo sinérgico con otros vasodilatadores inflamatorios, como la histamina y la bradicinina. Los niveles basales de las prostaglandinas (PGE<sub>2</sub>, PGI<sub>2</sub>) son importantes en el mantenimiento del flujo sanguíneo renal y del ritmo de filtración glomerular (Rang, 2013). La acción de varias enzimas presentes en el veneno, como las metaloproteinasas, fosfolipasas A<sub>2</sub>, actúan por acción directa sobre diferentes substratos, causando daño del tejido a través de la activación/liberación de mediadores celulares y moleculares del proceso inflamatorio como leucocitos, derivados del ácido araquidónico (leucotrienos, prostaglandinas, prostaciclina), activando el sistema de complemento y de cininas, liberación de citocinas inflamatorias, como TNF- $\alpha$ , INF- $\gamma$ , IL-1 e IL-6 (Oliveira *et al.*, 2013b).

Las células renales pueden liberar bradicinina, prostaglandina y citocinas, las cuales son mediadores inflamatorios. La activación de cada uno de ellos tiene efectos diferentes sobre los parámetros renales evaluados. La bradicinina participa fisiológicamente en la regulación de la presión sanguínea y de la función renal, es un péptido vasodilatador que actúa a través de receptores B2 (tipo 2) y a su vez, estimula la liberación de óxido nítrico del endotelio renal. El óxido nítrico también es un vasodilatador que altera la dinámica renal y contribuye en el control fisiológico de la presión arterial (Filho & Zilberstein, 2000). El óxido nítrico y la bradicinina están asociados con el incremento de TFG y el FU e incide en la disminución de la PP, RVR y en la caída del porcentaje del transporte tubular de Na<sup>+</sup> y Cl<sup>-</sup>, es decir el incremento de la filtración glomerular esta dado gracias una respuesta inmunológica (Havt *et al.*, 2001; Barbosa *et al.*, 2002, 2005; Koeppen & Stanton, 2013; Oliveira *et al.*, 2013b). En este estudio, también se observó un aumento de TFG y FU y disminución de PP, RVR, %TNa<sup>+</sup> y Cl<sup>-</sup>, lo que podría estar relacionado con la presencia de péptidos potenciadores de bradicinina y óxido nítrico en el veneno de *B. rhombeatus*.

Las toxinas botrópicas contienen una variedad de PLA<sub>2</sub> miotóxicas básicas que ejercen diversos efectos biológicos en algunos tipos celulares. La actividad de las fosfolipasas da lugar a la formación de prostaglandinas vasodilatadoras renales responsables del aumento del flujo sanguíneo, la diuresis, natriuresis y caliuresis, además puede tener acción vasoconstrictora (Barbosa *et al.*, 2002). La presencia de las diferentes isoformas de PLA<sub>2</sub> en la mayoría de los venenos botrópicos

podría explicar el aumento del FU aquí reportado. Machado *et al.*, 2008 al aislar la miotoxina II PLA<sub>2</sub> del veneno de *B. insularis* cuya actividad enzimática produjo una caída en el transporte de Na<sup>+</sup> y Cl<sup>-</sup>, podría explicar el descenso significativo del transporte de electrolitos (%TNa<sup>+</sup> y Cl<sup>-</sup>) evaluados en este estudio. Se ha demostrado que el veneno de *B. leucurus*, *B. insularis* y otras especies del género *Bothrops* tiene una fuerte actividad proteolítica y puede causar efectos nocivos sobre el epitelio tubular renal. Esto también podría causar la pérdida de la función de transporte de las células epiteliales renales, reduciendo así el transporte de electrolitos como el sodio y el cloruro (Mello, 2011; Oliveira *et al.*, 2013b).

Las alteraciones hemodinámicas causadas por citocinas pro-inflamatorias y mediadores vasoactivos liberados por la acción de fosfolipasas A<sub>2</sub> y metaloproteinasas, son fundamentales en la fisiopatología de la insuficiencia renal aguda después de un accidente ofídico. Las alteraciones hemodinámicas incluyen hipotensión, aumento de la resistencia vascular renal, disminución del flujo sanguíneo renal y de la tasa de filtración glomerular (Sitprija, 2008). En contraste, este estudio mostró una alteración inversa de los parámetros renales, con excepción de la PP, lo que sugiere que estas alteraciones estarían determinadas por la acción de mediadores inflamatorios que alteran de manera inversa la hemodinámica. Barbosa *et al.*, en el 2002 sugiere que es posible que existan en el veneno de *B. moojeni* algunos péptidos específicos como potenciadores de bradicinina, los cuales alteran al disminuir RVR y PP pero que esta alteración también podría ser generada por natriuresis y kaliuresis. Lo anterior se observó al comparar la actividad de la BmTx-I, BmTx-II y el veneno completo, en donde la BmTx-I altero los parámetros PP, RVR, TFG y FU al aumentarlos y BmTx-II no altero ningún parámetro; sin embargo al observar la acción del veneno total se observó que PP y RVR disminuían mientras que el FU y TFG aumentaban, alteraciones también observadas en el presente estudio.

A nivel *in vitro* se presentan diferencias significativas entre los parámetros evaluados, posiblemente por nefrotoxicidad directa, pues al aislar el riñón, se evita que existan otros procesos metabólicos y sistémicos que interfieran con el efecto directo sobre el riñón; sin embargo es necesario conocer la acción del veneno en un sistema *in vivo* sobre los parámetros renales, donde interfieran los procesos metabólicos, ya que esta evaluación se asemeja a los posibles efectos del veneno en un accidente ofídico.

