

**DETERMINACIÓN DEL EFECTO HEMORRAGICO DEL VENENO TOTAL DE LA SERPIENTE *Micrurus clarki*, (Schmidt, 1936) EN RATON *Mus musculus* (Linnaeus, 1758) DE LA CEPA ICR.**



**JORGE ELIECER RENDON HINESTROZA**

**UNIVERSIDAD DEL CAUCA  
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES EXACTAS Y DE LA  
EDUCACION  
POPAYAN  
2010**

**DETERMINACIÓN DEL EFECTO HEMORRAGICO DEL VENENO TOTAL DE  
LA SERPIENTE *Micrurus clarki*, (Schmidt, 1936) EN RATON *Mus musculus*  
(Linnaeus, 1758) DE LA CEPA ICR.**

**JORGE ELIECER RENDON HINESTROZA**

Trabajo de investigación para optar el Título de Biólogo

**Director**

**JOSE BELTRAN VIDAL MSc.**

**Asesor:**

**SANTIAGO AYERBE GONZALEZ MD.**

**UNIVERSIDAD DEL CAUCA  
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES EXACTAS Y DE LA  
EDUCACION  
POPAYAN  
2010**

**Nota de aceptación**

---

---

---

---

---

---

---

**DIRECTOR**\_\_\_\_\_

**MSc. JOSE BELTRAN VIDAL**

**JURADO**\_\_\_\_\_

**Dra. GLORIA ÁVILA**

**JURADO**\_\_\_\_\_

**PhD. C. PROFESOR OSCAR RIOS**

**Popayán, 15 de septiembre de 2010**

“No se puede hallar la verdad. El esfuerzo para hallar la verdad es un fin auto proyectado; y ese fin no es la verdad. Un resultado no es la verdad; el resultado es la continuación del pensamiento, desplegado o proyectado. Únicamente cuando el pensamiento termina hay verdad. El pensamiento no puede terminar mediante la compulsión, mediante la disciplina, ni por ninguna forma de resistencia. El escuchar la historia de lo que es trae su propia liberación. Es la verdad que libera, no el esfuerzo para ser libre”.

J. Krishnamurti

Dedicado a mis padres Hernando Rendón y Josefina Hinstroza

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradecer a mi amado Padre Celestial gestor de vida, que envió al Espíritu Santo, para iluminarme con su sabiduría y permitirme concluir esta meta.

También mis sinceros agradecimientos a mis padres por su incansable lucha, amor y apoyo incondicional, a mi hermano por ese amor tan grande a la ciencia, a mi familia por su apoyo y cariño de siempre, a mi director de trabajo de grado José Beltrán por su valioso asesoramiento, amistad y las experiencias compartidas, al Centro de Investigaciones Biomédicas (CIBUC), al Grupo de Investigaciones Toxinológicas y Herpetológicas (GIHT), al Grupo de Biología Celular y Molecular de la Universidad del Cauca (CELMOLEC) y su director Nelson Rojas, al Dr. Santiago Ayerbe por su gran conocimiento, a Jimmy Guerrero por sus valiosos aportes a los Profesores (as), Patricia Vélez, Luz Estela Hoyos por el amor que me sembraron por Biología, al profesor Ricardo Benítez por toda su colaboración, a los jurados, PhD. C. Profesor Oscar Rios y Dra. Gloria Ávila por sus pertinentes observaciones.

A la Universidad del Cauca por permitir desarrollarme como profesional, a los profesores por contribuirme con sus conocimientos y experiencias y a mis compañeros y amigos que llevo en el alma y recuerdo con mucha alegría y nostalgia.

