

DETERMINACIÓN DEL EFECTO CITOTÓXICO Y GENOTÓXICO DEL VENENO
DE SERPIENTE *Bothrops asper* (VIPERIDAE) EN ERITROCITOS DE SANGRE
PERIFÉRICA DE RATONES (*Mus musculus*) MEDIANTE
LA PRUEBA DE MICRONÚCLEOS

FELIPE YASNÓ VARILA

UNIVERSIDAD DEL CAUCA
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES, EXACTAS Y DE LA EDUCACIÓN
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA
POPAYÁN
2005

DETERMINACIÓN DEL EFECTO CITOTÓXICO Y GENOTÓXICO DEL VENENO
DE SERPIENTE *Bothrops asper* (VIPERIDAE) EN ERITROCITOS DE SANGRE
PERIFÉRICA DE RATONES (*Mus musculus*) MEDIANTE
LA PRUEBA DE MICRONÚCLEOS

FELIPE YASNÓ VARILA

Trabajo de Grado para optar el título de
Biólogo

Director

Mg. SILVIO M. CARVAJAL

Asesores

M.D. SANTIAGO AYERBE

Biol. JIMMY GUERRERO

UNIVERSIDAD DEL CAUCA
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES, EXACTAS Y DE LA EDUCACIÓN
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA
POPAYÁN
2005

Nota de Aceptación

Director Mg. Silvio Carvajal Varona

Jurado Mg. Nelson Rojas Martínez

Jurado Ph.D. Nohelia Cajas Salazar

Lugar y Fecha de Sustentación: Popayán, 21 de Octubre de 2005

A mis padres Abilio y María Inés
A mis hermanos Julián y Fernanda
A mis compañeros y amigos.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a Dios por la sabiduría, el entendimiento y la ciencia otorgada para realizar con satisfacción esta investigación y poder así terminar de manera exitosa esta etapa de mi vida.

A mis padres, Abilio y María Inés, quienes han sido, desde el principio, el motor espiritual y sabio en mi formación personal y académica, para conducirme con gran éxito hacia este logro.

A mis hermanos, Fernanda y Julián, por su compañía durante este trabajo, por su apoyo sin condiciones y el ánimo necesario para seguir luchando.

Al Mg. Silvio Carvajal, por su dedicación y tiempo para dirigir esta investigación y los grandes aportes académicos realizados.

Al MD. Santiago Ayerbe y al Biólogo Jimmy Guerrero, por los aportes científicos y de infraestructura y la excelente asesoría para la ejecución correcta de este proyecto.

A mis profesores de la línea de énfasis en Toxicología Genética y Citogenética, Mg. Luz Stella Hoyos, Ph.D. Noelia Cajas y Mg. Edna Orozco por la excelente formación académica recibida y la asesoría para este trabajo.

Al biólogo Humberto Granados, por su asesoría y la colaboración en la consecución de los animales objeto de experimentación.

A la auxiliar Elsa Velazco, por ser mi mano derecha en la parte de trabajo y manejo de laboratorio.

Al grupo de Investigaciones Herpetológicas y Toxinológicas por su colaboración en el manejo de los animales objeto de experimentación.

Al Grupo de Investigación en Toxicología Genética y Citogenética, por su colaboración y aportes a este trabajo.

TABLA DE CONTENIDO

	Pág.
INTRODUCCIÓN	13
1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	14
2. JUSTIFICACIÓN	16
3. IMPACTO	18
4. OBJETIVOS	19
4.1 OBJETIVO GENERAL	19
4.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS	19
5. ANTECEDENTES	20
5.1 ANTECEDENTES MOLECULARES	20
5.2 ANTECEDENTES GENOTÓXICOS	21
6. MARCO TEORICO	22
6.1 RESEÑA HISTÓRICA	22
6.2 DISTRIBUCIÓN GENERAL DE LAS SERPIENTES	24

6.3	TOXINAS OFÍDICAS	24
6.4	COMPONENTES DE LOS VENENOS	25
6.5	VARIABILIDAD DE LA CONCENTRACIÓN DE LOS COMPONENTES	25
6.6	PROPIEDADES TÓXICAS DE LOS VENENOS	26
6.7	<i>Bothrops asper</i>	29
6.7.1	Taxonomía	30
6.7.2	Características morfológicas	30
6.7.3	Hábito	30
6.7.4	Reproducción	31
6.7.5	Actividades enzimáticas del veneno de <i>Bothrops asper</i>	31
6.7.6	Envenenamiento bothrópico	31
6.8	PRUEBAS BIOLÓGICAS	32
6.8.1	Dosis letal 50 (DL ₅₀)	32
6.8.2	Hemocitopoyesis	33
6.8.3	Pruebas Citotóxicas	33

6.8.4	Prueba de micronúcleos	33
7.	HIPÓTESIS	35
8.	METODOLOGÍA Y DISEÑO EXPERIMENTAL	36
8.1	TIPO DE ESTUDIO Y VARIABLES	36
8.2	ANIMALES OBJETO DE EXPERIMENTACIÓN	36
8.3	CUANTIFICACIÓN DEL VENENO DE <i>Bothrops asper</i> (mg DE PROTEÍNA)	37
8.4	DETERMINACIÓN DEL EFECTO TÓXICO (DL ₅₀)	37
8.5	SELECCIÓN DE LAS DOSIS EXPERIMENTALES	38
8.6	DISTRIBUCIÓN Y TRATAMIENTO DE LOS ANIMALES	39
8.7	EFECTO CITOTÓXICO	39
8.8	EFECTO GENOTÓXICO	40
8.9	PROTOCOLO DE MICRONÚCLEOS EN ERITROCITOS DE SANGRE PERIFÉRICA DE RATONES UTILIZADO EN LA EVALUACIÓN CITOTÓXICA Y GENOTÓXICA	41
9.	RESULTADOS	42
9.1.	CONCENTRACIÓN PROTEICA DEL VENENO DE <i>Bothrops asper</i>	42
9.2.	EFECTO TÓXICO (DL ₅₀)	42

9.3	DETERMINACIÓN DE LA DMT Y DEMÁS TRATAMIENTOS	44
9.4	EFEECTO CITOTÓXICO	44
9.5	EFEECTO GENOTÓXICO	47
10.	DISCUSIÓN DE RESULTADOS	52
11.	CONCLUSIONES	58
12.	RECOMENDACIONES	59
	BIBLIOGRAFIA	60

LISTA DE TABLAS

	Pag.
Tabla 1. Clasificación del veneno de serpientes de acuerdo a sus propiedades tóxicas y bioquímicas	27
Tabla 2. Principales toxinas aisladas en géneros de serpientes venenosas colombianas	27
Tabla 3. Número de células analizadas para cada animal en cada uno de los tratamientos para la hora 48 y 72	40
Tabla 4. Valores obtenidos, en volumen y concentración, de la cuantificación del veneno de <i>Bothrops asper</i>	42
Tabla 5. Valores obtenidos para la determinación de la DL ₅₀ del veneno de <i>Bothrops asper</i>	43
Tabla 6. Promedio de EPC/3000 ENC obtenidos al evaluar las muestras de sangre de 7 ratones por tratamiento, a las 48 y 72 horas de administradas las dosis	44
Tabla 7. Promedio de MN/3000 EPC obtenidos al evaluar las muestras de sangre de 7 ratones por tratamiento, a las 48 y 72 horas de administradas las dosis	48

LISTA DE FIGURAS

	Pag.
Figura 1. Promedio de producción de veneno, en mg/mL, de serpientes representativas de la familia <i>Viperidae</i>	26
Figura 2. Reacciones en la fase aguda por envenenamiento bothrópico	29
Figura 3. Aspecto morfológico de <i>Bothrops asper</i>	29
Figura 4. Disposición morfológica de colmillos y escamas de <i>Bothrops asper</i>	30
Figura 5. DL ₅₀ de serpientes más representativas de la familia <i>Viperidae</i> determinadas por vía intraperitoneal	32
Figura 6. Tiempos de muestreo después de aplicar el tratamiento	39
Figura 7. Eritrocitos policromáticos en eritrocitos normocromáticos	45
Figura 8. Promedio total de EPC/3000 ENC inducido por el veneno de <i>Bothrops asper</i> a las 48 y 72 horas después del tratamiento	45
Figura 9. Número promedio de EPC/3000ENC a 48 h. en los diferentes tratamientos	46
Figura 10. Número promedio de EPC/3000ENC a 72 h. en los diferentes tratamientos	47
Figura 11. Micronúcleo en eritrocito policromático inducidos por el veneno de <i>Bothrops asper</i>	49
Figura 12. Eritrocito policromático con 4 micronúcleos inducido por el veneno de <i>Bothrops asper</i>	49
Figura 13. Promedio total de MN/3000 EPC inducido por el veneno de <i>Bothrops asper</i> a las 48 y 72 horas después del tratamiento	50

Figura 14. Número promedio de MN/3000EPC a 48 h. en los diferentes tratamientos	51
Figura 15. Número promedio de MN/3000EPC a 72 h. en los diferentes tratamientos	51
Figura 16. Punto de formación de micronúcleos en eritroblastos durante la interfase del ciclo celular y su manifestación en eritrocitos policromáticos (EPCMN) en ratones	55
Figura 17. Inducción de micronúcleos en fase temprana de la interfase	56
Figura 18. Inducción de micronúcleos en fase intermedia de la interfase	56

INTRODUCCIÓN

En el mundo se reportan hasta 2'700.000 casos de envenenamiento ofídico al año (Warrell, 1993), con un incremento cada vez mayor, constituyéndose en un problema de salud pública que ha obligado a los centros de investigación y a las instituciones gubernamentales a investigar los mecanismos químicos y biológicos de las toxinas ofídicas con el fin de analizar su modo de acción y comportamiento para combatir este problema, y así disminuir los índices de mortalidad que se presentan.

En Colombia, los géneros *Bothrops*, *Bothrocophias*, *Bothriechis*, *Bothriopsis* y *Porthidium*, son los responsables del 95-99% de los accidentes ofídicos. *Bothrops asper* ocasiona entre el 80 y el 90% de las mordeduras en el noroccidente del país con una mortalidad del 5% aproximadamente, y secuelas atribuibles a complicaciones generadas por los rápidos efectos de los venenos y por la tardía iniciación del tratamiento específico (Otero *et al.*, 2001).

Los venenos en general están constituidos por un conjunto de enzimas, como fosfolipasas, enzimas coagulantes, proteolíticas, péptidos con acción farmacológica y toxinas no enzimáticas, así como compuestos aniónicos y catiónicos, que van a definir el efecto del veneno dentro del cuerpo de la víctima (Gutiérrez *et al.*, 1984). Estas propiedades bioquímicas y sus efectos han motivado a los científicos hacia la investigación de las propiedades de los venenos, principalmente en sus actividades neurotóxicas y hemotóxicas, en estudios *in vivo*, principalmente en ratones, para identificar la acción hemorrágica, las propiedades cardiovasculares, la destrucción neuronal y las complicaciones renales, entre otros.

Luego de hacer una revisión en MedLine, ToxNet y ScienceDirect, se puede concluir que posiblemente no se han realizado estudios para evaluar el efecto citotóxico y genotóxico del veneno de serpientes y en especial de *Bothrops asper*.

El objetivo de este estudio fue determinar el efecto citotóxico y genotóxico *in vivo* del veneno crudo de serpiente *Bothrops asper* en eritrocitos de sangre periférica de ratones (*Mus musculus*) mediante la prueba de micronúcleos, como un indicador o biomarcador de daño al material genético, con el propósito de prever los potenciales riesgos de salud a largo plazo en personas expuestas al veneno y el posible desarrollo de enfermedades por predisposición.

1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Los accidentes producidos por mordeduras de ofidios se han descrito desde los inicios de la humanidad. En los últimos años, en el mundo se han reportado alrededor de 120.000 a 130.000 muertes anuales ocasionadas por la mordedura de serpientes venenosas, por lo que constituye un problema de salud pública sobre todo en los países que cuentan con una gran diversidad de ecosistemas naturales que albergan una gran variedad de ofidios (Warrell, 1993). En algunos países de Asia y África, con altísimas tasas de incidencia, el ofidismo ha sido considerado dentro de las llamadas “enfermedades catastróficas”.

Actualmente en el mundo se han clasificado entre 3500 y 4000 especies de serpientes, de las cuales el 12-15% son venenosas y representan un riesgo para la salud y vida de la población humana. En Colombia se han descrito unas 380 especies, de las cuales, cerca de 50 son venenosas y potencialmente letales (Otero *et al.*, 2001). Las serpientes venenosas de Colombia pertenecen a dos familias: *Viperidae* y *Elapidae*.

La mayor frecuencia de envenenamiento ofídico se produce principalmente en los países en vías de desarrollo del área tropical y subtropical del planeta (Warrell, 1993). Las consecuencias de este problema en estos países han sido subestimadas por los gobiernos y autoridades de salud pública, nunca han sido verdaderamente registradas estadísticamente como problema y en su mayoría han sido tratadas con procedimientos indebidos y riesgosos (Rodríguez Acosta, 2003).

En Colombia se reporta oficialmente un promedio de 4.000 a 5.000 casos al año, de los cuales aproximadamente el 10% conduce a la muerte de la víctima (Otero *et al.*, 2001); pero dado el notable subregistro existente en muchas regiones del país, la deficiencia de algunos de los sistemas estadísticos regionales, así como los muchos casos que por diversas razones no llegan a los centros hospitalarios, es muy posible que dicha cifra sea muy superior, incluso el doble o más (Otero *et al.*, 2001). En el departamento del Cauca, entre el año 2002 y 2003 se registraron 65 casos de accidentes ofídicos y los casos de mordeduras que no son reportados podrían ser equivalentes al 50% de los que se registran (Orozco, 2004).

Con la excepción de estudios esporádicos llevados a cabo por investigadores en el área, el problema del ofidismo se halla en completo abandono, aún a nivel internacional. Es probable que debido al aislamiento de algunas toxinas del veneno de serpientes que actúan selectivamente sobre ciertos canales iónicos o sobre el sistema hemostático (Markland, 1998), este tema ha atraído recientemente la atención y preocupación del mundo científico. Sin embargo, el impacto de esos descubrimientos recientes sólo ha servido para desarrollar herramientas que reconocen canales iónicos o sirven para mapear ciertos receptores. La utilización de esos hallazgos para desarrollar protocolos de tratamiento del envenenamiento ofídico o para explicar los efectos fisiopatológicos del veneno de serpientes, ha sido muy escasa (Rodríguez-Acosta *et al.*, 1995).

Si en Colombia, *Bothrops asper* genera entre el 80 y el 90% de los accidentes ofídicos y aproximadamente el 90% sobreviven, es muy importante evaluar los efectos citotóxicos y genotóxicos que puede tener el veneno de esta serpiente, como indicador del riesgo potencial en salud e identificar el potencial riesgo de salud que podrían adquirir las personas que sufren envenenamiento bothrópico.

Los resultados de esta investigación responderán las siguientes preguntas:

¿El veneno crudo de *Bothrops asper* tiene propiedades citotóxicas que generen muerte celular e impida la proliferación normal de eritrocitos en sangre periférica de ratón?

¿El veneno crudo de *Bothrops asper* tiene características potencialmente genotóxicas que induzcan micronúcleos en eritrocitos de sangre periférica de ratón?

2. JUSTIFICACIÓN

Por ser el ofidismo un problema de salud, la importancia de estudiar el efecto tóxico de los venenos de ofidios radica en que, en la mayoría de los países que albergan serpientes, se reportan accidentes ofídicos en una cantidad relativamente alta, pero solo un menor porcentaje de ellos mueren a causa de estos accidentes. Esto indica que las personas que sobreviven, sufren una serie de consecuencias perjudiciales dentro de sus organismos que desencadenan problemas de salud a mediano y largo plazo, como hemorragias, hipertensión, insuficiencia renal, edema pulmonar, trastornos severos de la coagulación, necrosis locales, etc.

El problema del ofidismo ha sido abordado básicamente desde el punto de vista clínico (Hudleson, 1995). Las pocas revisiones publicadas hasta hace algunos años se han ocupado solamente de aspectos particulares de estos venenos. Por ejemplo, efectos hematológicos (Markland, 1998), toxicidad muscular (Ownby *et al.*, 1990), toxicidad renal (Sitprijia, 1979; Soe-Soe *et al.*, 1989), acción cardiovascular (Russel *et al.*, 1997), estructura de las toxinas (Kini & Evans, 1987), mecanismos de acción y características diagnósticas de los ofidios envueltos en los accidentes (Rodríguez-Acosta, 1995).

Sin embargo, los autores, prácticamente en su totalidad, nunca han correlacionado el mecanismo molecular de la acción del veneno ofídico al conocimiento de los efectos toxicológicos del envenenamiento, o a los daños que estos venenos ocasionarían a nivel del material genético en las células afectadas, es decir, un efecto genotóxico, que a mediano o largo plazo, pueda generar el desarrollo de ciertas enfermedades debido a la acción tóxica del veneno, por lo cual se hace importante demostrar si el veneno crudo de serpiente *Bothrops asper*, presenta características citotóxicas y genotóxicas que nos permita conocer el riesgo a largo plazo que tendrían las personas afectadas en desarrollar estas enfermedades en donde se vea involucrado el material genético.

A raíz de estas implicaciones, se tuvieron en cuenta cuatro criterios fundamentales para escoger a *Bothrops asper* como la especie a la cual se le realizaría la determinación citotóxica y genotóxica de su veneno:

1. **Falta de información sobre los efectos genotóxicos de los venenos de origen animal en el mundo.** Al revisar la bibliografía correspondiente a las investigaciones con toxinas de origen animal, y en especial con las de origen ofídico, todas estas están enfocadas desde el punto de vista clínico y van dirigidas a determinar sus propiedades neurotóxicas, hemotóxicas, miotóxicas, entre otras, a establecer sus efectos locales y sistémicos en las personas afectadas y a determinar sus compuestos orgánicos e inorgánicos que las forman. Pero se desconoce, de manera absoluta, si estos compuestos de los venenos interactúan con el material genético, lo que hace trascendental utilizar un biomarcador que permita, no solo establecer si existe o no interacción con el ADN, sino también asociarlo al desarrollo de posibles enfermedades de origen mutagénico.