En la evaluación nefrotóxica a través de jaulas metabólicas no se observaron diferencias significativas en los parámetros evaluados, con excepción de la disminución urea plasmática, en el 50% de la DL<sub>50</sub>; el ácido úrico plasmático tuvo una tendencia a incrementar a diferencia del hallado en orina que tendió a disminuir, en la proteína urinaria en los tratamientos (25, 50 y 75%) hubo una leve

tendencia a incrementar; en la creatinina plasmática hubo una fluctuación y en la creatinina urinaria una tendencia a disminuir; finalmente la depuración de creatinina y el flujo urinario se mantuvieron constantes. A nivel histológico se notaron algunas áreas con degeneración del revestimiento tubular y focos de vacuolización tubular, alteraciones que fueron diferentes a las de los grupos control, lo que sugiere daño renal indirecto o que probablemente las alteraciones en los parámetros renales no se evidenciaron a las 24 horas, sino antes o después de las 24 horas.

Alteraciones en la creatinina y urea implican síndrome urémico secundario y necrosis tubular aguda. Los factores de riesgo asociados con el desarrollo de la IRA son: el tiempo transcurrido entre la mordedura y el tratamiento contra el envenenamiento ofídico, hipotensión, albuminuria, tiempos de coagulación prolongados, disminución de la hemoglobina y bilirrubinas aumentadas (Maruñak & Pérez, 2001; Martínez & Navas, 2014). La IRA es determinada de acuerdo a las alteraciones que se presenten en la TFG, la cual es calculada a través de la depuración de creatinina. La IRA es producida por vasoconstricción, isquemia, lesiones vasculares, depósitos de fibrina, nefrotoxicidad directa y actividad de las miotoxinas propias del veneno (Martínez & Navas, 2014).

Estudios previos han evidenciado alteraciones en TFG como consecuencia de la insuficiente perfusión renal, la cual se explica posiblemente por la acción directa de toxinas en las células de los túbulos renales desencadenando una insuficiencia renal aguda en los envenenamientos severos (Rivera, 2014; Velasco, 2013). Como consecuencia a lo anterior se desencadena una insuficiencia renal aguda en envenenamientos botrópicos severos. En estos casos se observa oliguria o anuria y se elevan las concentraciones séricas de urea y creatinina. Estudios patológicos han demostrado el desarrollo de nefrosis de nefrona distal, necrosis tubular aguda y necrosis cortical (Gutiérrez, Rojas, & Rica, 2009). El veneno de *B. rhombeatus* no muestra estas alteraciones, la TFG, se mantuvo constante impidiendo determinar un daño sobre los túbulos renales, glomerular, cortical, como generalmente ocurre con otros venenos botrópicos es decir que no existe daño sistémico que alterara los parámetros; a pesar de ello, se evidenciaron daños a nivel histológico leves que sugieren un posible efecto del veneno sobre el riñón de forma indirecta o con efectos más tardíos.

Al ocasionarse un daño renal los niveles de urea, creatinina, ácido úrico, FU, depuración de creatinina, proteína urinaria, se alteran, lo cual puede sugerir una IRA en la elevación algunos parámetros y la disminución de otros. Algunos trabajos sugieren que la actividad proteolítica de la metaloproteinasas presente en el veneno de *Bothrops* es la principal causante de los daños renales y que la acción de las fosfolipasas A<sub>2</sub>, sobre las bicapas de lípidos afectan la afluencia de

calcio y promueve la necrosis tubular, una de las principales causas de IRA (Boer-Lima & Cruz-Höfling, 1999; Boer-Lima & Cruz-Höfling, 2002; Perez & Coppo, 2004; Reyes, 2009) , sin embargo en este estudio la urea fue el único parámetro alterado significativamente decreciendo en sus niveles. La urea es un producto del metabolismo de proteínas y productos nitrogenados, como el ácido úrico, es sintetizada en su mayoría en el hígado y constituye cerca del 80% de la orina. Una cantidad elevada de urea en la sangre es indicador un daño renal. La medida del nivel de urea en la sangre permite identificar una disfunción de los riñones, particularmente una insuficiencia renal. Un nivel bajo en urea está determinado por varios factores: dieta baja en proteínas, sobre hidratación, daño hepático (Koeppen & Stanton, 2013).

Una serie de filtros presentes en el hígado, absorbe las proteínas para enviarlas hacia los riñones. Estos depuran los últimos residuos y los expulsan a través de la orina. Es la manera en la que el organismo verifica que los riñones funcionan adecuadamente. Si los riñones no funcionan bien, la eliminación de los residuos será complicada, se elevan los valores del nitrógeno ureico (Gutiérrez *et al.*, 2009) y se presentará riesgo de sufrir enfermedades, tanto renales como hepáticas; se sugiere que algunos componentes del veneno de *B. rhombeatus* fueron filtradas primero en el hígado de tal manera que este, por diferentes procesos metabólicos o inmunológicos, no permitiera su paso hasta el riñón, esto puede indicar que el nivel bajo de urea en el tratamiento del 50% de la DL<sub>50</sub>.