## CONTENIDO

	Pág.
INTRODUCCIÓN.....	11
1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	13
1.1. PREGUNTA DE INVESTIGACION.....	14
2. OBJETIVOS.....	15
2.1. OBJETIVO GENERAL.....	15
2.2. OBJETIVOS ESPECIFICOS.....	15
3. ANTECEDENTES.....	16
4. MARCO CONCEPTUAL Y ESTADO DEL ARTE.....	18
4.1 Caracterización taxonómica de la especie <i>Micrurus clarki</i> .....	18
4.2 Características de la Familia Elapidae.....	18
4.3 Biología de la serpiente <i>Micrurus clarki</i> (Schmidt 1936).....	19
4.4 Implicaciones Clínicas.....	21
4.5. Los factores de la coagulación.....	22
4.5.1. Elementos de la fibrinólisis.....	25
4.6. Toxinas biológicamente activas.....	25
4.6.1. Toxinas three-finger.....	26
4.7 Venenos de <i>Micrurus</i> .....	27
4.8. Dosis letal 50.....	29
4.9. <i>Mus musculus</i> como Biomodelo experimental.....	29
5. Materiales y métodos.....	31
5.1. DISEÑO DE LA INVESTIGACIÓN.....	31
5.2. Obtención del veneno.....	31
5.3. Concentración final del veneno.....	32
5.3.1. Cuantificación de proteína mediante el método de Bradford.....	32

5.4.	<b>DETERMINACIÓN DE LA DOSIS LETAL 50.....</b>	32
5.5.	<b>Determinación de la Dosis Letal del veneno de <i>Micrurus clarki</i>.....</b>	33
5.6.	<b>Análisis Estadístico.....</b>	33
5.7.	<b>EFECTO HEMORRÁGICO.....</b>	34
5.8.	<b>Actividad Coagulante.....</b>	35
6.	<b>RESULTADOS.....</b>	36
6.1.	<b>Obtención y cuantificación del veneno en mg de proteína.....</b>	36
6.2.	<b>Signos de envenenamiento y tiempos de observación en la Dosis Letal 50.....</b>	40
6.3.	<b>Manifestaciones clínicas del envenenamiento.....</b>	41
6.4.	<b>Resultados Efecto Hemorrágico.....</b>	47
6.5.	<b>Actividad Coagulante.....</b>	49
7.	<b>DISCUSIÓN.....</b>	52
8.	<b>CONCLUSIONES.....</b>	58
9.	<b>RECOMENDACIONES.....</b>	60
10.	<b>BIBLIOGRAFIA.....</b>	62

## LISTA DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1 Composición de Amino ácidos y masa molecular de 5 PLA2 aislada.....	28
Tabla 2 Concentración vs Absorvancia.....	37
Tabla 3 Valores obtenidos para Dosis Letal 50 del veneno total <i>Micrurus clarki</i> .....	38
Tabla 4 Valores obtenidos de algunas Dosis Letal 50 de <i>Micrurus sp</i> .....	39
Tabla 5 Signos de envenenamiento y tiempos de observación.....	40
Tabla 6 Actividad Hemorrágica.....	47
Tabla 7 Tiempos de Sangría.....	49
Tabla 8 Actividades toxicas inducidas por el veneno de <i>Micrurus clarki</i> .....	50
Tabla 9 Actividades enzimáticas de <i>Micrurus sp</i> .....	55

## LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1 <i>Micrurus clarki</i> (Schmidt 1936).....	19
Figura 2 Factores de coagulación.....	24
Figura 3 Cuantificación de las proteínas del veneno.....	36
Figura 4 Pilo erección, distensión abdominal, hipotérmicos.....	41
Figura 5 Midriasis: exceso de Acetilcolina, efectos simpatolíticos colinérgicos.....	41
Figura 6 Movimientos Espásticos en manos y pies.....	42
Figura 7 Produce una tetania esto por la no recaptura de Acetilcolina.....	43
Figura 8 Comezón generalizada, disfunción urinaria.....	43
Figura 9 Complicaciones a nivel del sistema nervioso central.....	44
Figura 10 Movimientos de la cola pocos minutos antes de morir.....	44
Figura 11 Infiltrados hemorrágicos difusos.....	45
Figura 12 Lisis de las paredes intestinales.....	45
Figura 13 Hígado con textura solida a gelatinosa muy friable, con manchas a un lado del órgano.....	46
Figura 14 Daño a nivel del riñón por posible acción de metaloproteinasas.	47
Figura 15 Grupo control para efecto hemorrágico.....	48
Figura 16 Placa hemorrágica con veneno.....	49
Figura 17 Placa hemorrágica con veneno 5.2 µg/g.....	49
Figura 18 Proceso para la actividad coagulante.....	50
Figura 19 Media grupo control vs desviación estándar grupos con veneno.....	51