2. **La baja tasa de mortalidad.** Al estimarse el porcentaje de letalidad del ofidismo en Colombia entre 0,04 y 7,6%, se puede deducir que el porcentaje de supervivencia a estos accidentes ofídicos son altos (entre 92,4 y 99,96%). Esto indica la importancia de saber, a mediano o largo plazo, qué sucedería a nivel citotóxico y genotóxico, con la población que sobrevive al fenómeno del ofidismo y las posibles complicaciones a la que estaría expuesta, lo cual hizo importante, pero ante todo, pertinente, el desarrollo de esta investigación.
3. **La incidencia de *Bothrops asper* en los accidentes ofídicos.** Si del porcentaje total de accidentes ofídicos la serpiente *Bothrops asper* es responsable del 80 – 90% de dichos accidentes, se hace oportuno y muy acertado investigar sus posibles propiedades citotóxicas y genotóxicas que tiene su veneno, que estén afectando a las personas mordidas, las cuales ocupan el mayor número dentro del total de personas afectadas, lo que muestra la conveniencia y lo primordial de trabajar con el veneno de esta especie, antes que de alguna otra.
4. **La zona del departamento del Cauca con mayor frecuencia de ofidismo por parte de *Bothrops asper*.** Una vez determinada *Bothrops asper* como la especie objeto de investigación, se tuvo en cuenta, de manera primordial, aquella zona geográfica del departamento donde existiera mayor frecuencia de ofidismo por parte de esta especie, para escoger su procedencia, ya que se encuentra distribuida en todo el departamento. Esta zona corresponde al municipio del El Tambo ubicado en el centro del departamento del Cauca a una altura de 1745 m.s.n.m, lugar de procedencia de la especie objeto de esta investigación.

3. IMPACTO

El alto índice de accidentes ofídicos que se reportan en el mundo desde mucho tiempo atrás, han impulsado los esfuerzos de químicos, biólogos y médicos en entender los mecanismos de acción bioquímica de los venenos de serpientes en las personas que sufren dichos accidentes, con el propósito de contrarrestar las posibles complicaciones que estos accidentes generen en las víctimas mediante el uso de sueros antiofídicos y medicamentos que actúan directamente en los tejidos afectados.

Como ya se afirmó anteriormente, los accidentes ofídicos han sido ampliamente analizados desde el punto de vista clínico. Los científicos, en las investigaciones que han realizado acerca de estos venenos, han reportado sus propiedades tóxicas en los tejidos, actividad hemorrágica, toxicidad renal y neuronal, complicaciones cardiovasculares, entre otros. Pero al no haberse abordado acerca de cuáles serían sus propiedades genotóxicas, el presente estudio se hace prácticamente nuevo, y adquiere una gran importancia pues permitiría conocer si el veneno de *Bothrops asper*, posee propiedades citotóxicas y genotóxicas, constituyéndose en un valioso aporte a la literatura científica.

Además del aporte científico, esta investigación presenta un impacto social, pues mediante el uso de biomarcadores para determinar propiedades genotóxicas, como es el de micronúcleos, se puede predecir el potencial riesgo de adquirir futuras enfermedades de tipo mutagénico como el cáncer, teniendo en cuenta que en Colombia *Bothrops asper* es responsable del 80-90% de los accidentes ofídicos, y tan solo del 5 al 10% de los afectados conlleva a la muerte.

4. OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GENERAL

Determinar el efecto citotóxico y genotóxico *in vivo* del veneno crudo de serpiente *Bothrops asper* en eritrocitos de sangre periférica de ratones (*Mus musculus*) mediante el biomarcador Micronúcleos.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Encontrar la concentración proteica, (mg/mL), del veneno puro de *Bothrops asper* del municipio de El Tambo, departamento del Cauca, mediante la técnica de espectrofotometría, para determinar las concentraciones de los diferentes tratamientos.
- Establecer la Dosis Letal 50 (DL50) en ratones *Mus musculus* del veneno crudo de *Bothrops asper* para encontrar tres concentraciones subletales: alta, media y baja para la evaluación citotóxica y genotóxica.
- Identificar el efecto citotóxico del veneno crudo de *Bothrops asper* mediante la cuantificación de eritrocitos policromáticos en eritrocitos normocromáticos.
- Determinar el efecto genotóxico del veneno crudo de *Bothrops asper* mediante la cuantificación de la frecuencia de Micronúcleos en eritrocitos policromáticos de sangre periférica de ratones tratados en relación con los registrados en los ratones de los grupos control.

5. ANTECEDENTES

5.1 ANTECEDENTES MOLECULARES

En un sistema artificial de transporte iónico (membranas bilipídicas planas) se estudió el veneno crudo de serpiente *Bothrops atrox*. El estudio demostró que al incorporarse el veneno se producen corrientes eléctricas discretas, las cuales están asociadas a cambios de conductancia de la membrana y cuyos valores varían entre 160 y 600 pS. La frecuencia de aparición y el tiempo de duración de estos cambios dependen de las condiciones fisicoquímicas del medio externo de la membrana. Cuando las membranas se exponen al veneno se observan cambios instantáneos de corriente a través de ella. Esto sucede porque una vez que el veneno se incorpora a la membrana, este se une a alguna estructura de la misma formando un canal iónico permanente sin llegar a cerrarse. Esto indica que existe una tendencia natural de los venenos a conformar aglomerados estables que permitan el transporte iónico permanente lo cual conllevaría en el mundo real, al mal funcionamiento de las células inicialmente y luego a un efecto citotóxico irreversible sobre los tejidos de las víctimas (Díaz, *et al.*, 1997).

Diferentes estudios demuestran que las miotoxinas del veneno del género *Bothrops* afectan la bicapa lipídica de la membrana celular cargada negativamente, sugiriendo compromisos de aminoácidos básicos. Al evaluar lesiones locales y sistémicas inducidas por veneno de *Bothrops alternatus* en el músculo gastrocnemio de ratas mediante pruebas histoquímicas, se encontró positiva la peroxidación de lípidos, confirmando la acción del veneno sobre fosfolípidos de membrana (Teibler, *et al.*, 1999).

Mediante inyección intramuscular del veneno crudo de *Bothrops asper*, fue evaluado en el músculo esquelético de ratones, necrosis por medio de microscopía electrónica, evaluado a diferentes tiempos. El estudio encontró daño a nivel de membranas plasmáticas en las células que componen dicho tejido (Ownby, *et al.*, 1983).

La fagocitosis del veneno de *Bothrops asper* y *Bothrops jararaca*, por leucocitos de ratones fue evaluado a nivel molecular, encontrándose que a través de la activación de un limitado número de receptores de membrana, el veneno atraviesa la bicapa lipídica de la membrana celular de los leucocitos. Esto quiere decir que el veneno, al tener contacto con la membrana celular, activa ciertos receptores que permiten su paso (Lennartz, 1998; Aderem y Underhill, 1999).

El veneno del género *Bothrops*, al atacar la célula blanco, reacciona con ciertos compuestos químicos complejos como el óxido nítrico (NO) que desempeña un papel esencial en muchos procesos biológicos como molécula señal, formando aniones de peróxido nítrico (ONOO⁻) (Beckmann, *et al.*, 1990). Este compuesto puede reaccionar con importantes mo-

lécúlas biológicas blanco y modificarlas, especialmente lípidos, proteínas de membrana celular y ácidos nucleicos (Prior y Squadrito, 1995).

Casi todas las miotoxinas del veneno de serpientes del género *Bothrops* pertenecen al grupo básico de fosfolipasas A₂ ($p\mu = 13-15\text{kD}$). Las fosfolipasas A₂ pertenecen a una familia de proteínas relacionadas antigénicamente y con estructuras químicas semejantes. La fosfolipasa A₂ aislada del veneno e inyectada en tejido muscular de mamíferos, conduce a una serie de drásticos eventos degenerativos que probablemente se inicien en la membrana plasmática y culminan con necrosis selectiva de las células del tejido blanco. Se asume que el efecto miotóxico es provocado por interacción electrostática con la membrana y posterior penetración de la bicapa (Gutiérrez y Lomonte, 1995). Mediante el estudio de estas miotoxinas aisladas del veneno de *Bothrops asper*, como Lys-49 y Asp-49, realizado en ratones se ha determinado su interacción con membranas plasmáticas en células del tejido blanco, degradando sus componentes y modificando los componentes celulares (Bultrón *et al.*, 1993; Lomonte *et al.*, 1994).

Lys49, pertenece a las miotoxinas de clase II del veneno de *Bothrops asper*, y fue estudiada desde el punto de vista molecular con el fin de encontrar aquella región responsable de los efectos tóxicos de dicha fosfolipasa, mediante la técnica Heparin-Binding (Lomonte, *et al.*, 1994). En el décimo tercer péptido sintético de Lys49 correspondiente a la región 115-129 (numeración de Renetseder *et al.*, 1985) fue hallada aquella región molecular, inyectándola en cultivo de células endoteliales (Lomonte, *et al.*, 1994) y bacterias (Páramo, *et al.*, 1998) y reportando su entrada a través de la membrana celular, sin reportar mionecrosis en estas células blanco.

5.2 ANTECEDENTES GENOTÓXICOS

Luego de hacer una revisión en MedLine, ToxNet y ScienceDirect, se pudo concluir que posiblemente no se han realizado estudios para evaluar el efecto citotóxico y genotóxico del veneno de serpientes y en especial de *Bothrops asper*. Sin embargo, en 1991 Sittenfeld-Appel *et al.*, reportaron en los venenos de los géneros *Bothrops*, *Crotalus* y *Lachesis* toxinas con actividad DNAsa II y RNAsa mediante la técnica de electroforesis en geles de agarosa/DNA el cual cuantifica la degradación del ADN.

6. MARCO TEÓRICO

6.1 RESEÑA HISTÓRICA

Durante siglos los venenos animales han sido mitificados por considerarlos malignos, peligrosos, causantes de muertes y partícipes de extraños rituales. Pero siempre han estado arraigados a la cultura humana. Sus primeros usos fueron establecidos como arma de cacería en los antiguos pueblos indígenas, así como también utilizados para guerras entre pueblos, y como objeto de maleficios y brujerías.

El primero en describir el uso del veneno de serpientes fue el explorador norteamericano Richard Gill a principios del siglo XVI, el cual encontró evidencias de que, en las comunidades indígenas del alto Orinoco y Río Negro, se utilizaba el veneno para la cacería. Otros exploradores como Walter Raleigh en 1595; describieron el uso del veneno por los indios del Orinoco como mecanismo de defensa.

Estos exploradores determinaron que la exposición al veneno, provocaba fatiga en las extremidades superiores de las víctimas y dificultades respiratorias, sobreviniendo la muerte en pocas horas a causa de paros respiratorios.

En Asia se describieron los primeros accidentes ofídicos, y su manipulación y mecanismo, así como la práctica de amputaciones como primeros tratamientos por parte de los chinos los cuales empezaron a comprender las consecuencias de estos envenenamientos desde el punto de vista sintomatológico y de salud en las víctimas y a clasificarlos de acuerdo a la serpiente agresora.

Entre 1600 y 1700 los ingleses y franceses extendieron sus imperios alrededor del mundo, trasladando sus ejércitos a regiones habitadas por serpientes, y otros animales dañinos, en las selvas de Birmania, la India y África lo cual produjo un problema de salud generalizado para estos colonizadores. De esa manera se iniciaron en los estudios de estas enfermedades y animales tropicales, siendo para aquella época una de las escuelas más avanzadas en el campo de la medicina tropical. Esto despertó el interés y obligó a realizar los principales estudios científicos por parte de uno de los pioneros en el área como el Dr. Vital Brasil, el cual funda el Instituto Buthantan en Brasil y se crea una corriente de investigadores y estudios sobre la herpetofauna y en especial, la ofidiología. Ya para 1916 se crea el primer suero antiofídico para especies endémicas brasileras, así como numerosas investigaciones acerca de los efectos bioquímicos de los venenos de serpientes.

Luego de haber sido comprobados los métodos heurísticos de los antiguos aborígenes, las biotoxinas pasan a ser una fuente importante de información. Por lo cual nace la Sociedad Internacional de Toxinología, consolidándose la Toxinología como una ciencia, la cual se

dedica, exclusivamente al estudio de compuestos producidos por animales, plantas y/o microorganismos; por lo tanto se crea necesidad de intercambio de conocimientos acerca del estudio del veneno y sustancias bioactivas de origen natural.

Los miembros de esta sociedad tratan de expandir el conocimiento de estas sustancias, realizando estudios acerca de los componentes bioquímicos del veneno, otros estudian la reacción de estos con organismos, así como la formación de antígenos – anticuerpos, también se realizan evaluaciones a las estructuras de las toxinas y así se dan posibles soluciones a fármacos y antibióticos para el mejoramiento de casos clínicos y sus tratamientos. En este centro del veneno convergen diferentes ramas de investigación las cuales estudian comportamientos a las reacciones bioquímicas y farmacológicas.

Los primeros estudios clínicos hechos de manera sistemática sobre el accidente ofídico datan del siglo XIX y consistieron en reportes de casos y observaciones sobre serpientes venenosas y semi-venenosas. El interés en la fisiopatología del síndrome del accidente ofídico fue estimulado por los hallazgos que los signos y síntomas de las mordeduras eran bastante similares, a pesar de las diferencias zoológicas entre las serpientes causantes, sugiriendo mecanismos de acción comunes de estas toxinas. En las épocas iniciales, el desarrollo experimental fue realizado con investigaciones ligeras y de poca profundidad. Probablemente, los estudios hechos con profundidad científica, acerca de los mecanismos de acción de los venenos de serpientes, ocurren a partir de la década de los 70's del siglo XX. Estudios clínicos más detallados y mejores estudios experimentales rápidamente siguieron a estos desde EEUU, Australia, Inglaterra, Costa Rica, India, Tailandia, China, Japón y Brasil (Rodríguez Acosta, 1995).

En 1974, y en adelante, Porter y Klauber realizaron las primeras investigaciones acerca de los componentes químicos de los venenos de serpientes mediante su extracción y liofilización y se dieron las primeras publicaciones acerca de estos resultados definiendo los venenos desde el punto de vista bioquímico.

A partir de 1981 mediante pruebas *in vivo* y con pacientes víctimas de accidentes ofídicos, Toro *et al*, investigan los efectos clínicos de los venenos determinando sus propiedades neurotóxicas, hemotóxicas y proteolíticas y se clasifica el accidente ofídico en función del género que la provoca. En 1987, Kini & Evans realizan los primeros estudios moleculares de los venenos ofídicos.

A partir de la década de 1990, se realizan importantes investigaciones acerca de los efectos tóxicos de los venenos ofídicos en donde sobresalen estudios como toxicidad muscular por Ownby *et al* en 1990, toxicidad renal por Soe-Soe *et al* en 1989, acción cardiovascular por Russel *et al* en 1997, efectos hematológicos por Markland *et al* en 1998, entre otros.

6.2 DISTRIBUCIÓN GENERAL DE LAS SERPIENTES

Las serpientes se distribuyen principalmente por las regiones tropicales y subtropicales. Se conocen unas 2.500 especies, agrupadas en ocho o diez familias, dependiendo del sistema de clasificación utilizado para algunas serpientes excavadoras y arborícolas. La familia *Coleubridae* es la más grande y comprende las especies más comunes en todo el mundo, a excepción de Australia, donde la familia *Elapidae* es la dominante. Este segundo grupo engloba algunas de las serpientes más mortíferas del mundo, como las mambas, las cobras y las serpientes de coral. Otros dos grupos importantes de serpientes venenosas son los de la familia *Viperidae*, entre los que se incluye a la serpiente de cascabel, la surucucú y la labarria o nauyaca y a las verdaderas víboras, como la víbora europea. Las serpientes más grandes del mundo pertenecen a la familia *Boidae*, que comprende las boas y las pitones. Algunos miembros de esta familia no alcanzan nunca una longitud superior a los 0,6 m; los gigantes de la familia pueden llegar, en ocasiones, a medir más de 9 metros (Ferri, 1992).

En Colombia las serpientes tienen una amplia distribución y habitan desde los 0 hasta los 3000 m.s.n.m., especialmente en zonas cálidas como la Costa Atlántica, los Llanos Orientales y en la Selva Amazónica. En el mundo se conocen cerca de 3000 especies de serpientes, de las cuales en Colombia se han identificado y se distribuyen en 8 familias, 71 géneros, cerca de 224 especies y 97 subespecies, de las cuales 35 son venenosas (Ferri, 1992).

6.3 TOXINAS OFÍDICAS

Los venenos de las serpientes son sustancias químicas extraordinariamente complejas. Son secreciones glandulares tóxicas que actúan como mecanismo natural para la obtención del alimento, inmovilizando a la presa y contribuyendo en su degradación y digestión (Porter, 1974). Esta característica es un mecanismo muy evolucionado en el que la serpiente minimiza los riesgos de ser lastimada al forcejear con su presa y ahorra la energía que gastaría al realizar su caza; debido a que los ofidios no mastican su alimento, el veneno inyectado a su presa inicia el proceso digestivo (Porter, 1974). Inclusive se piensa que el veneno de las serpientes evolucionó originalmente de enzimas digestivas (Kochva *et al.*, 1982).

Físicamente, el veneno es una sustancia líquida, de apariencia turbia, que está químicamente compuesto de una gran cantidad de constituyentes orgánicos: proteínas y muchos tipos de enzimas, entre otros (Chippaux, 1991).

Para que el veneno pueda ejercer su acción debe ser inoculado en el torrente sanguíneo de la presa mediante un aparato funcional especializado inoculador del veneno, el cual está conformado por glándulas, colmillos, huesos y músculos desarrollados eficientemente para esta función (Chippaux *et al.*, 1991)

6.4 COMPONENTES DE LOS VENENOS

En algunos venenos se han aislado hasta 300 y más componentes. En términos generales están compuestos por proteínas no enzimáticas, enzimas, péptidos, nucleótidos, aminoácidos libres, azúcares fosforilados, lípidos, mucopolisacáridos, iones de Na^+ , K^+ , Zn^{2+} , Ca^{2+} , Mg^{2+} , Fe^{2+} , Co^{2+} , entre otros, residuos celulares, presencia de numerosas bacterias y otros microorganismos, y numerosos componentes de acción aún desconocida (Gutiérrez *et al.*, 1984). Contienen alrededor de un 25% de sólidos totales, de los cuales del 70-90% están compuestos por polipéptidos y proteínas de peso molecular frecuentemente elevado, los mismos que ocasionan la mayoría de los efectos biológicos. La elevada concentración de sólidos les confiere a los venenos una gran viscosidad. El restante 10-30% de los solutos está constituido por una amplia gama de sustancias orgánicas de bajo peso molecular como carbohidratos, péptidos pequeños, aminoácidos libres, aminas biógenas, nucleótidos, compuestos inorgánicos, y elementos tanto aniónicos como catiónicos (Yarlequé, 1989). Un solo veneno de serpiente puede contener entre 5 y 20 enzimas, de 3 a 20 proteínas y hasta dos o más docenas de otras sustancias (Chippaux, 1991), algunas registradas en la tabla 2.