En cuanto a la histopatología renal de los tejidos de riñón obtenidos a través del sistema *in vivo* de jaulas metabólicas, se obtuvo alteraciones como tumefacción del epitelio tubular, dilatación de túbulos, descamación de células epiteliales del túbulo, material eosinófilo proteico en el lumen del túbulo y focos de hemorragia intersticial, estas alteraciones histológicas estuvieron presentes tanto en los grupos control , como en los grupos tratados, razón por la que la presencia de estas alteraciones en ambos grupos es a causa de manipulación quirúrgica, alteraciones que están presentes por esta causa en varias investigaciones; no obstante se visualizaron dos alteraciones renales presentes solamente en los grupos tratados con veneno de *B. rhombeatus* (25, 50 y 75% de la DL<sub>50</sub>), áreas con degeneración del revestimiento tubular y focos de vacuolización tubular. Estas alteraciones coinciden con diferentes patologías renales que causa el veneno botrópico, estas alteraciones pueden reflejar la actividad enzimática de PLA<sub>2</sub> sobre los fosfolípidos de la membrana celular y la producción de derivados de ácido araquidónico; tal como se ha reportado para el veneno de *B. insularis* ( Mendes & Pinto, 1998; Machado *et al.*, 2008; Mello, 2011).

En el sistema *in vitro*, a nivel histopatológico, en concordancia con la alteración de los parámetros renales evaluados, se observa daño nefrotóxico, en túbulos,

glomérulo y corteza renal. Algunos de los principales daños fueron leves a severos y algunos de estos afectaron directamente la funcionalidad del riñón, como la presencia de cilindros hialinos con repercusión leve y moderada en túbulo y glomérulo, descamación del epitelio tubular y glomerular, afección tubular, en corteza y médula, cambios degenerativos en túbulo, material eosinófilo, atrofia glomerular tipo agudo, aumento cápsula de Bowman y cambios necróticos como picnosis, cariorrexis, cariólisis, se debe tener en cuenta la presencia de bacterias en túbulos, corteza, médula y glomérulo que varía entre distribución focal leve, moderada a severa, alteraciones reportadas en diferentes investigaciones del efecto renal por envenenamiento botrópico ( Serra-Azul & Fonteles, 1999; Perez & Coppo, 2004; Reyes, 2009; Linardi *et al.*, 2011; Velasco, 2013; Rivera, 2014).

Las metaloproteinasas, las hialuronidasa, fosfolipasas A<sub>2</sub> y las lectinas-C pueden actuar en diferentes sustratos, causando destrucción de estructuras de tejidos renales a través de la activación / liberación de mediadores celulares y moleculares del proceso inflamatorio como prostaglandinas, citocinas y factores del complemento, lo que explicaría la gran variedad de daños en los túbulos renales y en los glomérulos en los tejidos (Barbosa *et al.*, 2002, 2005; Gutiérrez & Ownby, 2003; Havt *et al.*, 2005; Machado *et al.*, 2008).

Boer-Lima & Cruz-Höfling, 1999, encontraron alteraciones renales histopatológicas tras la inoculación intravenosa del veneno de *B. moojeni*. Mostraron que los núcleos de las diversas células tubulares proximales presentaban picnosis con aglomeración de material de cromatina; notaron la pérdida del borde en cepillo proximal, vacuolación citoplasmática y en algunos túbulos, degeneración y descamación de células necróticas, por lo que sugieren que estas alteraciones posiblemente fueron causadas por las actividades proteolíticas y fosfolipásicas del veneno (Barbosa *et al.*, 2002). También encontraron que en los túbulos había material proteico o túbulos hialinos, consecuencia de una lesión tubular epitelial por la liberación de varias proteínas liberadas en el citoplasma de las células dañadas con residuos citoplasmáticos, estos hallazgos histológicos corroboran otras lesiones encontradas en el género *Bothrops* (Havt *et al.*, 2001). Un estudio del veneno de *B. alternatus* a las 6 horas de aplicación intramuscular de 2,5 µg/g del veneno, produjo congestión glomerular, tumefacción y degeneración hidrópica de los túbulos proximales y distales, con presencia de cilindros hialinos en la luz de los túbulos. Mencionaron que las metaloproteinasas puede causar proteólisis y desestabilización de la matriz extracelular y las fosfolipasas A<sub>2</sub> pueden causar lesión de membrana y necrosis tubular, efectos que se han reportado para varias especies del género *Bothrops* (Sitprija, 2008).

Los venenos de otras especies de *Bothrops*, a dosis mínimas, ocasionan daños renales en los primeros momentos de exposición al veneno, presentándose

degeneración hidrópica en las células epiteliales de los túbulos, acompañados de cilindros hialinos en la luz tubular, dilatación de la luz y congestión renal; en horas posteriores, se describe necrosis del epitelio tubular acompañado de daño glomerular (Reyes, 2009). Probablemente esto ocurra en nuestro estudio con el veneno de *B. rhombeatus* ya que sus especies filogenéticas y geográficas más cercanas (*B. asper* y *B. ayerbei*) poseen metaloproteinasas y fosfolipasas en diferentes proporciones (Alape-Girón *et al.*, 2009; Mora-Obando *et al.*, 2014), aunque en el caso de *B. ayerbei* se le adjudica los daños renales a la actividad proteolítica de las metaloproteinasas y no tanto a las fosfolipasas, debido a que están casi ausentes en este veneno. *B. asper* contiene altos contenidos de metaloproteinasas y fosfolipasas serían las responsables de los daños renales anteriormente mencionados.