## RESUMEN

En este trabajo, se realizó un estudio del efecto Hemorrágico del veneno total de la serpiente *Micrurus clarki*, endémica de una parte de la región del choco biogeográfico que comprende países como: Costa Rica, Panamá y Colombia. El veneno fue extraído siguiendo el método de Ayerbe y Guerrero (2002), posteriormente se limpió, se centrifugo y se hizo cuantificación de proteínas mediante el método de Bradford. Se realizó Dosis Letal 50 (DL<sub>50</sub>) mediante el método de Molidengo modificada por Carlos Sevcik (1987), en ratón albino suizo de la cepa ICR, con un rango de peso entre 12 y 15 gramos, sin distinción de sexo; obteniendo para esta especie una DL<sub>50</sub> igual a 0,87 µg/g de peso.

La determinación de la actividad hemorrágica se llevó a cabo mediante el método de Gutiérrez, en ratón albino suizo de la cepa ICR con peso entre 18 y 20 gramos sin distinción de sexo, mediante inoculación del veneno vía intradérmica (I.D.), en tres grupos experimentales y un grupo control (n=3 individuos) por dosis que están (25 µl, 50 µl, 100 µl), disueltos en 0.5mL de solución salina.

La determinación de la actividad coagulante se llevó a cabo mediante el método de Gutiérrez, en ratón albino suizo de la cepa ICR con peso entre 18 y 20 gramos sin distinción de sexo, mediante inoculación del veneno vía (I.P.), en cuatro grupos experimentales y un grupo control (n=3 individuos) por dosis que están (25 µl, 50 µl, 75 µl, 100 µl), disueltos en 0.5mL de solución salina.

No se observó efecto hemorrágico local del veneno en los animales utilizados para esta prueba biológica pero sin un aumento significativo en la actividad coagulante.

## INTRODUCCIÓN

Colombia, por su ubicación geográfica, es un país con apreciable riqueza herpetológica. En el Departamento del Cauca se alberga una variada diversidad de reptiles (Castaño-Mora 2002) entre los que se haya organismos de interés toxinológico como las serpientes. Las serpientes venenosas están representadas por las familias Elapidæ y Viperidæ y en esta última se agrupan las especies que causan la mayoría de los accidentes ofídicos en el territorio Colombiano. (Ayerbe 2002, Pineda y Rengifo 2002).

A lo largo de la evolución diferentes grupos animales desarrollaron variadas estrategias, tanto para asegurar su alimentación como para defenderse de sus enemigos. Como parte de ellas surgieron los venenos: poderosas mezclas de sustancias químicas de diversa naturaleza capaces de “programar”, en la presa o el predador, una cadena de eventos que trae como consecuencia la afectación de procesos vitales tales como la transmisión neuromuscular, la circulación sanguínea, la permeabilidad de las membranas, entre otros efectos, como forma de garantizar el dominio de la víctima. Las herramientas moleculares capaces de lograr dichas acciones son las toxinas (Castañeda, 2000).

La evolución del sistema venenoso de los reptiles ha tenido buena reputación de interesante y considerable controversia. Los escasos registros fósiles, particularmente por la escasa conservación del tejido blando, el origen y subsecuente diversificación del veneno de los reptiles podrían ser principalmente inferidos desde el conocimiento de representaciones modernas (Fray BG 2009). La evidencia temprana fue basada principalmente sobre caracteres morfológicos tales como cráneo, dientes, glándulas y músculos compresores asociados con la repartición del sistema venenoso (Jackson K. 2003 y Kardong KV. 1980). De aproximadamente 2650 especies de serpientes avanzadas (*Caenofidia*) solamente

650 especies presentan tradicionalmente colmillos frontales, los cuales han sido considerados venenosos por una tradicional definición antropocéntrica. La relativa naturaleza del veneno del resto de las serpientes avanzadas permaneció casi sin investigar (Fry BG. 2008 y Vidal N. 2002). De la misma manera, el sistemas venenosos de los helodermátides (lagartijas) que son pobremente conocidos a pesar de la extensa literatura acumulada (Beaman KR, et al 2006) y, hasta muy recientemente, el potencial de otros venenos de lagartijas han sido descuidados (Fry, B.G., et al; 2006).