6.5 VARIABILIDAD DE LA CONCENTRACIÓN DE LOS COMPONENTES

Generalmente el veneno es una secreción algo viscosa, de color amarillo, blanco o incoloro, que según su concentración, que es muy variable, puede dejar por desecación un residuo cristalizado entre un 20 y 35% aproximadamente. Los diversos componentes de los venenos y sus proporciones varían y son diferentes en cada especie de serpiente, confiriéndole unas características que le son propias, tanto así que constituye un factor taxonómico; incluso dentro de una misma especie pueden existir notables variaciones debidas a factores internos del animal, tales como edad (los especímenes juveniles poseen un veneno más concentrado), sexo, nutrición, estado de salud, ciclo reproductivo, niveles hormonales, etc., y clima, altitud, humedad, ciclos estaciones, disponibilidad de presas, tipo de presas habituales, contaminación ambiental, etc. (Chippaux, 1991).

Algunos investigadores han demostrado además la existencia de importantes variaciones en la composición y concentración de los venenos de serpientes en poblaciones endogámicas, aisladas geográficamente o que solo disponen de un solo tipo particular de presas para poder alimentarse. Se ha demostrado también que los venenos de algunas especies cambian con el tiempo y tienden a ser más tóxicos, debido seguramente a factores de adaptación, respuesta a nuevas condiciones del hábitat o a variaciones drásticas del medio ambiente. (Chippaux, 1991).

En la figura 1 se muestra esta variación para algunas especies de la familia *Viperidae*, en la cual, el valor mayor de concentración de veneno corresponde a serpientes juveniles, hasta llegar a valores de menor concentración para serpientes adultas.

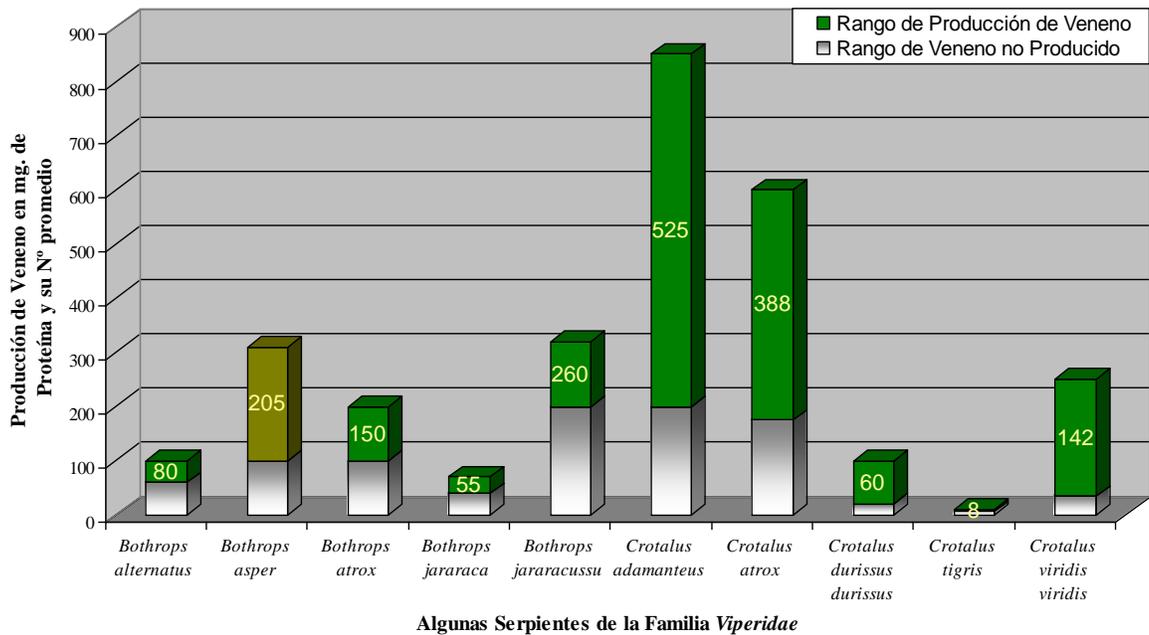


Figura 1. Promedio de producción de veneno, en mg/mL, de serpientes representativas de la familia *Viperidae*.

6.6 PROPIEDADES TOXICAS DE LOS VENENOS

Las propiedades tóxicas de los venenos de serpientes se deben básicamente a las sustancias proteicas y a los fosfolípidos con una fuerte actividad enzimática. Sus efectos toxinológicos se manifiestan principalmente en la sangre, los tejidos, el aparato cardiovascular, el sistema neuromuscular y la respiración. A muchas sustancias responsables de estas acciones se las ha denominado genéricamente con el nombre de hemolisinas, citolisinas, cardiotoxinas, y neurotoxinas (Owbnny, 1990). El envenenamiento se produce como resultado de la interacción de una serie de principios tóxicos que ejercen la acción mediante la alteración de la homeóstasis en uno o mas órganos y/o sistemas de la economía (Zavaleta, 1991). Según sus propiedades tóxicas, los venenos se pueden clasificar así:

Tabla 1. Clasificación del veneno de acuerdo a sus propiedades tóxicas y bioquímicas.

Tipo de veneno	Características
Neurotóxico	Predominan los componentes que enfocan su ataque al sistema nervioso central. Presenta efectos a nivel de uniones presinápticas y postsinápticas en las placas de uniones neuromusculares y neuromotoras. Son característicos de las serpientes proteroglifas de la familia <i>Elapidae</i> .
Hemolítico	Existe una cantidad predominante de componentes químicos que atacan a nivel de tejidos y células sanguíneas destruyéndolos. Presenta propiedades esterásicas y fosfolipásicas y actividades proteolíticas, hemorrágicas y coagulantes. Este tipo de veneno predomina en las serpientes solenoglifas que pertenecen a la familia <i>Viperidae</i> .

Fuente: BOLAÑOS, R. Serpientes, Venenos y Ofidismo en Centro y Sudamérica.

Sin embargo, ningún veneno es completamente neurotóxico o hemolítico, sino que predomina uno de ellos; todos los venenos son una compleja combinación de toxinas de ambas variedades. Actualmente, se ha encontrado que los venenos de serpientes pueden llegar a contener hasta 25 enzimas diferentes, cada una con una función específica (Griswold, 1996), de las cuales, las más importantes que se han aislado son:

Tabla 2. Principales toxinas aisladas en géneros de serpientes venenosas colombianas

Toxinas	Género	Mecanismo de lesión o de muerte
Neurotoxina	<i>Micrurus, Crotalus, Lachesis</i>	Parálisis respiratoria
Cardiotoxina	<i>Micrurus</i>	Inhibición cardiovascular
Fosfolipasa A	<i>Bothrops, Micrurus, Lachesis</i>	Hemólisis
5-Nucleotidasa DNAsa II & RNAsa ATPasa Nucleótido pirofosfatasa Exopeptidasa Hialuronidasa L-AA oxidasa	<i>Bothrops, Crotalus, Lachesis</i>	Lesión celular
Proteasas	<i>Bothrops, Crotalus, Lachesis</i>	Lesión celular Hipotensión por liberación
Ac. Colinesterasa	<i>Micrurus</i>	Parálisis flácida

Fuente: THEAKSTON, R.D.G. y REID, H.A. Development of Simple Standard Assay Procedures for the Characterization of Snake Venoms.

Como características específicas del veneno de serpientes de la familia *Bothrophinae* se encuentran: efecto necrosante, causado por la acción de las miotoxinas en la membrana celular de las células musculoesqueléticas y la isquemia en los tejidos musculares como resultado del daño vascular, efecto coagulante, debido a la acción del veneno sobre los fac-

tores de la cascada de coagulación, efecto hemorrágico, debido al daño ocasionado por el veneno en el endotelio vascular al romperlo, y efecto proteolítico, debido a la alta concentración de enzimas degradantes presentes en el veneno (Gutiérrez, 1990), además del estrés que produce en la víctima como consecuencia del accidente ofídico. Pero detrás de estos efectos, existen mecanismos moleculares que determinan efectos específicos y contribuyen a una serie de desencadenamientos en el sistema inmune que van a definir la acción del veneno dentro de la fase aguda del envenenamiento (Barraviera, 1999).

Este mecanismo, basado en observaciones clínicas y de investigación en laboratorios, además de la literatura inmunológica, consiste en que el veneno, al entrar al organismo afectado, produce una reacción en cadena que inicia una respuesta inmunológica con la activación de las células centinela de la sangre (granulocitos, macrófagos/monocitos y linfocitos) las cuales liberan hormonas específicas, en especial, las de la familia interleucina, (interleucina 1 (IL-1), interleucina 6 (IL-6), e interleucina 8 (IL-8)) dando paso a una activación en la médula ósea, activando una sobreproducción y liberación de neutrófilos y células jóvenes dentro de las cuales se encuentran los eritrocitos y la línea celular del sistema inmune (Barraviera, 1999). Pero, por otro lado, existe otra reacción por acción de las hormonas de la familia interleucina en la que se encuentra involucrado el hipotálamo. Este, al ser el órgano responsable de la homeóstasis en el organismo, produce fiebre para contrarrestar los efectos del veneno. Este aumento de temperatura estimula el lóbulo anterior de la hipófisis, el cual libera la hormona corticotropina, la cual, a su vez, y por medio de señalización celular, estimula la liberación de la hormona adrenocorticotropina, estimulando la glándula suprarrenal, situada encima del extremo superior de cada riñón, que, bajo esa estimulación, aumenta la producción de glicocorticoides. Entre los glicocorticoides producidos, se encuentra la eritropoyetina, una hormona glicoproteica que, en situaciones de hipotensión e hipoxia, situaciones que ocurren durante el envenenamiento bothrópico, se estimula su producción, y, por tanto, la eritropoyesis trayendo como consecuencia una sobreproducción de eritrocitos. De esta forma aumenta la capacidad de transporte de oxígeno de la sangre y contrarresta los efectos de hipoxia e hipotensión (Barraviera, 1999).

Se observa pues, que existen dos mecanismos distintos estimulados por el envenenamiento bothrópico en donde, por rutas diferentes, existe una estimulación en la formación de eritrocitos y de células del sistema inmune, como se observa en la figura 2.

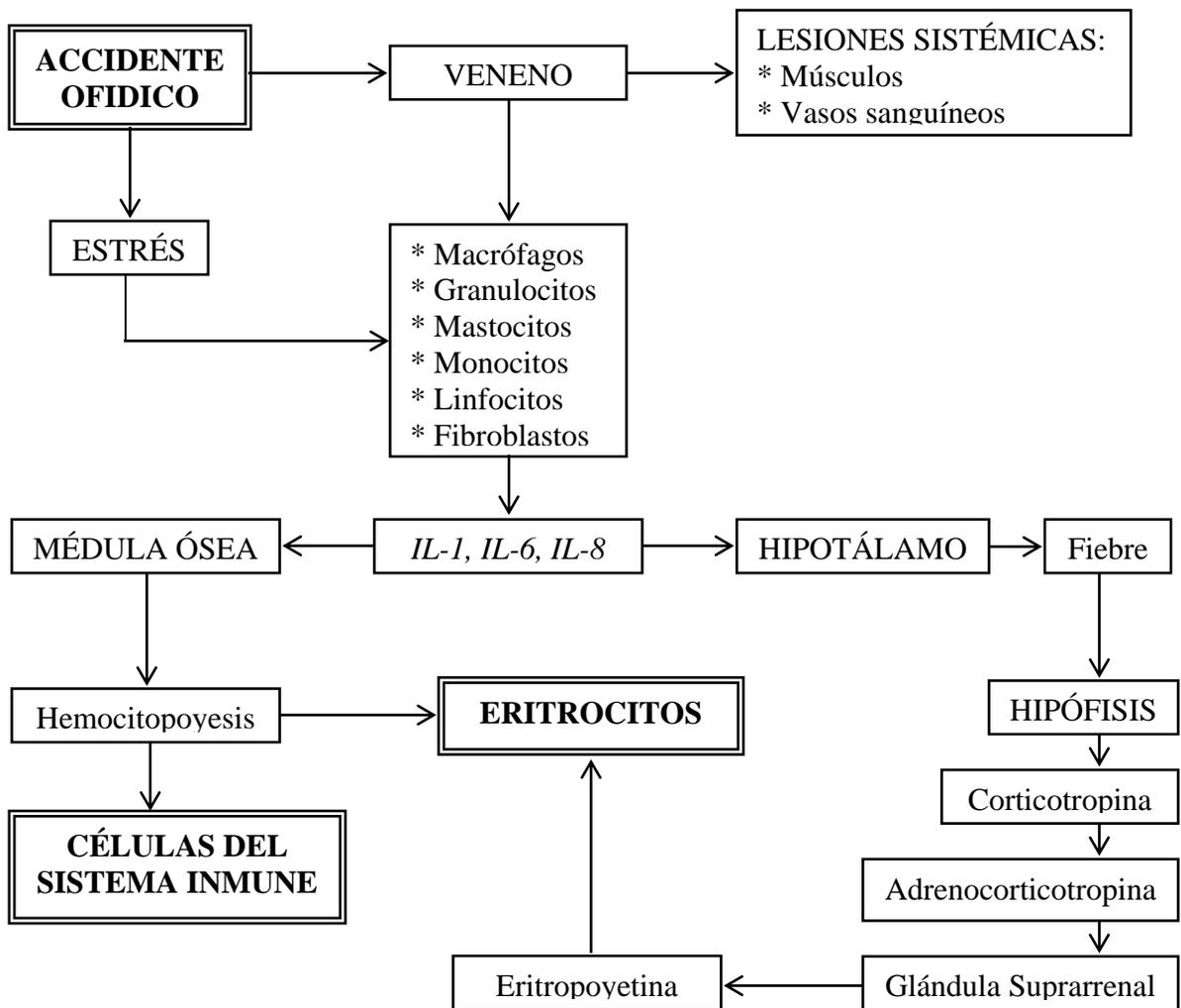


Figura 2. Reacciones en la fase aguda por envenenamiento bothrópico.

6.7 *Bothrops asper*



Figura 3. Aspecto morfológico de *Bothrops asper*

En las diversas regiones de Colombia se conoce con numerosos nombres; entre los más comunes tenemos: mapaná, taya, taya equis, equis veinticuatro, sapa, cuatronarices, pudridora, barbamarilla, boquidorá, patoco, rabo de ratón, macabrel, entre otros.

6.7.1 Taxonomía. Reino: *ANIMALIA*
Filum: *CHORDATA*
Clase: *REPTILIA*
Orden: *SQUAMATA*
Suborden: *OFIDIA*
Familia: *VIPERIDAE*
Subfamilia: *BOTHROPHINAE*
Género: *Bothrops*
Especie: *asper*

6.7.2 Características morfológicas. Puede medir hasta 2 m. de longitud y sus colmillos hasta 2,8 cm. de característica solenoglifa, es decir, se ubican en la parte anterior del maxilar superior el cual al rotar forman un ángulo de 90° al momento del ataque. Su dimorfismo sexual se distingue por el tamaño, pues las hembras suelen ser mayores que los machos a la misma edad (Otero *et al.*, 2002).

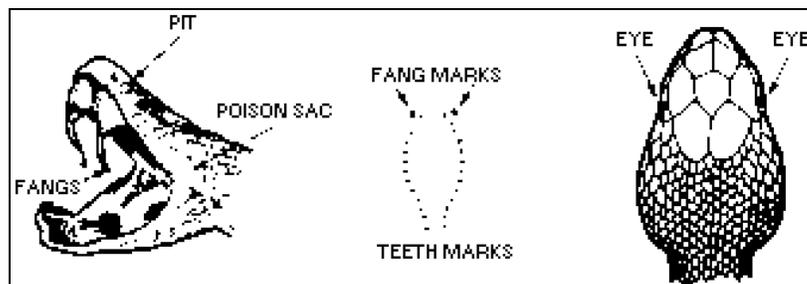


Figura 4. Disposición morfológica de colmillos y escamas de *Bothrops asper*

Es una serpiente ovovivípara, de cuerpo macizo de forma semi-triangular y cabeza grande también de forma triangular, cubierta con pequeñas escamas (placas no simétricas). Tiene fosetas termorreceptoras o fosas térmicas y ojos con pupila elíptica vertical. Su línea oscura es post-ocular y presenta escamas quilladas y rugosas. La coloración básica es el tono café claro o habano (en algunos ejemplares es gris claro) y presenta sobre el dorso manchas características en forma de equis, mariposas o corbatines, de color café oscuro o negro. La zona de la boca suele ser de color amarillo y el vientre de color crema uniforme (Otero *et al.*, 2002).

6.7.3 Hábito. Es de hábito principalmente crepuscular y nocturno, refugiándose durante el día en huecos naturales de troncos o raíces, o en cuevas de animales. Se alimenta principalmente de roedores, pequeños reptiles y aves. Su hábitat natural corresponde al bosque

húmedo tropical desde lo 0-1600 m.s.n.m., sin embargo, es una serpiente muy adaptable y se la puede encontrar lo mismo en bosques naturales que en campos de cultivo, rastrojos, potreros enmalezados, pastos de ganadería y muy cerca de asentamientos humanos; suele preferir la cercanía de los cursos del agua; en muchas poblaciones colombianas se han encontrado ejemplares en las zonas urbanas: patios, jardines, parques públicos y basureros. En Colombia se encuentra en las regiones del Caribe, Pacífico y Andina y ocasiona mas del 80% de las mordeduras en Colombia con una elevada mortalidad (5%) y secuelas atribuibles a complicaciones generadas por el rápido efecto del veneno (Otero *et al.*, 2002).

6.7.4 Reproducción. Su reproducción es ovovivípara y las tasas de nacimiento pueden ser muy altas. Una hembra adulta puede tener un parto por año y en cada parto tener entre 10 y 60 viboreznos, cuya tasa de supervivencia puede ser hasta del 90%. Esta es la razón de que algunas zonas del país sea una serpiente muy abundante y sea la causante del mayor número de accidentes.

6.7.5 Actividades enzimáticas del veneno de *Bothrops asper*. El veneno de *Bothrops asper* tiene actividades esterásicas y fosfolipásicas, pues contiene enzimas como fosfolipasas, fosfodiesterasas, fosfomonoesterasas, alfa-aminoacidooxidasas, acetilcolinesterasas, enzimas proteolíticas de la serina-proteinasa y varias clases de metaloproteinasas, arginina-esterasa, 5'-nucleotidasa, hialuronidasa y NAD nucleosidasas. (Markland, 1998). También posee actividades proteolíticas, hemorrágicas y coagulantes. La acción proteolítica produce aminas y péptidos vasoactivos, tales como: bradiquinina, histamina y serotonina que causan lesión capilar, lo cual se traduce por hemorragias petequiales, hematuria, hematemesis, epistaxis y hemorragias viscerales (Toro *et al.*, 1996).