Muchos estudios mencionan que debido a la variedad en composición del veneno de las serpientes, pertenecientes al género *Bothrops* y en consecuencia a sus acciones diferentes; existen variaciones cuantitativas en el efecto proteolítico intra e interespecíficas (Lomonte & Gutiérrez, 1983). Podemos observar las variaciones interespecíficas de la acción del veneno entre serpientes geográficamente y filogenéticamente cercanas; esto se evidencia en la acción del veneno de las serpientes *B. ayerbei* y *B. asper* del departamento del Cauca, tienen una composición en su veneno similar, pero en el porcentaje de proteínas varía drásticamente (Figura 2), por esta razón la acción de su veneno a nivel renal tiende a ser diferente. Las diferencias de composición entre los venenos de las diferentes regiones geográficas pueden deberse a la presión ambiental evolutiva que actúa sobre las poblaciones aisladas (Coates & Obando, 1996; Alape-Girón *et al.*, 2008).

Al comparar los efectos nefrotóxicos producidos por los venenos de *B. ayerbei* y *B. asper* se observan diferencias significativas entre ambos, de igual manera sucede con los resultados de *B. rhombeatus* en contraste con *B. asper*; este estudio encuentra una mayor similitud con el efecto nefrotóxico reportado para *B. ayerbei* ya que se obtuvieron las mismas variaciones de los parámetros renales a nivel *in vitro* (Tabla 6), aunque con diferencias a nivel *in vivo* (Tabla 7).

**Tabla 6.** Comparación de los efectos en riñón aislado de tres venenos de serpientes del departamento del Cauca (*B. ayerbei*, *B. asper* y *B. rhombeatus*).

Parámetros Evaluados	<i>B. ayerbei</i>	<i>B. asper</i>	<i>B. rhombeatus</i>
<b>Perfusión Renal</b>			
<b>PP</b>	↓ *a,b,c	↓	↓ *a,b,c
<b>RVR</b>	↓ *a,b	↓	↓ *b,c
<b>FU</b>	↑ *b,c	↑ *b,c	↑ *b,c
<b>RFG</b>	↑ *c	/	↑ *c
<b>%TNa<sup>+</sup></b>	↓ *a,b,c	↓ *b	↓ *a,b,c
<b>%TK<sup>+</sup></b>	-	↑	↓
<b>%TCI<sup>-</sup></b>	↓	↓	↓ *a,b,c

(↑) Aumento, (↓) disminución, (\*) significativo, (-) ausencia de datos, (/) se mantuvo igual al control, (a) 60 minutos, (b) 90 minutos, (c) 120 minutos. Los resultados de los efectos renales de *B. asper* y *B. ayerbei* fueron extraídos de (Velasco, 2013; Rivera, 2014).

**Tabla 7.** Comparación de los efectos renales en sistema *in vivo* de la DL<sub>50</sub> de tres venenos de serpientes del departamento del Cauca (*B. ayerbei*, *B. asper* y *B. rhombeatus*)

Parámetros Evaluados de Jaulas metabólicas	<i>B. ayerbei</i> <sup>f</sup>	<i>B. asper</i> <sup>c</sup>	<i>B. rhombeatus</i> <sup>c</sup>
<b>Creatinina</b>	↑ *c	↑ *f	↓
<b>Urea</b>	↑ *b,c	↑	↓ *e
<b>Ácido Úrico</b>	↑ *a	↑ *f	↑
<b>Proteína Urinaria</b>	↑ *a,b	↑ *f	↑
<b>Depuración de Creatinina</b>	↓ *a, ↑ *b	↓ *e,f	/
<b>Flujo Urinario</b>	↑ *b	↑	/

(↑) Aumento, (↓) disminución, (-) ausencia de datos, (/) se mantuvo igual al control, (\*) significativo, (a) 8 horas, (b) 16 horas, (c) 24 horas, (d) 25% de DL, (e) 50% de DL, (f) 75% de DL. Los resultados de los efectos renales de *B. asper* y *B. ayerbei* fueron extraídos de (Rivera, 2014; Velasco-Reyes, 2017).

Lo anterior indica que el veneno de *B. rhombeatus* tiene un mecanismo de acción diferente al de *B. asper*, que en teoría es su especie filogenética más cercana. Estos resultados también aplican para los parámetros renales a nivel *in vivo* (jaulas metabólicas) en donde se encuentra diferencias entre la acción del veneno en contraste con *B. asper* y *B. ayerbei*, los parámetros evaluados para estas dos especies mostraron variaciones significativas que indican daños renales, lo que no sucedió con el veneno de *B. rhombeatus* cuyos parámetros evaluados a nivel *in*

*vivo* resultaron sin variaciones significativas, exceptuando la baja cantidad de urea que sugiere un daño hepático y una acción indirecta del veneno. Finalmente es imprescindible conocer la composición venómica de *B. rhombeatus* para identificar la acción de su veneno y corroborar las diferentes hipótesis creadas a partir de los resultados obtenidos en este trabajo, sobre la composición proteómica y los mecanismos de acción de las toxinas.

## 10 CONCLUSIONES

- En el sistema *in vivo* (jaulas metabólicas) evaluado con VTBr (25, 50 y 75% de la DL<sub>50</sub>) no se observaron diferencias significativas entre los parámetros renales, excepto una disminución significativa de la urea que se deba probablemente a un daño hepático y una acción indirecta del veneno sobre el riñón.
- El veneno total de *B. rhombeatus* en un sistema *in vitro* ocasiona IRA, que se evidenció por las alteraciones significativas de los parámetros renales, disminución PP, RVR, %TNa<sup>+</sup>, %TCI<sup>-</sup>, y aumento de TFG y FU. Histológicamente los daños causados por el veneno total de *B. rhombeatus*, sugieren una IRA, principalmente daños como dilatación del espacio de Bowman, procesos necróticos en los túbulos y el glomérulo.
- La elevación de TFG y FU, es una condición que se ha dado en poco estudios realizados, y la activación de este mecanismo quizá se deba a compuestos del veneno aun no reconocidos, o a un mecanismo aun no descrito, no solo en la especie *B. rhombeatus* si no también en el género *Bothrops*.
- El veneno de *B. rhombeatus* causa daños a nivel histológico en los dos sistemas evaluados *in vivo* (leve) y *ex vivo* (moderados).