Para el presente estudio se evaluó la letalidad del veneno total de la serpiente *Micrurus clarki*, mediante un estudio de dosis letal 50, para determinar la cantidad mínima de veneno que se utilizará para posteriores ensayos como efecto Hemorrágico, Coagulante en ratón. Con la excepción de estudios esporádicos llevados a cabo por investigadores en el área, el problema de este síndrome de envenenamiento ofídico ha sufrido de un abandono casi internacional (Rodríguez-Acosta et al., 1995).

Debido al potencial toxicológico que representa el veneno de las serpientes del género *Micrurus* surge un interés por estudiar cualitativa y cuantitativamente sus venenos con el fin de establecer su potencia letal, en cuanto a la toxicidad del veneno y sus efectos clínicos. De esta manera se espera aportar con las investigaciones en el campo de la Toxinología y al conocimiento de nuestra biodiversidad herpetológica.

## 1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La serpiente *Micrurus* de la familia Elapidae, es probablemente la más importante de las corales en Colombia debido al alto poder neurotóxico de su veneno (Vital Brazil\_1987a), y a su, distribución geográfica en la zona Andina, Pacífica, Caribe, (Magdalena Cesar y la Guajira) y la Orinoquia (Pineda Daniel, 2002) que hábitat el mayor porcentaje de la población colombiana. La severidad de este envenenamiento ha provocado en los últimos años un acentuado interés nacional por investigar este síndrome.

De acuerdo a la mayoría de los efectos en un animal envenado, las serpientes venenosas pueden ser convenientemente clasificadas como neurotóxicas y hemotóxicas. El primer grupo son las serpientes de la familia *Elapidae* (mambas, cobras, corales y particularmente serpientes australianas que son bien conocidas como las serpientes más venenosas del mundo). En el otro lado se encuentran las serpientes de la familia *Viperidae* (víboras y crótalos) estas contiene numerosas proteínas que típicamente dañan las cascadas de coagulación, los sistemas homeostáticos y la integridad de los tejidos, los cuales se manifiestan como sangrado, coagulación, necrosis en el tejido local en el envenenamiento en humanos (Méñez, A. 2002; Fox, J.W. and Serrano, S.M.T. 2005; Markland S, Francis. 1998).

Se han realizado estudios de caracterización de las actividades tóxicas de venenos de serpientes de diferentes regiones del mundo, sin embargo, sólo se dispone de pocos estudios sobre actividades parciales enzimática y tóxicas del veneno de algunas serpientes que pueden encontrarse en Colombia. Hasta la fecha no se disponen de muchos datos acerca de las características bioquímica y tóxica, así como los mecanismos de acción de los venenos de las serpientes de mayor interés sanitario en Colombia, en particular de aquellas actividades

relevantes en los procesos neuropatológicos en los envenenamientos por elápidos. (Alexis Rodríguez-Acosta. 2005).

Con base en lo anterior, en el presente trabajo se llevo a cabo una serie de bio ensayos, para evaluar la letalidad del veneno y su efecto hemorrágico y actividad coagulante de esta serpiente (*Micrurus clarki*), con lo cual se busca un mejor entendimiento acerca de la acción de venenos ofídicos.

Esto permitirá además, conocer los efectos toxinológicos del envenenamiento o hallar nuevas sustancias del veneno, que actuando sobre los diversos sistemas de el biomodelo, ratón *Mus musculus* (circulatorio, respiratorio, digestivo, nervioso) pudieran tener potencial terapéutico de uso en humanos, de esa forma seguir el camino para mejorar la tecnología de producción de sueros antiofídicos y una importante gama de recursos naturales con valor agregado, necesarios en el país y el mundo.

### **1.1. PREGUNTA DE INVESTIGACION**

¿Existe algún efecto hemorrágico periférico del veneno total de la serpiente *M. clarki*, en ratones?

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. OBJETIVO GENERAL

Determinar el efecto hemorrágico del veneno total de la serpiente *Micrurus clarki* (Schmidt, 1936) en ratón *Mus musculus* (Linnaeus, 1758) de la Cepa ICR.