6.7.6 Envenenamiento bothrópico. El mecanismo de acción predominante que ocurre en el envenenamiento bothrópico es coagulante, hemolítico y proteolítico. La actividad de los venenos bothróticos tiene componentes citotóxicos y fibrinolíticos, los cuales producen necrosis y hemorragias en tejido nervioso y por supuesto en otros tejidos. Del efecto y acciones del veneno, los bothróticos muestran actividades diferentes sobre diversos sustratos tisulares, provocando una variedad de lesiones, tales como: hemorragias, desórdenes neuromusculares y destrucción de diversos tejidos (Barrantes *et al.*, 1985).

Investigaciones efectuadas en varios países con el veneno del genero *Bothrops* han demostrado que causa un efecto local caracterizado por dolor, edema, equimosis, flictenas hemorrágicas y necrosis del tejido muscular (Gutiérrez *et al.*, 1980; Costa Cardozo *et al.*, 1990). Los daños mencionados son producidos por algunos componentes del veneno como son las miotoxinas, que afectan a las fibras musculares, las hemorráginas que alteran la microvasculatura local y sistémica, así como otras sustancias que provocan edema con incremento de la presión tisular local (Lomonte *et al.*, 1993).

6.8 PRUEBAS BIOLÓGICAS

6.8.1 Dosis letal 50 (DL₅₀). La DL₅₀, es la cantidad en miligramos de producto tóxico, sea de origen químico o biológico, que al ser aplicado a una población experimental, generalmente roedores, causa, en un periodo determinado de tiempo y en función de la naturaleza química del agente, la muerte al 50% de la población. Ya que la dosis letal depende del peso corporal del animal, los resultados se expresan en términos de miligramos de tóxico por kilogramo en peso del animal, o en su defecto en microgramos por gramo de peso de este. De esta forma, cuanto menor es la DL₅₀ de una sustancia, mayor es su grado de toxicidad y letalidad.

Para este concepto, es necesario tener en cuenta que, los venenos, sean de origen animal o químico, además de otros ciertos compuestos, el valor de la DL₅₀ es inversamente proporcional a su poder de letalidad. Esto se fundamenta en que si un veneno *A* presenta una DL₅₀ con un valor mayor con respecto al de un veneno *B*, se necesitaría más cantidad del veneno *A* para matar *X* gramos de peso corporal que la cantidad que se necesitaría del veneno *B* para matar los mismos *X* gramos de peso corporal. Con base a este fundamento, *Bothrops asper* posee una letalidad intermedia dentro de las serpientes más representativas del género *Bothrops*, pero es mucho menos letal que las serpientes del género *Crotalus*, ambos géneros pertenecientes a la familia *Viperidae* (ver figura 5).

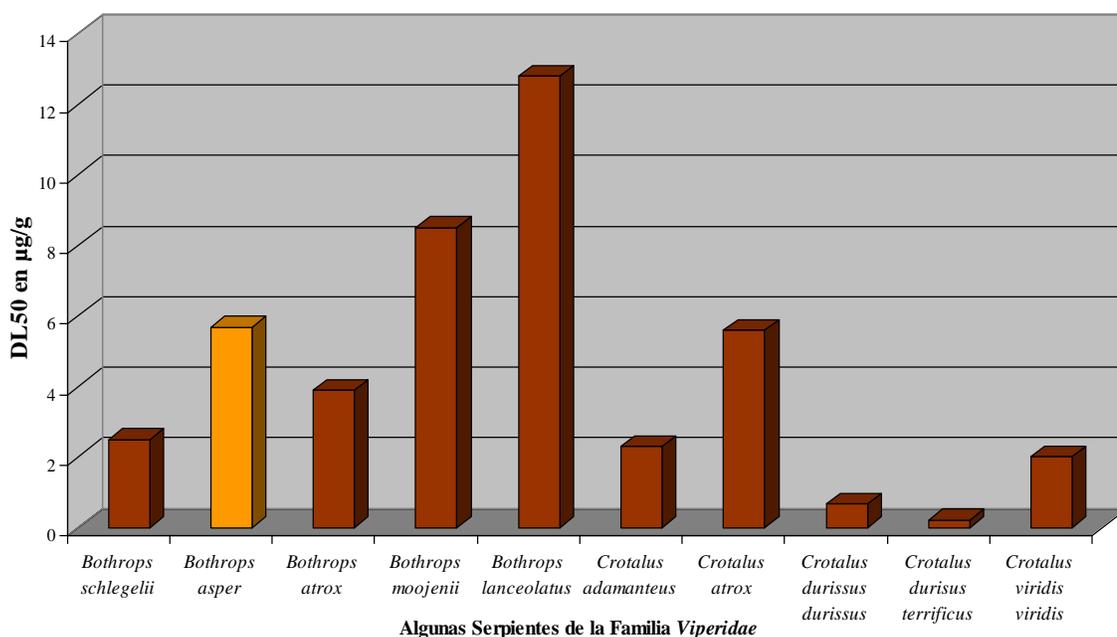


Figura 5. DL₅₀ de serpientes más representativas de la familia *Viperidae* determinadas por vía intraperitoneal.

6.8.2 Hemocitopoyesis. Es el mecanismo mediante el cual se forman nuevas células sanguíneas. Las células de la sangre tienen un período de vida relativamente corto, por lo que se hace necesario ser sustituidas continuamente por nuevas células, originadas en órganos especializados, como los eritrocitos, los granulocitos y las plaquetas que se forman exclusivamente en la médula ósea. Las células de la sangre, antes de alcanzar el estado máximo de madurez, pasan por diversas etapas de diferenciación, puesto que el proceso de diferenciación es continuo. El mecanismo de eritropoyesis es el producto final de una serie de divisiones celulares que lleva a la formación de células sanguíneas maduras y que se compone o subdivide en dos estados: proliferativo y no proliferativo. El estado eritropoyético proliferativo está compuesto por células en estado de eritroblasto y el no proliferativo, por células ortocromáticas (EOC), eritrocitos policromáticos (EPC) y eritrocitos normocromáticos (ENC). En roedores, el período de formación de eritroblastos ocurre entre seis a siete divisiones celulares en un rango de 10 horas cada una. Posteriormente, después del final de la división celular, llegan a la etapa de EOC, quienes expulsan sus núcleos (de 3 a 10 horas). Los EPC resultantes (células jóvenes) maduran en un tiempo de 10 a 33 horas, período durante el cual sufren varios cambios estructurales (metabolismo ribosomal de ARN) y pasan a ser ENC (células maduras) (McGregor, *et al.*, 1990).

6.8.3 Pruebas Citotóxicas. Estas pruebas permiten detectar daños celulares, expresados como cambios en su forma normal, alteraciones en la cinética del ciclo celular y bloqueo de los mecanismos de reparación celular que se producen cuando un agente físico, químico o biológico interactúa con la célula.

Para el análisis citotóxico a nivel eritropoyético, se registra la rata de EPC y ENC, contando el número de EPC en 3000 ENC. Un incremento de EPC indica una estimulación de proliferación celular y un descenso indica una inhibición en la división celular.

6.8.4 Prueba de micronúcleos. La prueba de micronúcleos es un procedimiento utilizado principalmente en animales, para detectar daños cromosómicos inducidos por agentes genotóxicos. Tiene las grandes ventajas de ser altamente sensible, rápida de aplicar, y sencilla de analizar, pues los eritrocitos son las únicas células de mamíferos que no tienen núcleo lo cual hace más fácil la identificación de micronúcleos.

Las aberraciones que un agente clastógeno produce durante la interfase del ciclo celular, pueden expresarse como micronúcleos. Los micronúcleos son pequeñas masas de cromatina con la apariencia de un núcleo pequeño (Schmid, 1975). Son creados de fragmentos acéntricos cromosomales o por cromosomas enteros que permanecen suspendidos en el citoplasma cuando los cromosomas son halados hacia los polos de las células y por lo tanto no son incorporados dentro del núcleo de las células hijas durante la división celular. Para que un micronúcleo se exprese, requiere que transcurra un ciclo de división celular y son observados en células interfásicas de primer ciclo. Para encontrar daños cromosómicos originados por la exposición aguda a agentes genotóxicos, se analizan los micronúcleos presentes en EPC, pues son células recién formadas y presentes en sangre periférica (tienen de

azul en presencia del colorante Wright's por ser basófilas), con respecto a, al menos, 2000 EPC y para exposición crónica se analizan los ENC, pues son células maduras presentes con mayor tiempo en sangre periférica (tiñen de rosado en presencia del colorante Giemsa por ser acidófilas) también con respecto a, al menos, 2000 ENC (Whorton, *et al.*, 1998).

Lo que hace más factible visualizar los micronúcleos en estas células se fundamenta en que cuando los eritroblastos de la médula ósea se transforman en EPC, el núcleo principal es expulsado en la etapa de EOC y el micronúcleo, caso de haberse formado, puede permanecer en el citoplasma, que de lo contrario quedaría enucleado, pues carecen de núcleo principal. El aumento de la frecuencia de micronúcleos en los EPC de animales tratados indica la existencia de lesiones cromosómicas inducidas.

Este biomarcador se puede emplear en médula ósea de roedores, pues es en ese tejido donde se forman los EPC. La detección de EPC micronucleados en sangre periférica también puede llevarse a cabo en otras especies en las que se haya demostrado que el bazo no es capaz de eliminar los eritrocitos micronucleados o que son suficientemente sensibles para detectar agentes que provocan aberraciones cromosómicas numéricas o estructurales, como sí ocurre en roedores. Este biomarcador, de tipo *in vivo*, de micronúcleos en mamíferos está especialmente indicado para evaluar el riesgo mutagénico, ya que permite tomar en consideración factores del metabolismo *in vivo*, de la farmacocinética y de los procesos de reparación del ADN, si bien dichos factores pueden variar según la especie, el tejido y el aspecto genético considerado. Los ensayos *in vivo* también resultan útiles para ahondar en el estudio de los efectos mutagénicos detectados en ensayos *in vitro* (Hayashi, *et al.*, 1994).

Como condiciones requeridas para emplear este biomarcador, el disolvente o vehículo en donde se disuelve el agente a evaluar no deberá producir efectos tóxicos a las dosis empleadas utilizándose siempre tres concentraciones: alta, media y baja (Hayashi y Sofuni, 1995). Es preciso verificar que el disolvente o vehículo no produce reacciones químicas con la sustancia de ensayo. Si se emplean disolventes o vehículos poco conocidos, debe disponerse de información de referencia que avale su compatibilidad. Siempre que sea posible, se recomienda considerar en primer lugar la utilización de un disolvente o vehículo acuoso. En el caso de los controles es necesario realizar controles positivos y negativos en cada ensayo, siendo tratados todos bajo las mismas condiciones. En los controles positivos deben formarse micronúcleos *in vivo* con grados de exposición en los que se produzca un aumento detectable respecto a la frecuencia espontánea (Whorton, *et al.*, 1998).

En cuanto al procedimiento, se deben utilizar, al menos, cinco animales por tratamiento, todos preferiblemente machos, pues las hembras, por su actividad hormonal, podrían alterar los resultados (Hayashi, *et al.*, 1994). La vía de administración se define con base en estudios realizados anteriormente con el agente a evaluar según la forma en que este fue administrado y la escogencia de los animales debe ser de forma aleatoria. Los tiempos de muestreo no deben ser antes de 36 horas ni después de 72 horas después del tratamiento, por lo que los mejores tiempos para evaluar son 48 y 72 horas después del tratamiento (Higashikuni y Sutou, 1995).

7. HIPÓTESIS

Si el veneno de *Bothrops asper* tienen propiedades citotóxicas, se espera que la proporción de eritrocitos policromáticos en relación a la proporción de eritrocitos normocromáticos disminuya en los ratones tratados respecto a los no tratados; de lo contrario dicha proporción será igual.

Si el veneno de *Bothrops asper* tiene propiedades genotóxicas, se espera que la frecuencia de micronúcleos en eritrocitos policromáticos de ratones tratados, sea mayor a la frecuencia de micronúcleos en eritrocitos policromáticos de ratones sin tratar; de lo contrario dicha frecuencia será igual, o incluso, menor.

8. METODOLOGIA Y DISEÑO EXPERIMENTAL

8.1 TIPO DE ESTUDIO Y VARIABLES

El estudio de evaluación del veneno crudo de *Bothrops asper* es de tipo experimental, *in vivo*, en células somáticas de sangre periférica de ratón. Para evaluar los efectos citotóxicos en eritrocitos de sangre periférica, se registró la citotoxicidad eritropoyética en EPC y para la evaluación genotóxica, se empleó la prueba de micronúcleos en sangre periférica.

En este estudio se tuvieron en cuenta dos tipos de variables, las variables dependientes, que son, el número de EPC en ENC y la frecuencia de micronúcleos, y la variable independiente, que es la concentración del veneno. Las dos variables poseen naturaleza cuantitativa pues se las puede cuantificar en números exactos.

8.2 ANIMALES OBJETO DE EXPERIMENTACIÓN

Para esta investigación se utilizaron ratones de la especie *Mus musculus*, de la cepa *ICR*, aportados por el Bioterio de la Universidad del Cauca, los cuales fueron todos de sexo masculino. Todos los animales fueron aproximadamente de 2 meses de edad, aptos para la prueba de micronúcleos, y mantenidos bajo las mismas condiciones. El período de aclimatación fue de una semana, durante la cual los ratones fueron mantenidos en jaulas, en grupos de cinco en el laboratorio de Zoología de la Universidad del Cauca, bajo una temperatura ambiente no superior a los 25°C y en condiciones de luz natural. El alimento proporcionado fueron cinco bloques diarios de Rodentina para cada ratón. A cada jaula le fue también suministrada agua suficiente para cada uno de los animales. Para la determinación final de la DL_{50} fueron utilizados 13 ratones, y para la evaluación citotóxica y genotóxica 35 ratones, 14 para los controles, y 21 para la exposición al veneno.

El veneno utilizado en esta investigación fue extraído de tres ejemplares de serpientes *Bothrops asper* provenientes del municipio de El Tambo, departamento del Cauca, mantenidas en el laboratorio de Herpetología de la Universidad del Cauca, por personal calificado, mediante la técnica de sujeción por la cabeza y exponiendo al animal a morder la boca de un recipiente de vidrio, previamente lavado y esterilizado, recubierto por un material de látex o *parafilm* en el cual se colectó el veneno. Para su almacenamiento el veneno se guardó congelado a una temperatura de -20°C en una nevera de laboratorio.

8.3 CUANTIFICACIÓN DEL VENENO DE *Bothrops asper* (mg DE PROTEÍNA)

Para establecer la cuantificación de la producción de veneno se llevó a cabo el siguiente procedimiento: en un tubo *ependorf* se agregó el “pool” de veneno extraído de los tres ejemplares de *Bothrops asper* y le fueron agregados 2 mL (factor de dilución equivalente a 3,56) de solución salina de NaCl (0,9%) para obtener una solución madre. Luego, con un *vórtex*, se realizó una agitación de la solución hasta lograr una homogenización adecuada. Posteriormente, se realizó una centrifugación a 6000 rpm durante 30 minutos con el fin de separar los componentes inactivos del veneno y obtener la concentración proteica aislada en el sobrenadante. Con una micropipeta, se tomaron 10 μ L del sobrenadante recuperado más 490 μ L (factor de dilución equivalente a 50) de solución de NaCl (0,9%) y se agregaron en una celda estéril para espectrofotometría. Luego se registró la absorbancia a 280 nanómetros y se calculó la concentración en mg de proteína mediante la siguiente fórmula:

$$C_{fv}(\text{mg/mL}) = (A_{280})(F_{d1})(F_{d2})(V_t)$$

en la cual:

Cfv = Concentración final del “pool” de veneno.

A₂₈₀ = Absorbancia a 280 nanómetros. (El blanco para la lectura fue NaCl 0.9%)

F_d = Factor de Dilución. $F_d = \frac{V_2}{V_1}$

V_t = Volumen total del pool de veneno.

Al obtener la concentración del veneno puro se calculó la concentración de la solución madre y de la solución de trabajo mediante la siguiente fórmula:

$$V_1C_1 = V_2C_2 \quad C_2 = \frac{V_1C_1}{V_2}$$

La solución de trabajo utilizada en la determinación de la DL₅₀ y en la evaluación citotóxica y genotóxica se preparó tomando 0,5 mL de la solución madre más 49,5 mL de NaCl (0,9%), utilizando un factor de dilución de 100.

8.4 DETERMINACIÓN DEL EFECTO TÓXICO (DL₅₀)

Este experimento se realizó con el objeto de encontrar el nivel de letalidad o toxicidad del veneno de *Bothrops asper*. El valor determinado indicó que al inyectar esa dosis a una población de ratones existe la probabilidad de que muera el 50% de la población y sobreviva

el otro 50%. Para determinar la DL_{50} se empleó la técnica de Molidengo modificada por Sevcick (1987) en la cual se necesitaron, en la prueba final, 13 ratones machos *Mus musculus*, con un rango de peso de 33 – 36 g., de cepa *ICR*, a los cuales se les aplicó una inyección intraperitoneal del veneno de *Bothrops asper* diluido en solución salina de NaCl (0,9%). A cada ratón se le hizo un seguimiento individual durante media hora. La dosis inicial fue de 5,68 $\mu\text{g/g}$., la que corresponde a la DL_{50} para *Bothrops asper* en Guatemala (Saravia, *et al.*, 2001).

Se llevó a cabo el siguiente protocolo. Para encontrar el volumen inicial (λ), en μL , de veneno previamente cuantificado que se le inyectó al primer ratón, se multiplicó la dosis inicial por el peso del ratón 1 en g., el valor obtenido se dividió por la concentración del veneno disuelto en solución salina previamente cuantificado (Sevcick, 1987). Luego se realizaron las observaciones del efecto del veneno en un tiempo de 30 minutos. El protocolo de Sevcick indica que si el ratón vive, a λ , dividido entre el peso del ratón, se le calcula el logaritmo y se le suma una constante de 0,04, y si el ratón muere, también a λ , dividido entre el peso del ratón, se le calcula el logaritmo pero se resta la constante 0,04. A este valor se calcula el antilogaritmo (10^x) y se multiplica por el peso del siguiente ratón y así se obtiene el volumen a aplicar al siguiente ratón. Para calcular la dosis aplicada a este siguiente ratón, el volumen agregado se multiplica por la concentración del veneno y se divide por el peso del ratón. (Sevcick, 1987). Los resultados fueron sometidos a un análisis estadístico no paramétrico mediante el cálculo de la mediana con el método Hodge y Lehman mediante el software estadístico Toxico Sevcick (1998).

Luego de determinar la DL_{50} , se calculó, mediante ensayo-error, la dosis máxima tolerada (DMT), realizando ensayos en cuatro grupos de dos ratones, aplicándoles dosis subletales y haciendo un seguimiento de 72 horas. Esta DMT determinada cumplió con la condición de que el ratón sobreviviera, por lo menos, durante 72 horas después del tratamiento, tiempo máximo de muestreo.