## 11 RECOMENDACIONES

- Es imprescindible conocer la composición proteica del veneno de la serpiente *B. rhombeatus*, ya que junto con los diferentes estudios realizados de las actividades biológicas, se podrá tener una mejor aproximación de los efectos en el riñón.
- Es necesario, después de conocer la composición proteica del veneno, llevar a cabo análisis con las diferentes proteínas purificadas y de esta manera comprender cuales proteínas estas directamente asociadas con el efecto nefrotóxico.
- Es necesario evaluar los parámetros renales del experimento *in vivo* para confirmar o descartar las alteraciones en diferentes tiempos.
- Evaluar otros parámetros y realizar análisis histológicos en diferentes órganos, principalmente hígado y corazón, con el fin de entender el mecanismo de acción del veneno de *B. rhombeatus*.

## 12 BIBLIOGRAFÍA

- Alape-Girón, A., Flores-Díaz, M., Sanz, L., Madrigal, M., Escolano, J., Sasa, M., & Calvete, J. J. (2009). Studies on the venom proteome of *Bothrops asper*: Perspectives and applications. *Toxicon*, *54*(7), 938–948. <http://doi.org/10.1016/j.toxicon.2009.06.011>
- Alape-Girón, A., Sanz, L., Escolano, J., Flores-Díaz, M., Madrigal, M., Sasa, M., & Calvete, J. J. (2008). Snake venomomics of the lancehead pitviper *bothrops asper*. Geographic, individual, and ontogenetic variations. *Journal of Proteome Research*, *7*(8), 3556–3571. <http://doi.org/10.1021/pr800332p>
- Albuquerque, P. L. M. M., Jacinto, C. N., Silva Junior, G. B., Lima, J. B., Veras, M. D. S. B., & Daher, E. F. (2013). Acute kidney injury caused by *Crotalus* and *Bothrops* snake venom: a review of epidemiology, clinical manifestations and treatment. *Revista Do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, *55*(5), 295–301. <http://doi.org/10.1590/S0036-46652013000500001>
- Angulo, Y., & Lomonte, B. (2009). Biochemistry and toxicology of toxins purified from the venom of the snake *Bothrops asper*. *Toxicon*, *54*(7), 949–957. <http://doi.org/10.1016/j.toxicon.2008.12.014>
- Aranalde, G. (2015). *FISIOLOGÍA RENAL*. (C. Editorial, Ed.) (1a ed.).
- Athappan, G. (2008). Acute renal failure in snake envenomation: a large prospective study. *Saudi Journal of Kidney Diseases and Transplantation: An Official Publication of the Saudi Center for Organ Transplantation, Saudi Arabia*, *19*, 404–410. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18445901>
- Avendaño, L. H. (2009). Nefrología clínica. *Editorial Médica Panamericana*, *3*, 799.
- Ayerbe, S., & Latorre, J. (2010). Manual para la Prevención y Mejoramiento en la Atención del Paciente con Accidente Ofídico.
- Ayerbe, S., & Rodríguez, J. (2008). Guías Para El Manejo De Urgencias Toxicológicas Ministerio De La Protección Social, 346.
- Barbosa, P. S. F., Havt, a., Facó, P. E. G., Sousa, T. M., Bezerra, I. S. a M., Fonteles, M. C., ... Monteiro, H. S. a. (2002). Renal toxicity of *Bothrops moojeni* snake venom and its main myotoxins. *Toxicon*, *40*(10), 1427–1435. [http://doi.org/10.1016/S0041-0101\(02\)00156-3](http://doi.org/10.1016/S0041-0101(02)00156-3)
- Barbosa, P. S. F., Martins, a. M. C., Havt, a., Toyama, D. O., Evangelista, J. S. a M., Ferreira, D. P. P., ... Monteiro, H. S. a. (2005). Renal and antibacterial effects induced by myotoxin I and II isolated from *Bothrops jararacussu* venom. *Toxicon*, *46*(4), 376–386. <http://doi.org/10.1016/j.toxicon.2005.04.024>
- Bhowmik, D. (2011). Clinical approach to rapidly progressive renal failure. *The*

*Journal of the Association of Physicians of India*, 59, 38–41. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21751663>