### 2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar la concentración de proteína presente en el veneno de esta serpiente *Micrurus clarki* (Schmidt, 1936).
- Determinar Dosis Letal 50 (DL<sub>50</sub>) del veneno total de la serpiente *Micrurus Clarki* (Schmidt, 1936).
- Caracterizar el efecto hemorrágico del veneno de *M. clarki*, en ratones *Mus musculus* (Linnaeus, 1758) de la Cepa ICR. mediante el método de Gutiérrez, 1985.
- Caracterizar la actividad coagulante del veneno de *M. clarki*, en ratones *Mus musculus* (Linnaeus, 1758) de la Cepa ICR. mediante el método de Alvarado y Gutiérrez, 1988.

### 3. ANTECEDENTES

Para el desarrollo del presente trabajo se realizó una revisión bibliográfica sobre las investigaciones que se han hecho sobre el tema en Colombia y en diferentes países del mundo.

Alessandra L. Cecchinia y colaboradores (2004), realizaron una comparación entre diferentes especies de serpientes *Micrurus* sp. En cuanto a su actividad de fosfolipasa y su neurotoxicidad, dejando claro la especificidad del veneno y las diferencias que existen entre las especies, dándonos un indicio de que en el presente trabajo podemos encontrar diferencias importantes en cuanto a especiación.

Ana C. S. Barrios y colaboradores (1994), realizaron la comparación del veneno de cinco especies de *Micrurus* y analizaron los efectos edemáticos, miotóxicos, coagulantes, hemorrágicos y de detección de fosfolipasa A2. Concluyeron que ninguno de estos efectos presenta actividad coagulante, la miotoxicidad fue estimada por el incremento en los niveles del suero de Creatina kinasa y por análisis histológico.

José M. Gutiérrez y colaboradores (1985), analizaron el veneno de 11 especies de serpientes del genero *Micrurus* de Brazil y Colombia y analizaron la actividad miotóxica en ratones. Todo el veneno de las serpientes excepto el de *Micrurus surinamensis*, indujo miotoxicidad por el incremento en los niveles de la Creatina kinasa en el plasma y por análisis histológico. Cualitativamente esos venenos, inducen un modelo necrótico similar, aunque esas diferencias cuantitativamente no fueron significativas.

Rosso JP, Vargas-Rosso O, Gutierrez JM, Rochat H, Bougis PE. (1996), hicieron un análisis detallado de los efectos de la neurotoxicidad y de la actividad fosfolipásica con su respectivo secuenciamiento de aminoácidos. Este es uno de los artículos más interesantes, debido a la poca información de las serpientes del género *Micrurus*.

Cháríston André Dal Belo y colaboradores (2005), describen en sus resultados la existencia de una fosfolipasa que actúa como una nueva neurotoxina la cual presenta acción presináptica, permitiéndonos establecer que las fosfolipasas no presentan únicamente acciones miotóxicas.

Nelson Jorge da Silva Jr., Steven D. Aird (2001), midieron la toxicidad de 49 serpientes corales (*Micrurus sp.*), representando 15 taxas nominales, examinando la especificidad del veneno a las presas. En esos venenos se ensayaron 23 actividades enzimáticas, dichas actividades enzimáticas se analizaron con respecto a la preferencia de presas naturales o sea las que más consumen estas serpientes (*Micrurus sp.*) y su dosis letal 50 para diferentes rutas de aplicación del veneno.

Ursula Castro de Oliveira y colaboradores (2003), realizaron la clonación y caracterización de una PLA2 básica de *Micrurus corallinus* de las glándulas venenosas, con una señal peptídica de 27 residuos de aminoácidos y una predicción de proteínas maduras con 119 residuos de aminoácidos. Las proteínas deducidas son altamente similares a las PLA2 conocidas, con 7 puentes disulfuro y conservadas las mismas posiciones.

Para la serpiente *Micrurus clarki*, no existen trabajos previos relacionados con el efecto del veneno siendo el presente trabajo pionero, de esta manera los únicos

trabajos realizados son los relacionados con la clasificación taxonómica, comportamiento y distribución geográfica de esta especie.