8.5 SELECCIÓN DE LAS DOSIS EXPERIMENTALES

Para la evaluación citotóxica y genotóxica se emplearon cinco tratamientos: dos controles, control negativo y control positivo (Whorton, *et al.*, 1998), y tres concentraciones de veneno: baja, media y alta, (Hayashi, *et al.*, 1995). El veneno crudo de *Bothrops asper* fue disuelto en solución salina de NaCl (0,9%) para obtener la concentración final esperada para cada tratamiento, de acuerdo al peso del ratón. Se obtuvieron de la siguiente forma:

- **CONTROL POSITIVO (C+)** Para el control positivo se utilizó ciclofosfamida disuelta en solución salina de NaCl (0,9%), sustancia altamente mutagénica utilizada en pruebas *in vivo* para aberraciones cromosómicas y micronúcleos (Heddle, *et al.*, 1983). Se aplicó 50 $\mu\text{g/g}$. de peso de ratón.
- **DOSIS ALTA (DA)**. La dosis máxima tolerada (DMT) se utilizó como la dosis alta.

- **DOSIS MEDIA (DM).** La dosis media fue el 50% de la DMT.
- **DOSIS BAJA (DB).** La dosis baja fue el 50% de la DM.
- **CONTROL NEGATIVO (C-).** Para el control negativo se utilizó solución salina de NaCl (0,9%) el cual es el disolvente del veneno y del control positivo, aplicando 10 $\mu\text{L/g}$ de peso de ratón.

8.6 DISTRIBUCIÓN Y TRATAMIENTO DE LOS ANIMALES

El experimento se realizó mediante un diseño de bloques aleatorizados. Se emplearon 7 jaulas, en cada una de las cuales se colocaron cinco ratones, a los cuales se les aplicaron los tratamientos. Los cinco tratamientos se aleatorizaron entre los cinco ratones de cada jaula, a razón de un tratamiento por ratón. En total, cada tratamiento fue repetido siete veces, correspondiente a los siete bloques (7 jaulas).

Las condiciones alimenticias, ambientales y morfológicas (edad, peso, sexo, etc.) de los cinco ratones en cada jaula fueron iguales a la hora de efectuar los tratamientos. El momento de efectuar los tratamientos fue determinado cuando las condiciones mencionadas anteriormente para cada jaula, se lograron en cada bloque y al cumplir el periodo de aclimatación.

Los cinco tratamientos, en cada uno de los bloques, fueron administrados vía intraperitoneal para cada ratón, en condiciones normales. Dentro de cada bloque, los ratones fueron escogidos de manera aleatoria para aplicar los diferentes tratamientos. El volumen de administración fue una dosis de cada una de las concentraciones, incluyendo el control negativo y el control positivo, de acuerdo al peso de cada ratón. Para este estudio se trabajó con una dosis aguda aplicada en la hora cero y evaluada (cosecha) en la hora 48 y en la hora 72 en cada uno de los ratones (Higashikuni y Sutou, 1995), como se observa en la figura 6:

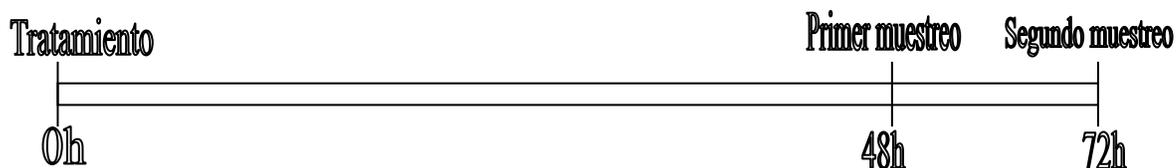


Figura 6. Tiempos de muestreo después de aplicar el tratamiento

8.7 EFECTO CITOTÓXICO.

Para la evaluación citotóxica, se determinó la tasa de EPC contando el número de EPC en 3000 ENC para cada animal, en cada uno de los tratamientos (Whorton, *et al.*, 1998), incluyendo a los grupos control. La disminución de EPC indica un efecto citotóxico del veneno,

mientras que su incremento indica una estimulación de proliferación celular; ambos con respecto al grupo control. El dato obtenido fue registrado como N° EPC/3000 ENC. Una vez efectuado el análisis microscópico, el número de EPC en 3000 ENC, tanto para la hora 48, como para la hora 72 después del tratamiento, se registró en tablas de datos de Excel para su análisis estadístico.

8.8 EFECTO GENOTÓXICO.

La evaluación genotóxica, se hizo a nivel de EPC, pues son los que se utilizan para detectar daños en el ADN por exposición aguda como en este caso. Se registró el número de EPCMN/3000EPC por cada animal (Whorton, *et al.*, 1998), en cada uno de los bloques, así:

Tabla 3. Número de células analizadas para cada animal en cada uno de los tratamientos para la hora 48 y 72

Hora Cosecha	Tratamientos	No Animales	No EPC. analizados	No prep. Citológicas
HORA 48	Control Negativo	7	3000 células/animal	3 placas/animal
	Dosis Baja	7	3000 células/animal	3 placas/animal
	Dosis Media	7	3000 células/animal	3 placas/animal
	Dosis Alta	7	3000 células/animal	3 placas/animal
	Control Positivo	7	3000 células/animal	3 placas/animal
HORA 72	Control Negativo	7	3000 células/animal	3 placas/animal
	Dosis Baja	7	3000 células/animal	3 placas/animal
	Dosis Media	7	3000 células/animal	3 placas/animal
	Dosis Alta	7	3000 células/animal	3 placas/animal
	Control Positivo	7	3000 células/animal	3 placas/animal

Al ser registradas 3000 EPC por animal, se registraron 21000 células por tratamiento para cada una de las horas de muestreo. Una vez realizado el análisis en el microscopio, la frecuencia de micronúcleos en EPC, tanto para la hora 48, como para la hora 72 después del tratamiento, se registró en tablas de datos de Excel para su análisis estadístico.

El análisis estadístico se realizó mediante la aplicación del procedimiento ANOVA a través del software estadístico SPSS (Statistical Package for Social Scientific) Para la comparación, se trabajó con un nivel de significancia máximo de 0,05.

8.9 PROTOCOLO DE MICRONÚCLEOS EN ERITROCITOS DE SANGRE PERIFÉRICA DE RATONES UTILIZADO EN LA EVALUACIÓN CITOTÓXICA Y GENOTÓXICA.

En la hora cero se aplicaron los tratamientos a cada uno de los ratones mediante una inyección intraperitoneal. A la hora 48 y 72 se extrajo una pequeña muestra de sangre en un portaobjetos de la arteria ventral de la cola (aprox. 10 μ L) y con un cubreobjetos se hizo un extendido de la sangre lo más fino posible con el fin de obtener una distribución uniforme. Se hizo una prefijación con metanol por 15 minutos y se dejaron secar las placas por 24 horas. Posteriormente, en la coloración, las placas fueron sumergidas en metanol por 2 minutos y luego en colorante Wright's puro por 15 minutos. Finalmente las placas fueron lavadas sumergiéndolas en agua destilada por 2-5 segundos y coloreadas con Giemsa al 6% (pH 6.8) previamente filtrado, durante 30 minutos e inmediatamente lavadas con agua destilada, secadas al aire, y listas para la lectura de micronúcleos (Hoyos, *et al.*, 2002)

9. RESULTADOS

9.1. CONCENTRACIÓN PROTEICA DEL VENENO DE *Bothrops asper*

En la tabla 4 se observa la cantidad en volumen (mL) y en concentración de proteína (mg/mL) del veneno puro, de la solución madre y de la solución de trabajo utilizada en la investigación.

Tabla 4. Valores obtenidos, en volumen y concentración, de la cuantificación del veneno de *Bothrops asper*.

Unidades	Veneno puro	Solución madre	Solución de trabajo
Volumen (mL)	0,78 (extraído)	2,78	50
Concentración (mg/mL)	192,9876	54.21	0,5421

9.2 EFECTO TÓXICO (DL₅₀).

En la tabla 5 se presenta el peso en gramos de los ratones utilizados en la determinación de la DL₅₀, el volumen en μL , de veneno inyectado, la dosis correspondiente suministrada a cada uno en $\mu\text{g/g}$., el resultado de muerte (+) y supervivencia (-) luego de un seguimiento individual de 30 minutos y los respectivos cálculos de logaritmos y antilogaritmos.

Tabla 5. Valores obtenidos para la determinación de la DL₅₀ del veneno de *Bothrops asper* (la concentración del veneno con el que se trabajó fue de 0,5421 µg/µL).

No Ratón	µg/g veneno	λ (µL veneno)	Peso ratón (g)	Log λ /g ratón →	Vive (-) +0,04
				10 ^x ←	Muere (+) -0,04
1	5,68	383	36,53	1,02 (1,06)	- (+0,04)
				11,48(1,06)	
2	6,23	399	34,71	1,06 (1,02)	+ (-0,04)
				10,48 (1,02)	
3	5,68	383	36,54	1,02 (1,06)	- (+0,04)
				11,49 (1,06)	
4	6,23	422	36,72	1,06 (1,10)	- (+0,04)
				12,60 (1,10)	
5	6,83	444	35,25	1,10 (1,06)	+ (-0,04)
				11,49 (1,06)	
6	6,22	419	36,50	1,06 (1,10)	- (+0,04)
				12,59 (1,10)	
7	6,82	465	36,95	1,10 (1,06)	+ (-0,04)
				11,48 (1,06)	
8	6,22	421	36,70	1,06 (1,10)	- (+0,04)
				12,58 (1,10)	
9	6,82	445	35,37	1,10 (1,06)	+ (-0,04)
				11,47 (1,06)	
10	6,22	414	36,08	1,06 (1,10)	- (+0,04)
				12,58 (1,10)	
11	6,82	429	34,08	1,10 (1,06)	+ (-0,04)
				11,48 (1,06)	
12	6,23	424	36,90	1,06 (1,10)	- (+0,04)
				12,60 (1,10)	
13	6,83	447	35,50	1,10 (1,06)	+ (-0,04)
				11,48 (1,06)	

El promedio (mediana) obtenido, con base en los datos de la tabla 5, mediante el método Hodges y Lehmann a través del software estadístico de Carlos Sevcick (1998) fue de 6.52 µg/g con un intervalo de confianza del 95% de 6.23 – 6.83. Este valor se tomó como la DL₅₀ del veneno de *Bothrops asper*.

9.3 DETERMINACIÓN DE LA DMT Y DEMÁS TRATAMIENTOS

Se encontró que la DMT equivale al 20% de la DL₅₀, es decir, 1.304 µg/g peso. Con base en este resultado se calculó el 50% de la DMT como DM, es decir, 0.652 µg/g peso, y el 50% de la DM como la DB, es decir 0.326 µg/g peso.

9.4 EFECTO CITOTÓXICO

En la tabla 6 y la figura 8 se resume el número promedio de EPC identificados al analizar 3000 ENC en sangre periférica de ratón (ver figura 7), a las horas 48 y 72 después del tratamiento con veneno de *Bothrops asper* a las concentraciones 0,000, 0,326, 0,652 y 1,304, µg/g de peso corporal y ciclofosfamida a la concentración de 50 µg/g como control positivo. El grupo control negativo corresponde a la concentración 0.000 µg/g (solvente puro) y fueron tratados con solución salina de NaCl (0.9%) el cual fue el disolvente del veneno.

Tabla 6. Promedio de EPC/3000 ENC obtenidos al evaluar las muestras de sangre de 7 ratones por tratamiento, a las 48 y 72 horas de administradas las dosis.

Tratamientos (µg/g)	Tiempo	Media	Error Estándar	Desviación Estándar
0,000 (Control Negativo)	48 h	121,143	6,765	24,53
	72 h	136,571	6,765	39,91
0,326 (Dosis Baja)	48 h	39,429	6,765	7,63
	72 h	51,857	6,765	8,71
0,652 (Dosis Media)	48 h	55,286	6,765	12,82
	72 h	59,571	6,765	10,36
1,304 (Dosis Alta)	48 h	89,857	6,765	23,76
	72 h	74,000	6,765	17,25
Ciclofosfamida (Control Positivo)	48 h	26,286	6,765	4,82
	72 h	21,429	6,765	2,57

p* = 0,000

p** = 0,357

* Nivel de Significancia para comparar los tratamientos, calculado mediante la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis.

** Nivel de Significancia para comparar los tiempos de muestreo, calculado mediante la prueba no paramétrica de los Rangos con Signo de Wilcoxon.

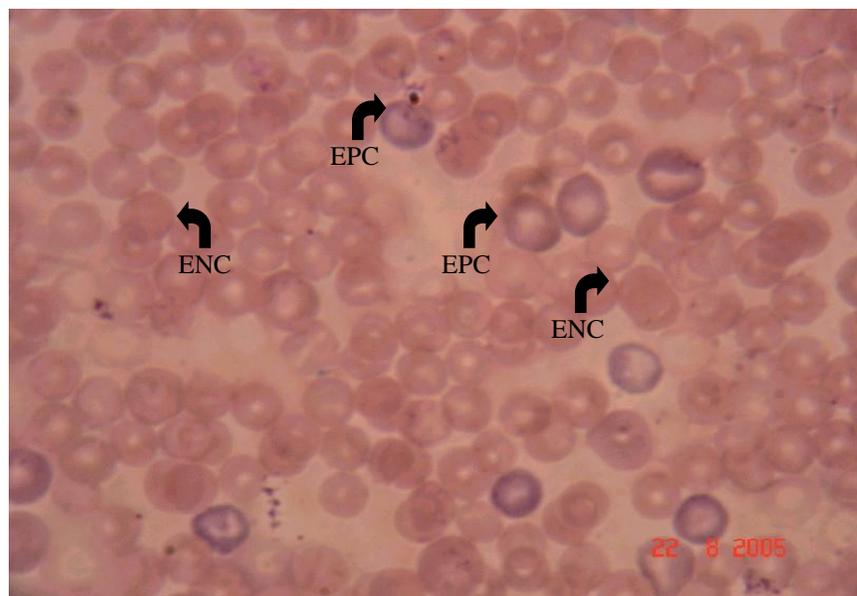


Figura 7. Eritrocitos policromáticos en eritrocitos normocromáticos

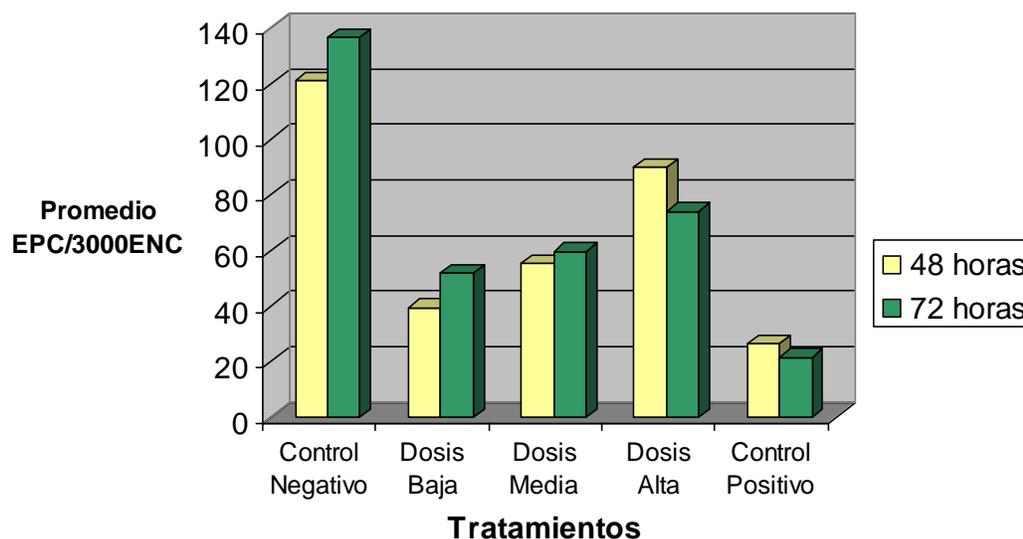


Figura 8. Promedio total de EPC/3000 ENC inducido por el veneno de *Bothrops asper* a las 48 y 72 horas después del tratamiento.

En la tabla 6 se observa que, mediante la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis, existe una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,05$) en el número promedio de EPC/3000ENC al comparar los tratamientos. Mediante la Prueba de Comparaciones Múltiples de Duncan, se observa que el veneno de *Bothrops asper* presenta propiedades citotóxicas en las tres dosis aplicadas siendo la de mayor efecto citotóxico la dosis baja (0,326 $\mu\text{g/g}$) con $39,429 \pm 12,972$ y $51,857 \pm 15,745$ EPC/3000ENC a las horas 48 y 72 respectiva-

mente, seguida de la dosis media (0,652 $\mu\text{g/g}$) con $55,286 \pm 12,972$ y $59,571 \pm 15,745$ EPC/3000ENC a las horas 48 y 72 respectivamente y después las dosis alta (1,304 $\mu\text{g/g}$) con $89,857 \pm 12,972$ y $74,000 \pm 15,745$ EPC/3000ENC a las horas 48 y 72 respectivamente.

Además se pudo determinar que, mediante la prueba no paramétrica de los Rangos con Signo de Wilcoxon, no existe una influencia estadísticamente significativa ($p > 0,05$) de los tiempos de muestreo (48 y 72 horas) en el efecto citotóxico del veneno de *Bothrops asper* para las tres concentraciones.

Mediante la prueba de Coeficiente de Correlación se pudo determinar que existe una relación marcada de dosis – efecto ($p < 0,05$) entre las dosis aplicadas del veneno de *Bothrops asper* y el número promedio de EPC/3000ENC, tanto a las 48 como a las 72 horas después de aplicados los tratamientos (ver figuras 9 y 10).