- Boer-Lima, P. A., Gontijo, J. A. R., & Da Cruz-Höfling, M. A. (1999). Histologic and functional renal alterations caused by *Bothrops moojeni* snake venom in rats. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 61(5), 698–706. <http://doi.org/10.4269/ajtmh.1999.61.698>
- Boer-Lima, P. A., Rocha Gontijo, J. A., & Da Cruz-Höfling, M. A. (2002). *Bothrops moojeni* snake venom-induced renal glomeruli changes in rat. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 67(2 SUPPL.), 217–222.
- Borda, P., Maruñak, T., & Pérez, S. A. De. (2001). Alteraciones histopatológicas del tejido renal inducidas por veneno de serpientes ( *Bothrops neuwidii* , *Bothrops alternatus* y *Crotalus durissus terrificus* ) en ratas, (3400), 5–7.
- Botella, G. J. (2002). *Manual de nefrología clínica*. Masson, S.A (Vol. 1). MASSON.
- Campbell, J., & Lamar, W. (2004). The venomous reptiles of the western hemisphere. *Ithaca: Comstock Publishing Associates: Cornell University Press*, 1, 750.
- Cardoso, J. L. C., & França, F. O. S. (2003). Venomous animals in Brazil: biology, clinic and therapeutics of envenomations. *Revista Do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 45(6), 338. <http://doi.org/10.1590/S0036-46652003000600009>
- Castrillón-Estrada, D., Acosta, J., Hernández-ruiz, E., & Alonso, L. (2007). Envenenamiento ofídico Snake poisoning, 23(1), 96–111. Retrieved from <http://www.scielo.org.co/pdf/sun/v23n1/v23n1a10.pdf>
- Cetina, L. Y. C. (2012). Criterios técnicos, metodológicos y científicos para la vigilancia de la exposición ocupacional a contaminantes químicos en empresas sector automotor. *Universidad Nacional de Colombia*, 193.
- Coates, A. G.; Obando, J. A. (1996). The geologic evolution of the Central American Isthmus. In *In Evolution and environment in Tropical America* (University, pp. 21–56). Chicago, IL.
- Departamento Nacional De Planeación. (2011). Bases del plan nacional de desarrollo (p. 861).
- El Congreso de la República de Colombia. (2007). Ley 1122 de 2007 (Vol. 2007, pp. 1–18). Retrieved from [http://www.pos.gov.co/Documents/Archivos/Ley\\_1122\\_de\\_2007.pdf](http://www.pos.gov.co/Documents/Archivos/Ley_1122_de_2007.pdf)
- Flora Filho, R., & Zilberstein, B. (2000). Óxido nítrico: o simples mensageiro percorrendo a complexidade. Metabolismo, síntese e funções. *Revista Da Associação Médica Brasileira*, 46(3), 265–271. [63](http://doi.org/10.1590/S0104-</a></p></div><div data-bbox=)

42302000000300012

- Folleco, A. J. F. (2010). Taxonomía del complejo *Bothrops asper* (SERPIENTES: VIPERIDAE) en el sudoeste de Colombia. Revalidación de la especie *Bothrops rhombeatus* (García, 1896) y descripción de una nueva especie. *Revista Novedades Colombianas*, 0(GARCÍA), 33–70.
- García-Lledó, E., Fernández-Hernández, C., Abarca-Llorente, C., & López Del Cañizo, J. . (2002). Sistema de perfusión hipotérmica de riñón aislado controlado por ordenador. *Actas Urol Esp.*, 26 (2), 77–84.
- Gutiérrez, J. M., Chaves, F., & Bolaños, R. (1980). Estudio comparativo de venenos de ejemplares recién nacidos y adultos de *Bothrops asper*. *Revista de Biología Tropical*, 28(2), 341–351.
- Gutiérrez, J. M., & Ownby, C. L. (2003). Skeletal muscle degeneration induced by venom phospholipases A2: Insights into the mechanisms of local and systemic myotoxicity. *Toxicon*, 42(8), 915–931. <http://doi.org/10.1016/j.toxicon.2003.11.005>
- Gutiérrez, J. M., Rojas, G., & Rica, U. D. C. (2009). El envenenamiento por mordedura de serpiente en Centroamérica. *Facultad de Microbiología*, 29.
- Havt, A., Oyama, M. H., Do Nascimento, N. R. F., Toyama, D. O., Nobre, A. C. L., Martins, A. M. C., ... Monteiro, H. S. A. (2005). A new C-type animal lectin isolated from *Bothrops pirajai* is responsible for the snake venom major effects in the isolated kidney. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 37(1), 130–141. <http://doi.org/10.1016/j.biocel.2004.06.003>
- Havt, a, Fonteles, M. C., & Monteiro, H. S. (2001). The renal effects of *Bothrops jararacussu* venom and the role of PLA(2) and PAF blockers. *Toxicon: Official Journal of the International Society on Toxinology*, 39(12), 1841–6. [http://doi.org/10.1016/S0041-0101\(01\)00146-5](http://doi.org/10.1016/S0041-0101(01)00146-5)
- Incio, R., & Incio, L. (1993). Toxicidad y neutralización de venenos ofídicos peruanos de los géneros *Bothrops* y *Lachesis* (Serpentes: Viperidae). *Rev. Biol Trop.*, 41(3), 351–357.
- Koeppen, B. M., & Stanton, B. A. (2013). *Renal Physiology* (5ta ed.).
- Kurien, B., Everds, N., & Scofield, H. (2004). Recolección experimental de orina en animales. *Laboratory Animals*, 38, 333–361.
- León-Nuñez, J., & Rojas, A. (2017). INFORME DEL EVENTO ACCIDENTE OFÍDICO HASTA EL PERIODO EPIDEMIOLÓGICO XIII Colombia, 2017. *Instituto Nacional de Salud- SIVIGILA*, 30.
- Liévano-Bonilla, A. F. (2016). *COMPARACIÓN MORFOLÓGICA DE TRES POBLACIONES DE SERPIENTES DEL COMPLEJO Bothrops asper (SERPENTES: VIPERIDAE) DEL SUROCCIDENTE COLOMBIANO.*

Universidad del Cauca.