## 4. MARCO CONCEPTUAL Y ESTADO DEL ARTE

### 4.1 Caracterización taxonómica de la especie *Micrurus clarki*.

Reino: Animalia

Phylum: Cordata

Subphylum: Vertebrata

Clase: Reptilia

Orden: Squamata (escamosos)

Suborden: Ofidios, Serpientes

Familia: *Elapidae*

Subfamilia: *Elapinae*

Género: *Micrurus*

Especie: *Micrurus clarki* Schmidt, 1936

### 4.2. Características de la familia *Elapidae*

La serpiente coral pertenece a la familia *Elapidae*, comprende alrededor de 120 especies y subespecies principalmente del género *Micrurus* (Roze, 1982, 1989; Roze y Bernal-Carlo 1987). Su dentición es de tipo proteroglifa presentando colmillos fijos en la parte anterior. Su distribución geográfica se encuentra preferiblemente en las sabanas y piedemontes (Rodríguez Acosta., et al; 1995).

Tiene anillos negros separados por blancos o amarillos más delgados, pero el segundo de la cabeza y los tres o cinco últimos, son rojos brillantes. Posee 15 hileras de escamas dorsales y carece de escama loreal, en general son de vida nocturna y subterránea, se hallan distribuidas en centro América y norte de Suramérica, en Colombia, son probablemente más abundante en la cordillera de los andes, encontrándose ampliamente distribuida en alturas aproximadas de 1800 metros sobre el nivel del mar, es común en zonas productoras de café. (Ángel, Rodrigo; 1983).

#### 4.3. Biología de la serpiente *Micrurus clarki* (Schmidt 1936)

Figura 1. *Micrurus clarki* (Schmidt 1936).



**Fuente:** Cortesía Álvaro Herrera.

Alcanza los noventa centímetros, aunque lo común es entre cincuenta y sesenta centímetros de longitud. El cuerpo tiene un patrón de 13-20 anillos negros de aproximadamente 3 escamas de ancho. Éstos están cercados por dos anillos de color amarillo de unas dos escamas de ancho. Entre este grupo de anillos y el

siguiente se encuentra una banda roja de aproximadamente ocho escamas. Cada escama de los anillos rojos y amarillos está delineada en negro y tiene la punta de este mismo color, ventralmente estos anillos no tienen color negro. En los anillos de la cola, entre 5-9 no está el rojo.

La región frontal de la cabeza es negra así como la parte dorsal de la misma, los costados son blancos o amarillo claro. Las escamas de esta parte poseen pigmento negro. La coloración clara abarca la zona ventral de la boca y sube diagonalmente hacia la nuca pasando por detrás de los ojos. Posee un anillo negro delgado que no se une ventralmente (Roze, J. A. 1983).

La cabeza no se distingue del cuello. El ojo es pequeño con la pupila semielíptica o verticalmente elíptica. La maxila presenta solamente uno o dos colmillos en su parte anterior, perforados por un canal o surco en su cara anterior. Los dientes mandibulares anteriores son más grandes que los posteriores. Debido a esto, las mordeduras por esta serpiente sólo se pueden dar en partes delgadas, como en los dedos de la mano o del pie (Roze, J. A. 1983). Presenta 15 hileras longitudinales de escamas en la mitad del cuerpo, lisas y sin fosetas apicales. Las ventrales se presentan redondeadas. La placa anal puede presentarse dividida o entera. Las sub-caudales, usualmente divididas. Las ventrales más las caudales oscilan de 241 a 257. El cuerpo es cilíndrico, con la cola corta. Es primordialmente nocturno aunque en los bosques densos y selvas bien conservadas puede estar activo durante el día. Su actividad es dependiente de las condiciones ambientales, sobre todo de la humedad y la temperatura. La mayor parte de estas serpientes son encontradas en temporada lluviosa.

Se alimentan de vertebrados elongados, principalmente de serpientes pequeñas, aunque también de lagartijas e incluso puede llegar a alimentarse de otras de su misma especie (Roze, J. A. 1983). Es de reproducción ovípara y puede depositar

entre 1 y 13 huevos entre la hojarasca. El desarrollo de los mismos dura de dos a tres meses. Al nacer, las crías, miden entre diez y quince centímetros de longitud (Roze, J. A. 1983).

Habita en selvas tropicales lluviosas, zonas más secas como áreas de transición entre selva tropical húmeda y seca, en esta última asociada a los hábitat riparios. Por su coloración y alta venenosidad, son consideradas modelos en el complejo mimetismo coral, que incluye por lo menos otras 15 especies no venenosas. Se encuentra validada por ITIS "Integrated Taxonomic Information System". Se dispersa por el sudeste de Costa Rica, Panamá y oeste de Colombia.