No. Promedio de EPC/3000 ENC a 48 h

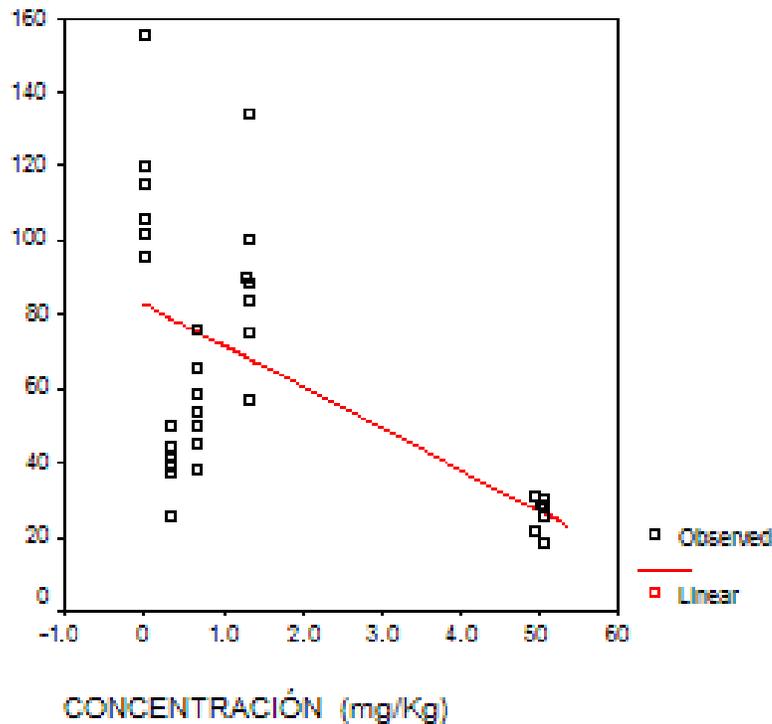


Figura 9. Número promedio de EPC/3000ENC a 48 h. en los diferentes tratamientos.

No. Promedio de EPC/3000 ENC a 72 h

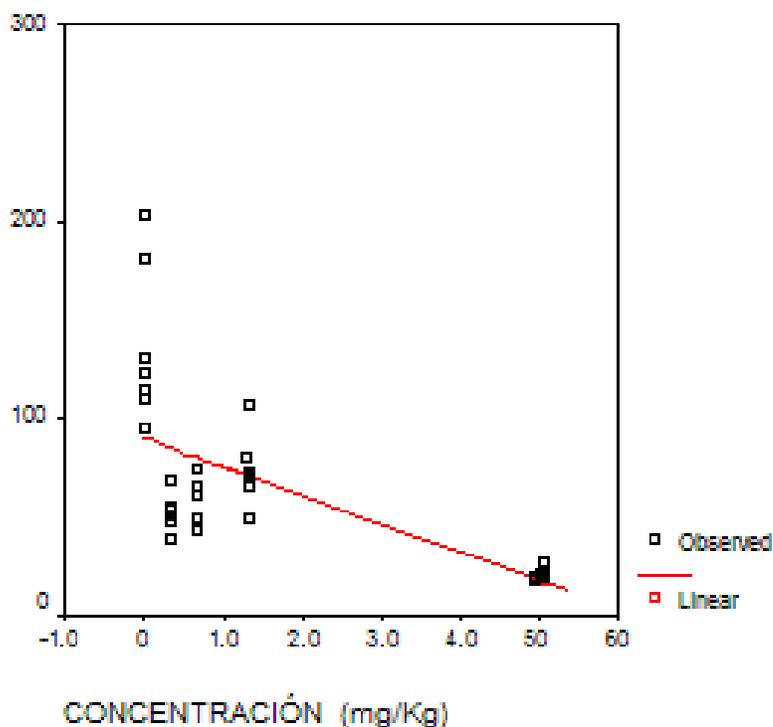


Figura 10. Número promedio de EPC/3000ENC a 72 h. en los diferentes tratamientos.

9.5 EFECTO GENOTÓXICO

En la tabla 7 y la figura 13 se resume el número promedio de micronúcleos identificados al analizar 3000 EPC en sangre periférica de ratón (ver figuras 11 y 12) a las horas 48 y 72 después del tratamiento con veneno de *Bothrops asper* a las concentraciones 0,000, 0,326, 0,652 y 1,304, $\mu\text{g/g}$ de peso corporal y ciclofosfamida a la concentración de 50 $\mu\text{g/g}$ como control positivo. El grupo control negativo corresponde a la concentración 0,000 $\mu\text{g/g}$ (solvente puro) y fueron tratados con solución salina de NaCl al 0.9% el cual fue el disolvente del veneno.

Tabla 7. Promedio de MN/3000 EPC obtenidos al evaluar las muestras de sangre de 7 ratones por tratamiento, a las 48 y 72 horas de administradas las dosis.

Tratamientos ($\mu\text{g/g}$)	Tiempo	Media	Error Estándar	Desviación Estándar
0,000 (Control Negativo)	48 h	3,143	0,389	0,90
	72 h	3.857	0,514	1,21
0,326 (Dosis Baja)	48 h	5,000	0,389	1,00
	72 h	7,143	0,514	1,07
0,652 (Dosis Media)	48 h	7,000	0,389	7,00
	72 h	8,286	0,514	8,29
1,304 (Dosis Alta)	48 h	9,714	0,389	9,71
	72 h	13,714	0,514	13,71
Ciclofosfamida (Control Positivo)	48 h	11,714	0,389	11,71
	72 h	12,143	0,514	12,14

$p^* = 0,000$

$p^{**} = 0,000$

- * Nivel de Significancia para comparar los tratamientos, calculado mediante la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis.
- ** Nivel de Significancia para comparar los tiempos de muestreo, calculado mediante la prueba no paramétrica de los Rangos con Signo de Wilcoxon.

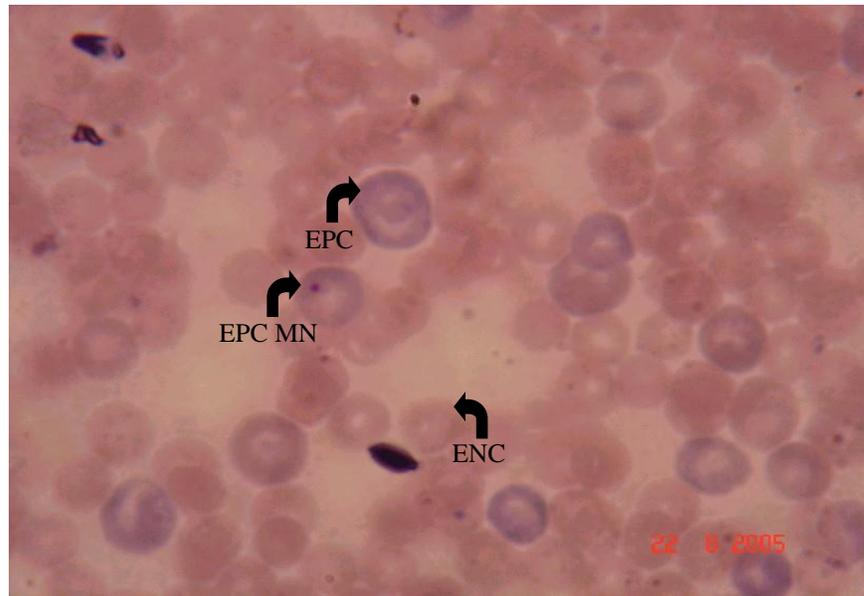


Figura 11. Micronúcleo en eritrocito policromático inducidos por el veneno de *Bothrops asper*

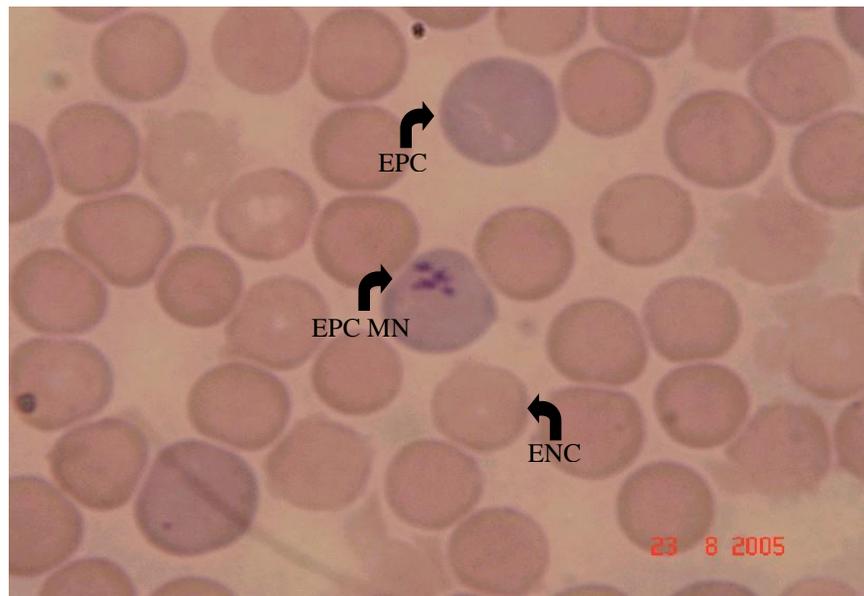


Figura 12. Eritrocito policromático con 4 micronúcleos inducido por el veneno de *Bothrops asper*.

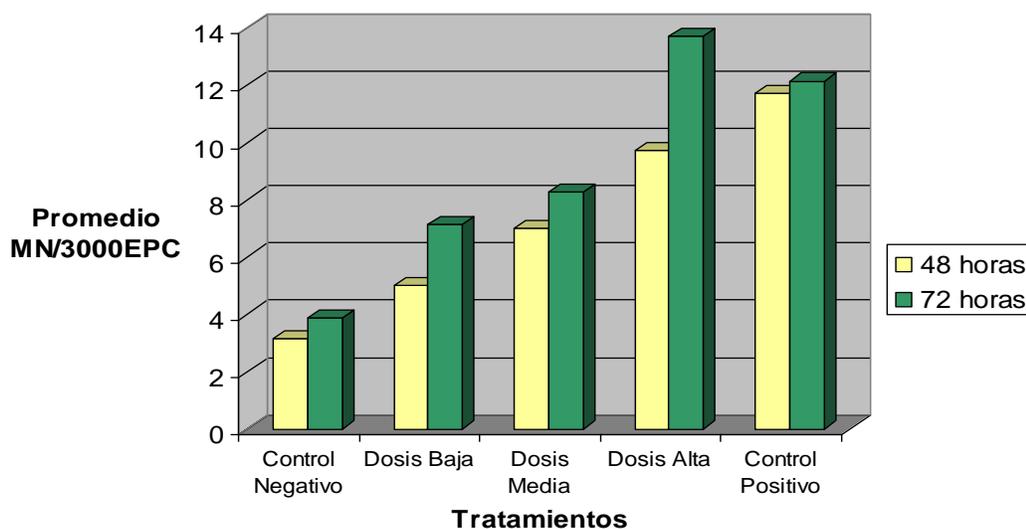


Figura 13. Promedio total de MN/3000 EPC inducido por el veneno de *Bothrops asper* a las 48 y 72 horas después del tratamiento.

En la tabla 7 se observa que, mediante la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis, existe una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,05$) en el número promedio de MN/3000EPC al comparar los tratamientos. Mediante la Prueba de Comparaciones Múltiples de Duncan, se observa que el veneno de *Bothrops asper* presenta propiedades genotóxicas en las tres dosis aplicadas siendo la de mayor efecto genotóxico la dosis alta (1,304 $\mu\text{g/g}$) con $9,714 \pm 0,793$ y $13,714 \pm 1,049$ MN/3000EPC a las horas 48 y 72 respectivamente, seguida de la dosis media (0,652 $\mu\text{g/g}$) con $7,000 \pm 0,793$ y $9,571 \pm 1,049$ MN/3000EPC a las horas 48 y 72 respectivamente y después las dosis baja (0,326 $\mu\text{g/g}$) con $5,000 \pm 0,793$ y $7,143 \pm 1,049$ MN/3000EPC a las horas 48 y 72 respectivamente.

Sin embargo, y a diferencia del análisis citotóxico, se pudo determinar que, mediante la prueba no paramétrica de los Rangos con Signo de Wilcoxon, sí existe una influencia estadísticamente significativa ($p < 0,05$) de los tiempos de muestreo (48 y 72 horas) en la producción de micronúcleos inducidos por el veneno de *Bothrops asper*. Se induce una mayor frecuencia de MN/3000 EPC a las 72 horas después del tratamiento. A la dosis alta (1,304 $\mu\text{g/g}$), la frecuencia de MN/3000 EPC a las 72 horas es mayor que la inducida por la ciclofosfamida (ver figura 9).

Mediante la prueba de Coeficiente de Correlación se pudo determinar que, al igual que en el efecto citotóxico, existe una relación marcada de dosis – efecto ($p < 0,05$) entre las dosis aplicadas del veneno de *Bothrops asper* y el número promedio de MN/3000EPC, tanto a las 48 como a las 72 horas después de aplicados los tratamientos (ver figuras 14 y 15).

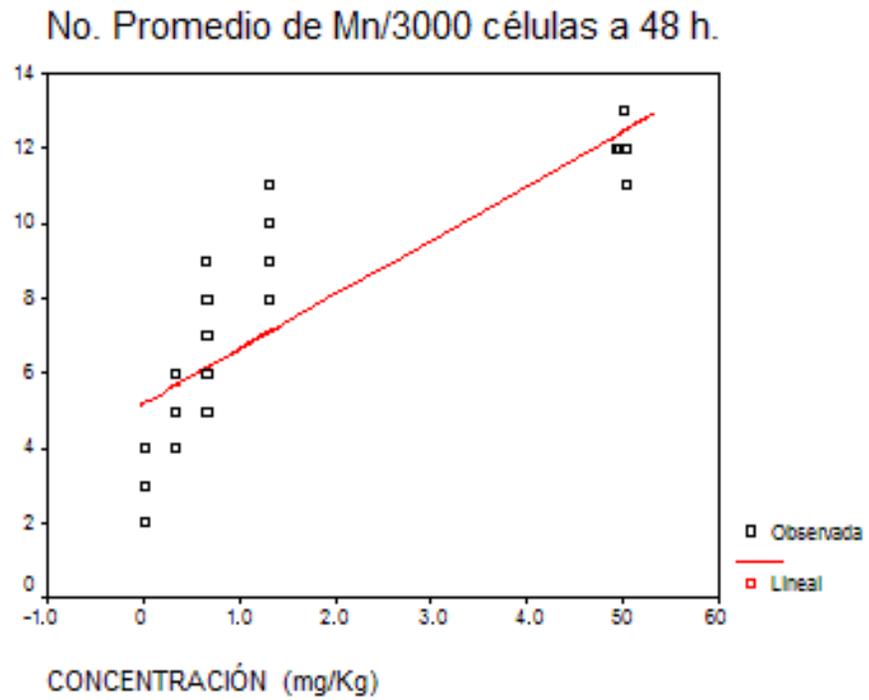
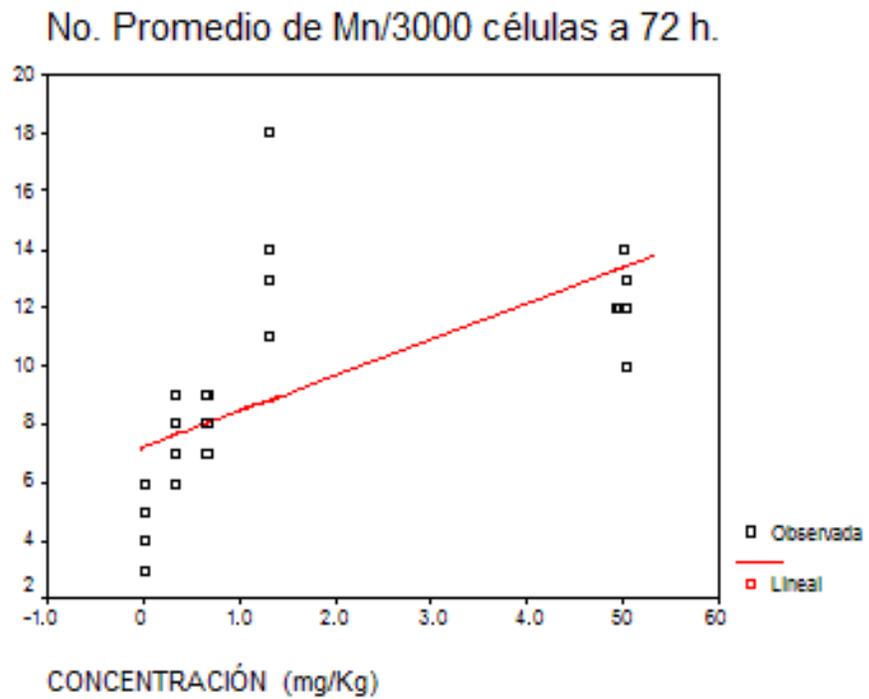


Figura 14. Número promedio de MN/3000EPC a 48 h. en los diferentes tratamientos.



10. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Para la cuantificación del veneno de trabajo, se extrajeron muestras de tres ejemplares de *Bothrops asper* del municipio de El Tambo, departamento del Cauca, realizando una mezcla o “pool” de estos venenos para su cuantificación, con el fin de obtener un promedio en la concentración de los tres ejemplares. Al final el valor obtenido fue de aproximadamente 193 mg/mL, el cual, aunque está por debajo del promedio reportado (205 mg/mL) (ver figura 1) se encuentra dentro del intervalo establecido para esta especie (100 – 310 mg/mL). Este resultado está de acuerdo con lo establecido por Chippaux (1993) quien afirma que la concentración del veneno es directamente proporcional a la edad de la serpiente en una misma especie. Los ejemplares de *Bothrops asper*, a los cuales se les cuantificó el veneno, fueron clasificados dentro del estado adulto, debido a su peso, tamaño y longitud, razón por la cual la concentración de su veneno no alcanza a superar el promedio establecido, y, sin embargo, su valor cumple el rango establecido.

El valor de la DL_{50} del veneno de *Bothrops asper* determinado en esta investigación (6,52 $\mu\text{g/g}$) no concuerda con el reportado por Saravia, *et al.*, (2001) con un valor de 5,68 $\mu\text{g/g}$ (4,45 – 7,24) para *Bothrops asper* de Guatemala. Sin embargo, esta diferencia no es significativa ya que el valor determinado se encuentra dentro del intervalo de la media establecida por Saravia *et al.* Pese a esto, esta diferencia demuestra la variabilidad en los componentes y la diferencia de concentración que existe entre venenos de serpientes de la misma especie, que influyen en la diferencia de los resultados, lo que pudiera indicar que el veneno de *Bothrops asper* del municipio de El Tambo, departamento del Cauca, posee una menor letalidad comparada con *Bothrops asper* de Guatemala. Sin embargo, no solamente estas posibles diferencias de concentración del veneno de las dos especies son necesarias para fundamentar una diferencia de letalidad, pues también hay que tener en cuenta los posibles contrastes de edades de las dos especies, sus dietas y el tiempo de cautiverio. Pese a esto, se observa que la DL_{50} determinada se encuentra apropiadamente dentro del rango reportado por Saravia, *et al.*, por lo que se le puede considerar como un valor acertado, pues, al final, se están comparando dos especies iguales.