- Linardi, A., Rocha E Silva, T. A. A., Miyabara, E. H., Franco-Penteado, C. F., Cardoso, K. C., Boer, P. A., ... Hyslop, S. (2011). Histological and functional renal alterations caused by *Bothrops alternatus* snake venom: Expression and activity of Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*, 1810(9), 895–906. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbagen.2011.06.006>
- Lomonte, B., & Gutiérrez, J. M. (1983). B runo Lomonte y José M aría Gutiérrez. *Revista de Biología Tropical*, 31(1), 37–40.
- Lynch, J. D. (2012). El Contexto De Las Serpientes De Colombia Con Un Análisis De Las Amenazas En Contra De Su Conservación. *Revista de La Academia Colombiana de Ciencias ...*, (2), 435–449. Retrieved from [http://www.scielo.org.co/scielo.php?pid=S0370-39082012000300009&script=sci\\_arttext&tlng=es](http://www.scielo.org.co/scielo.php?pid=S0370-39082012000300009&script=sci_arttext&tlng=es)
- Machado, B., Davis, M., Costa, M. A. M., Alves, C. D., Beserra, D., Martins, R. D., ... Azul, M. H. S. (2008). Purification and renal effects of phospholipase A2 isolated from *Bothrops insularis* venom. *Toxicon*, 51, 181–190.
- Martínez, G. A. A., Freja, A. G., Ruiz, E. A. H., Bautista, E. M. C., & Navas, E. G. G. (2014a). Insuficiencia renal aguda inducida por mordedura de serpiente *Bothrops* Acute renal failure induced by *Bothrops* snake bite, 30(2), 258–261.
- Martínez, G. A. A., Freja, A. G., Ruiz, E. A. H., Bautista, E. M. C., & Navas, E. G. G. Insuficiencia renal aguda inducida por mordedura de serpiente *Bothrops* Acute renal failure induced by *Bothrops* snake bite (2014). Retrieved from <http://www.scielo.org.co/pdf/sun/v30n2/v30n2a17.pdf>
- Martínez, M., Rodicio, J., & Herrera, J. (1993). Tratado de nefrología. *Ediciones Norma Madrid*, 1, 86.
- Maruñak, S. L. (2006). Acción del veneno de *Bothrops jararacussu* de Argentina sobre la coagulación sanguínea. *InVet Ciudad Autonoma de Buenos Aires*, 8, 119–128.
- Mello, C. P. (2011). *ESTUDO IN VITRO DA NEFROTOXICIDADE DO VENENO TOTAL E FRAÇÃO FOSFOLIPASE A2 DA SERPENTE Bothropoides insularis (AMARAL, 1921)*. UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ FACULDADE DE FARMÁCIA, ODONTOLOGIA E ENFERMAGEM.
- Mendes, L., & Pinto, D. O. (1998). Revisão / Atualização em Nefrologia Clínica : Células mesangiais e matriz mesangial : sua interação mediando o processo de cronificação da lesão glomerular, 20(2), 178–185.
- Mora-Obando, D., Guerrero-Vargas, J. A., Prieto-Sánchez, R., Beltrán, J., Rucavado, A., Sasa, M., ... Lomonte, B. (2014). Proteomic and functional profiling of the venom of *Bothrops ayerbeii* from Cauca, Colombia, reveals

- striking interspecific variation with *Bothrops asper* venom. *Journal of Proteomics*, 96, 159–172. <http://doi.org/10.1016/j.jprot.2013.11.005>
- Muñoz, L. . (2016). DETERMINACIÓN DEL PODER NEUTRALIZANTE DEL SUERO SANGUÍNEO DE *Didelphis marsupialis* (LINNEAUS, 1758) Y DEL SUERO ANTIOFIDICO PRODUCIDO POR EL INSTITUTO NACIONAL DE SALUD USANDO EL VENENO DE TRES POBLACIONES DE ***Bothrops asper*** (GARMAN, 1883) DEL SUROCCIDENTE. Universidad del Cauca.
- Navia-Pizo, R. E. (2005). Determinación de la Dosis Letal 50 Del Veneno de Tres Poblaciones de *Bothrops asper* (Serpentes:Viperidae) y su Incidencia Epidemiologica en el Departamento del Cauca, Colombia. *Universidad Del Cauca*.
- Nuñez León, L. J. (2016). INFORME DEL EVENTO ACCIDENTE OFIDICO, COLOMBIA, 2016. *Instituto Nacional de Salud- SIVIGILA*, 33.
- Nuñez León, L. J. (2017). INFORME DEL EVENTO ACCIDENTE OFÍDICO HASTA EL PERIODO EPIDEMIOLÓGICO X Colombia, 2017. *Instituto Nacional de Salud- SIVIGILA*, 30.
- Oliveira, I. C., Torres, A. F. C., Pereira, G. J. D. S., Pereira, T. P., Pessoa Bezerra de Menezes, R. R. D. P., Mello, C. P., ... Martins, A. M. C. (2013a). *Bothrops leucurus* venom induces nephrotoxicity in the isolated perfused kidney and cultured renal tubular epithelia. *Toxicon*, 61, 38–46. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.1016/j.toxicon.2012.10.005>
- Oliveira, I. C., Torres, A. F. C., Pereira, G. J. da S., Pereira, T. P., Pessoa Bezerra de Menezes, R. R. de P., Mello, C. P., ... Martins, A. M. C. (2013b). *Bothrops leucurus* venom induces nephrotoxicity in the isolated perfused kidney and cultured renal tubular epithelia. *Toxicon*, 61(1), 38–46. <http://doi.org/10.1016/j.toxicon.2012.10.005>
- Otero, R., Tobón, G. S., Gómez, L. F., Osorio, R. G., Valderrama, R., Hoyos, D., ... Arboleda, J. J. (1992). Accidente ofídico en Antioquia y Chocó. *Aspectos Clínicos Y Epidemiológicos (Marzo de 1989-Febrero de 1990) Acta Med Colomb*, 17, 229–249. Retrieved from <http://www.actamedicacolombiana.com/anexo/articulos/04-1992-04-.pdf>
- Patiño, B. (2002). Serpientes Venenosas, 212(1), 37–42.
- Pereira, T. P. (2009). Estudo dos efeitos renais e vasculares do veneno da serpente *Crotalus durissus cumanensis* e crotoxina. *UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ FACULDADE*.
- Perez, O. A. D. E., & Coppo, N. M. D. E. (2004). Daño renal en ratas inducido por veneno de *Bothrops neuwiedii diporus* de Argentina. *Medicina*, 320–324.
- Pinho, F., & Burdmann, E. (2008). Snakebite-induced acute kidney injury in Latin America. *Seminars in Nephrology*, 28, 354–362.