Los especímenes colectados para el siguiente trabajo, provienen de la localidad de Playa Rica el Tambo Cauca 350 msnm, Septiembre 2 del 2004. Colector Libaniel Arias Quiñones. #0041 *Micrurus clarki*. Identificación Dr. Santiago Ayerbe médico Pediatra Toxinólogo.

#### **4.4 Implicaciones clínicas**

Las fosfolipasas hemorrágicas fueron las primeras hemorraginas no proteolíticas reportadas del veneno de serpientes. Este veneno tiene una variedad de toxinas en un rango de masa entre 12-14 kDa (Griffin, P.R., Aird, S.D., y Jorge da Silva, N., Datos de espectroscopia de masa sin publicar). La actividad edematogénica esta frecuentemente asociada con hemorragia y Sánchez et al. (1992) detecto actividad edematogénica en *M. frontalis* comparable con la producida por *Bothrops alternatus* (de Mina Gerais) y sub-especie *Crotalos durissus* (Cecchini et al., 2005).

Considerables variaciones, interespecíficas, intersubespecíficas e interpoblacionales en la composición del veneno son evidentes. Actividades de

acetilcolinesterasa y leucina aminopeptidasa, varía considerablemente con subespecies, en poblaciones de las serpientes (*M. albicinctus*. Y *M. pyrrhocryptus*), aunque estas variaciones son triviales comparadas con la variación interespecífica. Estos niveles de variabilidad intraespecífica sugiere que la concentración de esas enzimas no podrían ser críticas como su simple presencia, la cual podría reflejar alta eficiencia catalítica (da Silva, Aird, 2001).

Severas mionecrosis en ratones han sido reportadas para el veneno de *M. d. carnicauda*. (Gutierrez et al., 1983), pero a grandes concentraciones que se utilizan para estudios farmacológicos (15 y 30 µg/ml), los cambios que se muestran en las preparaciones de ratas y pollos fueron similares, y en ambos casos el sarcolema fue duramente afectado. A una alta concentración (10 µg/ml), ensayos en preparaciones del nervio frénico-diafragma, la mionecrosis fue de tipo miolítico (Homma y Tu 1971).

Sin embargo, otras investigaciones también encontraron la no asociación entre composición del veneno y la dieta (Viperidos y Elápidos) en estas familias de serpientes se realizan unos ensayos para medir la toxicidad del veneno sobre un rango de presas los cuales produjeron resultados variables, que van desde asociaciones positivas en las cuales el veneno se ve directamente relacionado con la presa preferente hasta asociaciones negativas, donde no existe relación con la toxicidad y preferencia de presas (Heatwole y Poran, 1995., Heatwole y Powell, 1998; Mebs, 2001), esto posiblemente debido a unas variaciones co-evolutivas entre serpientes y sus presas.

Así, la asociación funcional entre la composición del veneno y la dieta, particularmente para serpientes de colmillos frontales, permanecen sin esclarecer, probablemente porque factores evolutivos y ecológicos a parte de la selección en relación a la dieta pueden potencialmente influenciar la composición del veneno en diferentes especies (Sasa, 1999; Wuster et al., 1999; Mebs, 2001).

## **4.5. LOS FACTORES DE LA COAGULACIÓN**

La interpretación del proceso de coagulación publicada por MacFarlane en 1964 (Cascada de MacFarlane) ha sido de gran utilidad durante muchos años para empezar a entender el complejo problema de la formación del trombo. Según MacFarlane, habría dos vías, la extrínseca formada por el factor tisular y el factor VII y la intrínseca en la que participan los factores XII, XI, IX, VIII y V. Ambas vías convergen para activar el factor X y continuar conjuntamente el proceso de transformación de la protrombina en trombina y, a través de la trombina el fibrinógeno en fibrina. Por otra parte, el papel de la plaqueta para terminar en agregación se consideraba un proceso independiente (Navarro JL., et al 2007).

1. El complejo formado por el factor tisular y el factor VII participa en la activación del factor IX, por lo que las dos vías de la coagulación, intrínseca y extrínseca, van unidas casi desde el inicio del proceso (Navarro JL., et al 2007).