En esta investigación se estableció que las tres dosis aplicadas del veneno de *Bothrops asper* resultaron tener un efecto citotóxico ya que, como lo indica la prueba citotóxica utilizada, existió una disminución estadísticamente significativa en la producción de eritrocitos policromáticos en los tres tratamientos con respecto al grupo control negativo, lo cual indica su citotoxicidad eritropoyética. Sin embargo, como se observa en la figura 8, la dosis baja fue la que resultó tener una mayor citotoxicidad eritropoyética pues registró una menor producción de eritrocitos policromáticos, seguida de la dosis media y ésta seguida de la dosis alta. Además, este resultado está respaldado por el análisis de dosis – respuesta en el cual, como se observa en las figuras 9 y 10, tanto para las 48 como para las 72 horas después del tratamiento existe una relación inversamente proporcional entre la dosis aplicada de veneno y la citotoxicidad eritropoyética que produce.

Este resultado se puede esclarecer teniendo en cuenta que el veneno de serpiente es una mezcla compleja de diferentes tipos de proteínas, enzimas, péptidos, nucleótidos, aminoácidos libres, azúcares, lípidos, mucopolisacáridos, iones, entre otros, los cuales cumplen funciones determinadas en sitios específicos durante el envenenamiento. A raíz de esto, y teniendo en cuenta las reacciones en la fase aguda por envenenamiento bothrópico, como fue explicado en el marco teórico (ver figura 2), si se aplica un tratamiento con una dosis baja de veneno al animal objeto de experimentación, en este caso ratones, la respuesta inmunológica y todo su desencadenamiento, que termina con la sobreproducción de células sanguíneas del sistema inmune para contrarrestar los agentes extraños del veneno y de eritrocitos para contrarrestar los efectos de hipoxia e hipotensión, también será baja, debido a que está entrando una menor concentración de componentes del veneno que son los agentes que estimulan dicha respuesta, resultando así, una respuesta baja de la sobreproducción de eritrocitos y de células centinela. Pero mientras esto ocurre, y al existir una respuesta inmunológica baja, pues las células centinela de la sangre no se están sobreproduciendo, los otros componentes del veneno, aunque estén también en menor concentración, están actuando y tendrían una mayor incidencia, teniendo así menor impedimento para producir su citotoxicidad en la producción de eritrocitos, induciendo la formación de aglomerados estables que permiten el transporte iónico permanente en la membrana celular sin que este llegue a cerrarse, (Díaz, *et al.*, 1997) y la peroxidación de lípidos que conforman la membrana celular, alterando su capacidad selectiva (Teibler, *et al.*, 1999) y activando ciertos receptores volviéndose permanentes, (Lennartz, 1998; Aderem y Underhill, 1999) permitiendo así que diferentes enzimas con poder citotóxico se encarguen de producir la citotoxicidad eritropoyética. Este mecanismo citotóxico se pueda explicar cuando dichas enzimas, como ATPasas, nucleótido pirofosfatasa, exopeptidasas, hialuronidasas y proteasas, (Theakston y Reid. 1983) reaccionan con ciertos compuestos químicos complejos como el óxido nítrico (NO) que desempeña un papel esencial en muchos procesos biológicos como molécula señal, transformándose en peróxido nítrico (ONOO⁻) (Beckmann, *et al.*, 1990), el cual puede reaccionar con importantes moléculas biológicas blanco, modificándolas y degradándolas, especialmente lípidos, proteínas de membrana celular y ácidos nucleicos que conducen a la muerte celular (Prior y Squadrito, 1995). Este mecanismo explica por que se registró una baja producción de eritrocitos policromáticos para la dosis baja, resultando ésta más citotóxica con respecto a la dosis media y a la dosis alta.

Esta aclaración permite entender por qué la dosis media y la dosis alta, resultaron tener una menor citotoxicidad. Al aplicar un tratamiento de veneno con una dosis alta, la respuesta inmunológica y todo lo que ésta desencadena, también será alta, a causa de una mayor concentración de los componentes del veneno que están entrando. Según las reacciones en la fase aguda por envenenamiento bothrópico, una mayor respuesta inmunológica terminaría con una alta sobreproducción de eritrocitos y de células del sistema inmune, con el fin de contrarrestar las posibles complicaciones de hipoxia e hipotensión en los tejidos y en la sangre, y de atacar los agentes extraños que están entrando con el veneno, respectivamente. Este mecanismo explica que el mayor número de eritrocitos policromáticos registrados a la concentración alta, comparado con la dosis baja, fue debido a su sobreproducción. Pero no hay que olvidar que también la dosis alta resultó tener, según el análisis estadístico, citotoxicidad eritropoyética, a pesar de la sobreproducción de eritrocitos. Y esto se fundamenta

en que en esta dosis, no solo están entrando agentes que estimulan la respuesta inmunológica, sino también los que causan directamente el efecto de citotoxicidad eritropoyética, explicados anteriormente, a una mayor concentración por lo que, según los resultados, supera dicha respuesta.

El veneno bothrópico contiene diferentes proteínas y, especialmente, enzimas, causantes de los principales efectos en las víctimas. Dentro de las más importantes encontradas en este tipo de veneno se encuentran las fosfodiesterasas que, como su nombre lo indica, rompe enlaces fosfodiéster. Un grupo de estas enzimas son las exonucleasas, enzimas capaces de degradar ácidos nucleicos removiendo mononucleótidos sucesivos en cadenas de polinucleótidos, dentro de las cuales se encuentran ribonucleasas y desoxirribonucleasas que interactúan con el material genético. (Barraviera, 1999).

Sittenfeld-Appel *et al.*, (1991) demostraron que el veneno de *Bothrops asper*, presenta toxinas con actividad DNAsa y RNAsa mediante la técnica de electroforesis en geles de agarosa/DNA en el cual se puede cuantificar la degradación del ADN. Su estudio demostró que una mayor concentración del veneno posee, en proporción directa, mayor cantidad de este tipo de enzimas por lo que las altas concentraciones de veneno bothrópico afectaría mayormente al ADN de las células blanco.

Pese a la investigación antes indicada, no se ha realizado ninguna determinación del efecto genotóxico de venenos de origen animal utilizando un biomarcador como el de micronúcleos, que permita asociar al agente evaluado, sea a mediano o largo plazo, con posibles complicaciones de origen mutagénico en las víctimas, ya que los micronúcleos están asociados como precursores de daños cromosómicos como rupturas y translocaciones en los cromosomas, denominadas aberraciones cromosómicas, las cuales, son un biomarcador de efecto en enfermedades como el cáncer.

Uno de los fines de esta investigación fue dar inicio a este tipo de investigaciones obteniéndose los siguientes resultados. Como se observa en la figura 13, el número de micronúcleos cuantificados en eritrocitos policromáticos, va en proporción directa con la concentración del veneno, lo cual concuerda con que a una mayor concentración de este, existe también una mayor concentración de exonucleasas con actividad DNAsa que interactúan con el material genético. Además, este resultado se respalda en el análisis de dosis – respuesta en el cual, como se observa en las figuras 14 y 15, tanto para las 48 como para las 72 horas después del tratamiento existe una relación directamente proporcional entre la dosis aplicada de veneno y la frecuencia de micronúcleos que produce. Sin embargo, es necesario tener en cuenta que en la etapa de eritrocitos ortocromáticos, en la cual se forman los micronúcleos al existir rupturas de cromatina y quedar fragmentos de ésta en la célula, se esperaría una degradación total del ADN por acción de las desoxirribonucleasas, impidiendo registrar daños a la hora de evaluar los tratamientos. Pese a este posible criterio se cuantificaron micronúcleos en orden proporcional en los diferentes tratamientos. El resultado genotóxico de esta investigación puede aclarar esta contradicción demostrando que la concentración de exonucleasas es directamente proporcional a la concentración del veneno, pues es necesario tener en cuenta que las dosis aplicadas corresponden a porcentajes muy bajos de la DL₅₀

determinada (5% para la dosis baja, 10% para la dosis media y 20% para la dosis alta), aplicando por ende, cantidades mínimas de μg . de veneno, en cuyas dosis también existirían bajos porcentajes de exonucleasas que no alcanzarían a degradar totalmente el ADN, pero sí, como lo indica una de sus propiedades bioquímicas mencionadas anteriormente, romperían enlaces fosfodiéster en la molécula de ADN de la célula blanco, creando quiebres y formando micronúcleos.

Según el análisis descriptivo, el tiempo, en este experimento, tiene una influencia estadísticamente significativa en la producción de micronúcleos, existiendo un mayor porcentaje de éstos a las 72 horas que a las 48 horas después de aplicados los tratamientos. Esto señala la capacidad de acción de las exonucleasas en interactuar con el material genético formando micronúcleos, teniendo en cuenta el punto del ciclo celular, durante el proceso eritropoyético, en el cual fueron formados. Los micronúcleos son inducidos por el agente genotóxico en la etapa de interfase del ciclo celular el cual dura aproximadamente 34 horas (Schmid, 1975), los cuales, después de la mitosis, y del momento en el que el eritroblasto madura en eritrocito y expulsa el núcleo durante la etapa de eritrocito ortocromático que tiene un promedio de duración de 8 horas, son conservados en los eritrocitos policromáticos en formación (Heddle *et al.*, 1983), como se observa en la figura 16.

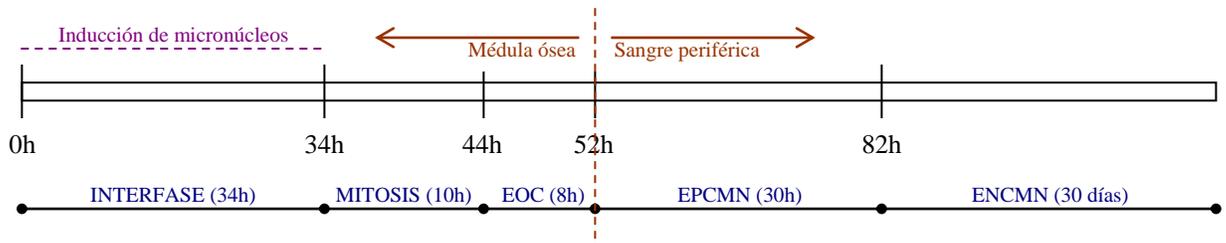


Figura 16. Punto de formación de micronúcleos en eritroblastos durante la interfase del ciclo celular y su manifestación en eritrocitos policromáticos (EPCMN) en ratones.

Ahora bien, como la duración de la interfase tiene un intervalo de duración relativamente extenso, al llegar el veneno, junto con sus componentes genotóxicos, las células que se ven afectadas por estos componentes se encuentran en diferentes tiempos de interfase. Esta diferencia hace que se explique por qué existe una mayor cuantificación de micronúcleos a las 72 horas después del tratamiento, y es al parecer, porque la inducción de micronúcleos se produce, en la fase temprana de la interfase. Esta inducción en la fase temprana, hace que 48 horas después el eritroblasto afectado aún no esté conformado como eritrocito policromático, por lo que los micronúcleos formados en esta fase temprana no se logren cuantificar en este tiempo (ver figura 17).

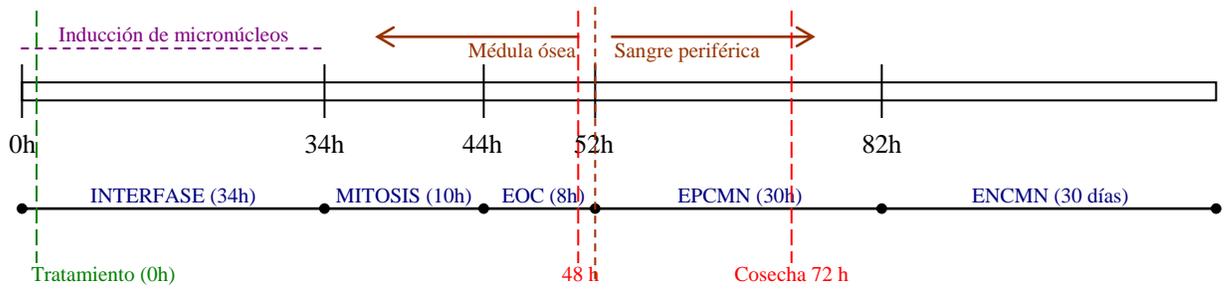


Figura 17. Inducción de micronúcleos en fase temprana de la interfase.

A raíz de lo anterior se puede esclarecer entonces por qué se cuantificaron de todas formas micronúcleos a las 48 horas. Necesariamente la inducción de estos micronúcleos tuvo que suceder en una fase posterior a una fase inicial de la interfase del eritroblasto, para que 48 horas después, en la cosecha, pasara el tiempo necesario para la conformación de eritrocito policromático, y así detectar los micronúcleos durante su análisis (ver figura 18).

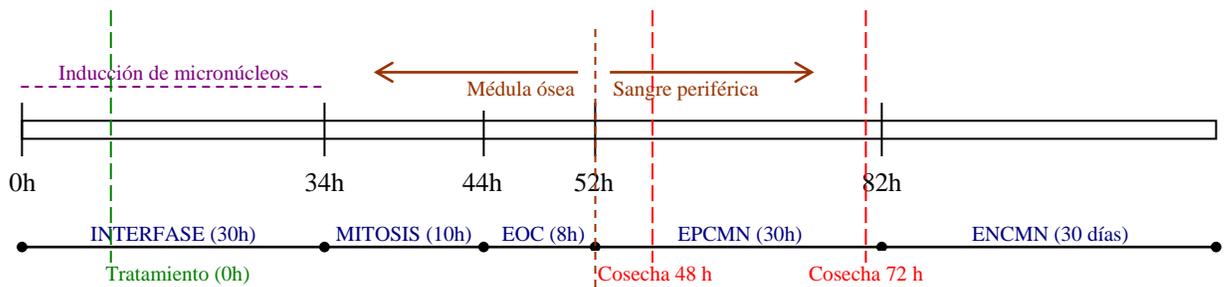


Figura 18. Inducción de micronúcleos en fase intermedia de la interfase

Los micronúcleos que se formaron de más, registrados a la hora 72 después del tratamiento, serían los que se formaron en la fase temprana de la interfase mas los que se formaron en la fase tardía.

El anterior análisis muestra que los componentes genotóxicos del veneno de *Bothrops asper* inducen micronúcleos durante todas las fases de la interfase del eritroblasto, las cuales son G₁, con una duración de 15 horas en la cual la célula crece y aumenta de tamaño, fase S o de Síntesis, con una duración de 9 horas donde ocurre la duplicación del ADN y G₂, con una duración de 10 horas, donde ocurre la reparación del ADN (Heddle *et al.*, 1983).

Esta información es necesaria para entender por qué, como se observa en la figura 9, la dosis alta de veneno de *Bothrops asper*, a las 72 horas después del tratamiento, supera en inducción de micronúcleos al control positivo ciclofosfamida, el cual es altamente mutagénico. De acuerdo al registro de laboratorio durante el análisis microscópico, en varios eritrocitos policromáticos se registraron entre 2 y 4 micronúcleos por célula, como se observa en la figura 18, los cuales, para su análisis estadístico, se registraron como micronúcleos independientes, es decir, incrementaron significativamente el numero total de micronúcleos en 3000 eritrocitos policromáticos para la dosis alta de veneno de *Bothrops asper* a las 72 ho-

ras después del tratamiento, razón por la cual superó el número registrado de micronúcleos inducidos por la ciclofosfamida en la misma cantidad de células y al mismo tiempo de aplicado el tratamiento, de una manera considerable. Este registro de eritrocitos policromáticos con 2 y 4 micronúcleos luego de 72 horas de aplicado el tratamiento es debido a que, como se discutió anteriormente, algunos de los micronúcleos registrados en este tiempo fueron inducidos en la fase temprana de la interfase, es decir, durante la fase G₁. El eritroblasto entra en esta fase G₁ justamente antes de entrar en la fase S o de Síntesis, fase de replicación del ADN. Entonces, si el micronúcleo inducido en G₁ pasa también a la fase S, replicará su ADN registrando un doble micronúcleo cuando el eritroblasto ya sea un eritrocito policromático.

Para los eritrocitos policromáticos registrados con 4 micronúcleos, existió una inducción de 2 micronúcleos en fase G₁ duplicando a 4 micronúcleos en la fase S. Esto explica por qué en la dosis media y baja de veneno, también se registraron eritrocitos policromáticos con micronúcleos dobles.

Es muy probable que el mecanismo molecular de la inducción de micronúcleos por parte de las exonucleasas presentes en el veneno de *Bothrops asper*, esté acompañada por varios compuestos, también presentes en el veneno, que favorezcan la entrada de dichas enzimas hasta el núcleo del eritroblasto y así producir el daño en el ADN. Dentro de estos compuestos, debido a sus propiedades químicas y a sus efectos biológicos, se encuentran las fosfolipasas, conocidas anteriormente como lectinasas. Estas enzimas actúan en la célula afectando la membrana celular, las mitocondrias y el transporte de electrones. Tiene diferentes composiciones de acuerdo con la especie y edad de la serpiente. Los venenos del género *Bothrops* poseen una alta actividad fosfolipasa (Vidal, *et al.*, 1972). El efecto que estas enzimas ejercen sobre la membrana celular causa un aumento en su permeabilidad, pues actúan como catalizadores de reacciones que modifican la estructura química de las membranas, tanto celular como nuclear, destruyendo su permeabilidad selectiva y permitiendo el paso de sustancias que en condiciones normales no entrarían (Gutiérrez, *et al.*, 1995).

11. CONCLUSIONES

La concentración del veneno de tres serpientes *Bothrops asper*, colectada en el municipio de El Tambo, departamento del Cauca, fue de 192,9876 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, en estado adulto.

La Dosis Letal 50 del veneno de *Bothrops asper* se calculó haciendo uso de ratones cepa *ICR* y corresponde a 6,52 $\mu\text{g}/\text{g}$ cuyo valor, aunque difiere, no es estadísticamente significativo debido a que se encuentra dentro del intervalo calculado por Saravia, *et al.* (2001).

La citotoxicidad eritropoyética evaluada en ratones muestra que el veneno de *Bothrops asper* contiene compuestos citotóxicos capaces de producir muerte celular y bloquear el ciclo normal de división, siendo mayor en la concentración baja, seguida de la concentración media y menor en la concentración alta; efecto que se expresa en una reducción significativa de la proporción de eritrocitos policromáticos/eritrocitos normocromáticos con respecto al control negativo.

El efecto genotóxico registrado en el número de micronúcleos encontrados en 3000 eritrocitos policromáticos muestran que el veneno de *Bothrops asper* posee componentes genotóxicos que inducen quiebres en el ADN, manifestando un incremento significativo en la frecuencia de micronúcleos siendo mayor en la concentración alta, seguido de la dosis media y menor en la concentración baja.

El efecto de dosis – respuesta muestra que en el efecto citotóxico para las 48 y 72 horas después de aplicadas las dosis, la citotoxicidad eritropoyética es inversamente proporcional a la concentración del veneno de *Bothrops asper*, y para el efecto genotóxico también para las 48 y 72 horas después de aplicadas las dosis, la frecuencia de micronúcleos es directamente proporcional a la concentración del veneno.