- Portilla, M. B., Andrés, R., Lozano, M., Nel, P., Cardona, B., Alejandra, M., & Pérez, G. (2014). Conocimiento del manejo del accidente ofídico en instituciones hospitalarias en el Valle del Cauca , 2012. *Ciencia & Salud.*, 2(7), 27–31.
- Rang, H. P. (2013). Pharmacology: Its role in drug discovery,. In H. R. RG Hill (Ed.), *Pharmacology* (Edition), pp. 157–170).
- Rengifo-Rios, A. (2017). *ESPECIFICACIÓN DE LA ACTIVIDAD NEUTRALIZANTE DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE Piper auritum (Kunth, 1816) CONTRA EL VENENO DE Bothrops asper (SERPENTES: VIPERIDAE) DE LA POBLACIÓN DE LA CUENCA DEL RÍO CAUCA*. Universidad del Cauca.
- Reyes, A. (2009). Alteraciones histológicas en riñones de ratas , inducidas por dosis bajas del veneno de la serpiente *Bothrops asper* . Histological injuries in rat ' s kidneys induced to low dose of snake ' s poison *Bothrops asper* . *Revista Electronica de Veterinaria*, 10, 1–11.
- Rivera, P. M. del M. (2014). Evaluación de la actividad nefrotóxica del veneno de la serpiente *Bothrops asper* (Garman, 1883) en ratas cepa wistar, células MDCK Y LLC-MK2. *Universidad Del Cauca*.
- Sarmiento, K. (2012). Aspectos biomédicos del accidente ofídico. *Univ. Méd. Bogotá (Colombia)*, 53((1)), 68–85.
- Serra-Azul, H., & Fonteles, M. C. (1999). The Effect of *Bothrops Jararaca* Venom on Rat Kidney After Short-Term Exposure : Preliminary Results. *Pharmacology and Toxicology*, 85(table I), 198–200.
- Sifuentes, D. N., El-Kik, C. Z., Ricardo, H. D., Tomaz, M. a., Strauch, M. a., Calil-Elias, S., ... Melo, P. a. (2008). Ability of suramin to antagonize the cardiotoxic and some enzymatic activities of *Bothrops jararacussu* venom. *Toxicon*, 51, 28–36. <http://doi.org/10.1016/j.toxicon.2007.07.002>
- Silverthorn, D. U. (2010). *Fisiología Humana - Uma Abordagem Integrada*. (Porto Alegre: Artmed., Ed.) ((5ta ed. )).
- Sitprija, V. (2008). Animal toxins and the kidney. *Nature Clinical Practice Nephrology*, 4(11), 616–627. <http://doi.org/10.1038/ncpneph0941>
- Sitprija, V., & Sitprija, S. (2012). Renal effects and injury induced by animal toxins. *Toxicon*, 60(5), 943–953. <http://doi.org/10.1016/j.toxicon.2012.06.012>
- The Lancet. (2017). Snake-bite envenoming: a priority neglected tropical disease. *The Lancet*, 390(10089), 2. [http://doi.org/10.1016/S0140-6736\(17\)31751-8](http://doi.org/10.1016/S0140-6736(17)31751-8)
- Velasco-Reyes, M. A. (2017). *ANÁLISE DOS BIOMARCADORES PRECOCES DA LESÃO RENAL PROMOVIDOS PELO VENENO DA SERPENTE COLOMBIANA Bothrops ayerbeii EM RATOS*. UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ FACULDADE DE MEDICINA.

- Velasco, R. M. A. (2013). Evaluación de los efectos renales inducidos por el veneno de la serpiente *Bothrops ayerbei* Folleco, 2010 en ratas wistar, ratón albino suizo y células MDCK. *Universidad Del Cauca*.
- Wallach, V. (2014). *Snakes of the world a catalogue of living and extinct species. Statewide Agricultural Land Use Baseline 2015* (Vol. 1). <http://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
- Walteros, D., & Paredes, A. (2014). Vigilancia y Analisis del Riesgo en Salud Pública Protocolo de Vigilancia en Salud Pública ACCIDENTE OFIDICO, 1–29.
- Zambrano, O. Á. M. (2012). Accidente ofídico como evento de interés en salud pública en Colombia: aportes al diseño de estrategias de gestión. *Universidad Nacional de Colombia*, 109.