La citotoxicidad eritropoyética determinada del veneno de *Bothrops asper* confirma la complejidad del mecanismo biológico de los venenos y los desencadenamientos moleculares que ocurren durante el proceso del envenenamiento ofídico.

El efecto genotóxico determinado del veneno de *Bothrops asper* confirma la presencia en su veneno de enzimas exonucleasas con actividad DNAsa que interactúan con el material genético generando una proliferación de micronúcleos.

12. RECOMENDACIONES

Por ser este el primer estudio en realizar una determinación genotóxica de un veneno de origen animal, se recomienda realizar más investigaciones utilizando biomarcadores de este mismo tipo en toxinas de otra clase de animales, como escorpiones o anfibios, que presenten una incidencia epidemiológica alta y un alto porcentaje de supervivencia en personas afectadas.

En la investigación con veneno de *Bothrops asper*, se recomienda utilizar el biomarcador Aberraciones Cromosómicas en ratones como siguiente paso, con el fin de confrontar estos resultados con los de ese biomarcador, para investigar con mejor precisión las propiedades citotóxicas y genotóxicas del veneno y complementar sus resultados.

Realizar estudios de caracterización molecular del veneno de *Bothrops asper* con el objeto de conocer con mejor precisión los compuestos bioquímicos que se están evaluando y realizar pruebas genotóxicas individuales de estos compuestos.

Ejecutar proyectos de monitoreo genético con pruebas *in vitro*, en donde se evalúen poblaciones expuestas al envenenamiento bothrópico, con niveles altos de supervivencia, utilizando biomarcadores como Aberraciones Cromosómicas y Micronúcleos en Humanos, que permitan predecir los potenciales riesgos de salud de estas poblaciones a largo plazo y complementen las pruebas *in vivo* realizadas.

BIBLIOGRAFIA

ADEREM, A. y UNDERHILL, D.M. Mechanisms of Phagocytosis. En: Annu. Rev. Immunol. Vol. 7. 1999. p. 593-623.

BARRANTES, A., SOLÍS, V. y BOLAÑOS, R. Alteración de los Mecanismos de la Coagulación en el Envenenamiento por *Bothrops asper* (Terciopelo). En: Toxicon Vol. 23. 1985. p. 399-407.

BARRAVIERA, B., Aspectos Clínicos e Terapêuticos dos Acidentes por Animais Preçonhentos. En: EPUB. 1999. p. 92-96, 205-223, 261-278

BECKMAN, J.S., BECKMAN, T.W., CHEN, J., MARSHALL, P.A. y FREEMAN, B.A. Apparent Hydroxyl Radical Production by Peroxynitrite: Implications for Endothelial Injury from Nitric Oxide and Superoxide. En: Proc. Natl. Acad. Sci. USA Vol. 87. 1990. p. 1620-1624.

BOLAÑOS, R. Serpientes, Venenos y Ofidismo en Centro y Sudamérica. San José: Universidad de Costa Rica. 1982. 136 p.

BULTRÓN, E., THELESTAM, M. y GUTIÉRREZ, J. M. Effects on Cultured Mammalian Cells of Myotoxin III, A Phospholipase A₂ Isolated from *Bothrops asper* (Terciopelo) Venom. En: Biochim. Biophys. Acta Vol. 1179. 1993. p. 253-259.

CHIPPAUX J.P., WILLIAMS V. y WHITE J. Snake Venom Variability: Methods of Study, Results and Interpretation. En: Toxicon Vol. 29. 1991. p. 1.279-1.303.

COSTA CARDOZO, J.L. Bothropic Accidents. En: Mem. Inst. Butantan Vol. 52. 1990. p. 43-44.

DÍAZ, E., CASTAÑO, S. y MATA LLANA E. Corrientes Eléctricas Producidas por Veneno de *Bothrops atrox* en Membranas Bilipídicas. En: Revista Colombiana de Física. Vol. 29. 1997. p. 411-414.

FERRI, V. El Libro de las Serpientes del Mundo. Guía de identificación; con ilustraciones en color. Barcelona: De Vecchi, 1992. p. 25.

GRISWOLD, J.M., LÔBO DE ARAÚJO, A., DE SOUZA, A. O. y BON, C. Pharmacological Evaluation of Mouse Paw Edema Induced by *Bothrops lanceolatus* Venom. En: Toxicon. Vol. 34. 1996. p. 165-166.

GUTIÉRREZ, J.M., ARROYO, O. y BOLAÑOS, R. Mionecrosis, Hemorragia y Edema Inducidos por Veneno de *Bothrops asper* en Ratón Blanco. En: *Toxicon* Vol 18. 1980. p. 603- 610.

_____ y CHAVEZ, F. Efectos Proteolíticos, Hemorrágicos y Mionecróticos de los Venenos de Serpientes Costarricenses de los Géneros *Bothrops*, *Crotalus* y *Lachesis*. En: *Toxicon* Vol. 18 1980. p. 315-318

_____ y LOMONTE B. Phospholipase A₂ Myotoxins from *Bothrops* Snake Venoms. *Toxicon* Vol. 33. 1995. p. 1405-1424.

_____, OWNBY, C.L. y ODELL, G.V. Pathogenesis of Myonecrosis Induced by Crude Venom and Myotoxin of *Bothrops asper*. En: *Exp. Molec. Pathol.* Vol. 40. 1984. p. 367-379.

_____. Local Pathological Effects Induced by *Bothrops* Snake Venoms. A Review. En: *Mem Inst Butantan.* Vol. 52. 1990. p. 8-37

HAYASHI, M., TICE, R.R., MCGREGOR, J.T., ANDERSON, D., BLACKKEY, D.H., KIRSCH-VOLDERS, M., OLESON, F.B., PACCHICROTTI, F., ROMAGNA, F., SHIMADA, H., SUTOU, S. y VANNIER, B. *In vivo*, Rodent Erythrocyte Micronucleus Assay. En: *Mutation Research.* Vol. 312. 1994. p. 293-304.

_____ y SOFUNI, T. The Need for Three Dose levels to Detect Genotoxic Chemicals in *in vivo* Rodents Assays. En: *Mutation Research.* Vol. 327. 1995. p. 247-251.

HEDDLE, J.A., SALAMONE, M.F., HITE, M., KIRKHART, B., MAVOURNIN, K., MACGREGOR, J.G. y NEWELL, G.W. The Induction of Micronuclei as a Measure of Genotoxicity. En: *Mutation Research.* Vol. 123. 1983. p. 61-118.

HIGASHIKUNI, N. y SUTOU, S. An Optimal, Generalized Sampling Time of 30 ± 6 h. After Double Dosing in the Mouse Peripheral Blood Micronucleus Test. En: *Mutagenesis.* Vol. 10. 1995. p. 313-319.

HOYOS, L.S., CARVAJAL, S. y CAJAS, N. Manual de Pruebas Citogenéticas y Letales Dominantes en Ratón. Universidad del Cauca. FACNED. Departamento de Biología Unidad de Toxicología Genética y Citogenética.

HUDLESON, S. y HUDLESON, P. Pathophysiology of Snake Envenomization and Evaluation of Treatment. Part I. En: *Continuing Education Articles* Vol. 17. 1995. p. 889-895.

KINI, R.M. Phospholipase A₂. A Complex Multifunctional Protein Puzzle. En: Kini, S., *Venom Phospholipase A₂ Enzymes: Structure, Function and Mechanism*, Wiley, Chichester 1997. p. 1-28.

_____ y EVANS, H. J. A Model to Explain the Pharmacological Effects of Snake Venom Phospholipases A₂. En: *Toxicon*. Vol. 27. 1987. p. 613-635.

KOCHVA, E., VILJOEN C.C. y BOTES, D.P. A New Type of Toxin in the Venom of Snakes of the Genus *Atractaspis* (Atractaspidinae). En: *Toxicon*. Vol. 20. 1982. p. 581-592
LENNARTZ, M.R. Phospholipases and Phagocytosis: The Role of Phospholipid-Derived Second Messengers in Phagocytosis. En: *Int. J. Biochem. & Cell Biology* Vol. 31. 1998. p. 415-430.

LOMONTE, B., TARKOWSKI, A. y HANSO, L.A. Host Response to *Bothrops asper* Snake Venom: Analysis of Edema Formation, Inflammatory Cells, and Cytokine Release in a Mouse Model. En: *Inflammation*. Vol. 17. 1993. p. 93-105.

_____, TARKOWSKI, A. y HANSON, L.A. Broad Cytolytic Specificity of Myotoxin II, a Lys-49 Phospholipase A₂ of *Bothrops asper* Snake Venom. En: *Toxicon* Vol. 32. 1994. p. 1359-1369.

_____, TARKOWSKI, A., BAGGE, U. y HANSON, L.A. Neutralization of the Cytolytic and Myotoxic Activities of Phospholipases A₂ from *Bothrops asper* Snake Venom by Glycosaminoglycans of the Heparin/Heparan Sulfate Family. En: *Biochem. Pharmacol.* Vol. 47. 1994. p. 509-1518.

_____, LUNDGREN, J., JOHANSSON, B. y BAGGE, U. The Dynamics of Local Tissue Damage Induced by *Bothrops asper* Snake Venom and Myotoxin II on the Mouse Cremaster Muscle: An Intravital and Electron Microscopic Study. En: *Toxicon* Vol. 32. 1994. p. 41-55.

_____, MORENO, E., TARKOWSKI, A., HANSON, L.A. y MACCARANA, M. Neutralizing Interaction between Heparins and Myotoxin II, a Lys-49 Phospholipase A₂ from *Bothrops asper* Snake Venom. Identification of a Heparin-Binding and Cytolytic Toxin Region by the Use of Synthetic Peptides and Molecular Modeling. En: *J. Biol. Chem.* Vol. 269. 1994. p. 29867-29873.

McGREGOR, J.T., SCHLEGEL, R. CHOY, W.N., y WEHR, C.M. Micronuclei in Circulating Erythrocytes: A Rapid Screen for Chromosomal Damage during Routine Toxicity Testing in Mice. En: *Developments in Science and Practice of Toxicology*, Ed. A.W. Hayes, R.C. Schnell and T.S. Miya, Elsevier, Amsterdam, 1983. p. 555-558.

_____, WEHR, C.M., HENIKA, P.R., y SHELBY, M.E. The *in vivo* Erythrocyte Micronucleus Test: Measurement at Steady State Increases Assay Efficiency and Permits Integration with Toxicity Studies. En: *Fund. Appl. Toxicol.* Vol. 14. 1990. p. 513-522.

MARKLAND, F.S. Snake Venoms and the Haemostatic System. En: *Toxicon*. Vol. 36. 1998. p. 1749-1800.

MARSHALL, P.N. Reticulation, Polychromasia and Stippling of Erythrocytes. En: *Microssc Acta*. Vol. 81. 1978. p. 89-106.

OROZCO, J. Ofidismo en el Cauca. Una Situación Venenosa. En: *El Liberal*. Popayán (27 Marz. 2004); p. 1A. 2A.

OTERO R., GUTIÉRREZ J., MESA M.B., DUQUE E., RODRÍGUEZ O. y ARANGO J.L. Complications of Bothropic Envenomation in Colombia. A Clinical and Epidemiological Study of 39 Cases Attended in a University Hospital. En: *Toxicon* Vol. 45. 2001. p. 1456-1501.

_____, OSORIO, R.G., VALDERRAMA, R. y GIRALDO, C.A. Efectos farmacológicos y enzimáticos de los venenos de serpientes de Antioquia y Chocó (Colombia). En: *Toxicon*, Vol. 30. 2002. p. 611-620.

OWNBY, C.L. Myotoxic Components of Snake Venoms. Their Biochemical Biological Activities. *Pharmac*. En: *Ther*. Vol. 48. 1990. p. 223-236.

_____, GUTIÉRREZ, L.M. y ODELL G.V. Pathogenesis of Myonecrosis Induced by Crude Venom and a Myotoxin of *Bothrops asper*. En: *Toxicon* Vol. 40. 1983. p. 367-369.

PÁRAMO, L., LOMONTE, B., PIZARRO-CERDÁ, J., BENGOCHEA, J.A., GORVEL, J.P. y MORENO, E. Bactericidal Activity of Lys49 and Asp49 Myotoxic Phospholipases A₂ from *Bothrops asper* Snake Venom: Synthetic Lys49 Myotoxin II-(115-129)-Peptide Identifies its Bactericidal Region. En: *Eur. J. Biochem*. Vol. 253. 1998. 452-461.

PORTER, R.H. y CZAPLICKI, J.A. Shedding Facilitates Exposure Learning in the Garter Snake (*Thamnophis sirtalis*). En: *Physiology & Behavior*. Vol. 12. 1974. p. 75-77

PRYOR, W. y SQUADRITO, G.L. The Chemistry of Peroxynitrite: A Product from the Reaction of Nitric Oxide with Superoxide. En: *Am. J. Physiol* Vol. 268. 1995. p. 1699-1722.

RENETSEDER, R., BRUNIE, S., DIJKSTRA, B.W., DRENTH, J. y SIGLER, P.B. A Comparison of the Crystal Structures of Phospholipase A₂ from Bovine Pancreas and *Crotalus atrox* Venom. En: *J. Biol. Chem*. Vol. 260. 1985. p. 11627-11634.

RIBIERO, L.A. Epidemiology of Ophidic Accidents. En: *Mem Inst Butantan*. Vol. 52. 1990. p. 6-15.

RODRIGUEZ-ACOSTA, A., AGUILAR, I. y GIRON, M.E. Antivenom Activity of Opossum (*Didelphys marsupialis*) Serum Fractions Against Uracoan Rattle Snake (*Crotalus vegrandis* Klauber, 1941) Venom. En: *Rom. Arch. Microbiol. Immunol*. Vol. 54. 1995. p. 125-130.

_____, GALÁN, J.A., SÁNCHEZ, E.E. y PÉREZ, J.C. Neutralization of Venoms from Two Southern Pacific Rattlesnakes (*Crotalus helleri*) with Commercial Antivenoms and Endothermic Animal Sera. En: *Toxicon*. Article in Press. 2003. Corrected Proof.

RUSSELL, F. E., WALTER, F. G., BEY, T. A. y FERNANDEZ, M. C. Snakes and Snakebite in Central America. En: *Toxicon*. Vol. 35. 1997. p. 1469-1522

SARAVIA, P. S., ROJAS, E., ESCALANTE, T., ARCE, V., CHAVES, E., VELÁSQUEZ, R., LOMONTE, B., ROJAS, G., GUTIÉRREZ, J. M. The Venom of *Bothrops asper* from Guatemala: Toxic Activities and Neutralization by Antivenoms. En: *Toxicon*. Vol. 39. 2001. p. 401-405.

SCHMID, W. The Micronucleus Test. En: *Mutation Research* Vol. 31. 1975. p. 9-15

SEVCICK, Carlos. LD 50 Determination: Objections to the Method of Beccari as Modified by Molidengo. En: *Toxicon*. Vol. 25. 1987. p. 779-783.

SITTENFELD-APPEL, A., RAVENTÓS-VORST, H., CRUZ, R. y GUTIÉRREZ, J.M. DNase activity in Costa Rican *Crotaline* snake venoms: quantification of activity and identification of electrophoretic variants. En: *Toxicon* Vol. 29. 1991. p. 1213-1224.

SOE-SOE., THAN, T., FRANCIS, N., TIN-NU-SWE., MYINT-LWIN., TUN-PE., MAUNG-MAUNG-OO., PHILLIPS, R.E. y WARRELL, D.A. Contribution of Local Hemorrhage and Microvascular Fibrin Deposition to Fatal Envenoming by Russell's Viper (*Vipera Russellii Siamensis*) in Burma. En: *Acta Tropica*. Vol. 46. 1989. p. 23-38

SITPRIJA, V. Renal Diseases in Snakebite: Department Of Medicine, Chulalongkorn Hospital, Bangkok, Thailand En: *Toxicon*. Vol. 17. Supplement 1. 1979. p. 172

TEIBLER, P., ACOSTA DE PÉREZ, O., MARUÑAK, S., RUIZ, R., KOSCINCZUK, P., SÁNCHEZ NEGRETTE, M. y MUSSART DE COPPO, N. Lesiones Locales y Sistémicas Inducidas por Veneno de *Bothrops alternatus* (Víbora de la Cruz) de Argentina. En: *Acta Toxicológica Argentina*. Vol. 7. 1999. p. 7-10.

THEAKSTON, R.D.G. y REID, H.A. Development of Simple Standard Assay Procedures for the Characterization of Snake Venoms. En: *Bulletin of the World Health Organization*, Vol. 61. 1983. p. 949-956.

TORO, M. F., OTERO, R., GUTIÉRREZ, J. M., NÚÑEZ, V., ROBLES, A., ESTRADA, R., SEGURA, E., GARCÍA, M., DÍAZ, E.A. y RAMÍREZ, E.C. A Randomized Double-Blind Clinical Trial of Two Antivenoms in Patients Bitten by *Bothrops atrox* in Colombia. En: *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. Vol. 90. 1996. p. 696-700

VIDAL, J.C., MOLINA, H. y STOPPANI, A.O.M. A General Procedure for the Isolation and Purification of Phospholipases A₂ Isoenzymes from *Bothrops* Venom. En: Acta Physiological. Vol. 23. 1972. p. 91-109

WARRELL, D.A. Venomous Bites and Stings in the Tropical World. En: Medical Journal of Australia, Vol. 159. 1993. p. 773-779.

WHORTON, E., ADLER, I.-D., BOOTMAN, J., FAVOR, J., HOOK, G., SCHRIEVER-SCHWEMMER, G., WELZL, G., YOSHIMURA, ISAO y HAYASHI M. Recommendations for Statistical Designs of *in vivo* Mutagenicity Tests with Regard to Subsequent Statistical Analysis. En: Mutation Research. Vol. 417. 1998. p. 19-30.

YARLEQUÉ, A., CAMPOS, S., ESCOBAR, E., LAZO, F., SANCHEZ, N., HYSLOP, S., MARSH, N.A., BUTTERWORTH, P.J. y PRICE, R.G. Isolation and Characterization of a Fibrinogen-Clotting Enzyme from Venom of the Snake, *Lachesis muta muta* (Peruvian Bushmaster) En: Toxicon. Vol. 27. 1989. p. 1189-1197.

ZAVALETA, A., MARTÍNEZ CADILLO, E. y FERREYRA, C.B. Actividad Hemolítica de Venenos de Serpientes de los Géneros *Bothrops*, *Lachesis*, *Crotalus* y *Micrurus* (Serpientes: *Viperidae* y *Elapidae*). En: Rev. Biol. Trop. Vol. 39. 1991. p. 311-314.