2. El proceso completo no se realiza de forma continua, sino que son precisas tres fases consecutivas; fase inicial, de amplificación y de propagación. En las dos últimas participan activamente la plaqueta y la trombina (Navarro JL., et al 2007).

### **Fase inicial**

El complejo factor tisular-factor VII, de forma directa e indirectamente a través del factor IX, activa inicialmente el factor X transformando pequeñas cantidades de protrombina en trombina, que son aún insuficientes para completar el proceso de formación de la fibrina (MacFarlane RG, 1994).

### **Fase de amplificación**

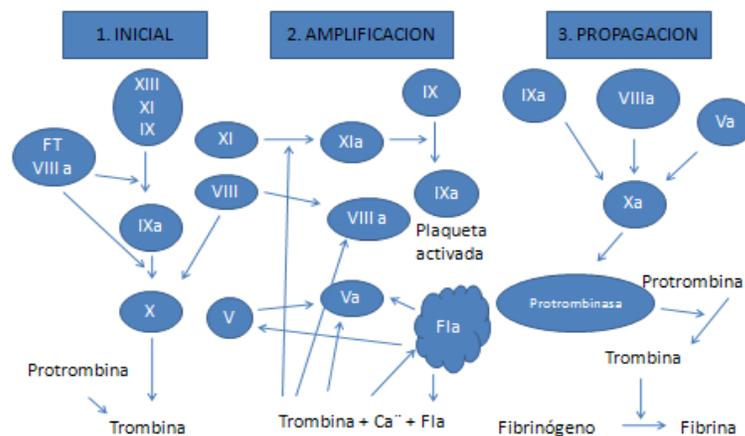
La trombina así formada, junto con el calcio de la sangre y los fosfolípidos ácidos, que provienen de la plaqueta, participa activamente en un proceso de retroalimentación para la activación de los factores XI, IX, VIII y V y, de forma

especial, para acelerar la activación de la plaqueta. Simultáneamente, por mecanismos quimiotácticos, los factores mencionados son atraídos a la superficie de las plaquetas donde tienen lugar de forma muy rápida importantes procesos de activación y multiplicación (MacFarlane RG, 1994).

### Fase de propagación

La amplificación del proceso por mecanismos de retroalimentación entre trombina y plaqueta y la activación de todos estos factores, permiten activar grandes cantidades del factor X y formar el complejo protrombinasa para convertir la protrombina en trombina y, a expensas de ésta, el fibrinógeno en fibrina. El proceso final, siempre en la superficie de la plaqueta, se acelera para generar de forma explosiva grandes cantidades de trombina y fibrina (MacFarlane RG, 1994).

Figura 2. Factores de coagulación



Fuente. Cortesía (MacFarlane RG, 1994).

### Papel de la plaqueta

La activación de la plaqueta altera la permeabilidad de la membrana y permite la entrada del calcio y la salida de sustancias quimiotácticas, que atraen a los factores de la coagulación a su superficie. Al mismo tiempo se liberan factor V y fosfolípidos ácidos, que aportan el complemento necesario para el proceso de la coagulación (Pérez-Gómez F et al., 2006).

Las investigaciones para contrarrestar la tendencia a la trombosis se han dirigido a inhibir los factores por los que transcurre la cascada (factor tisular, factor X, protrombina o trombina) o contrarrestar otros factores importantes como el VIII. Las investigaciones para inhibir el factor tisular-factor VII aún continúan sin haber alcanzado resultados que permitan su utilización en la clínica. Los estudios en fase II-III para inhibir el factor X o la trombina son más prometedores, aunque estudios recientes con un inhibidor de la trombina (ximegalatran) se suspendieron por toxicidad hepática (Pérez-Gómez F et al., 2006).

El factor VIII, aun sin formar parte de la ruta principal de la cascada, es un factor muy importante y su inhibición mediante las diferentes formas de heparina fue y sigue siendo utilizada con éxito por su fácil control y escaso riesgo hemorrágico. Sin embargo, la obligada administración parenteral y el insuficiente efecto antitrombótico en determinados procesos limitan su aplicación (Pérez-Gómez F et al., 2006).

#### **4.5.1. Fibrinólisis**

La destrucción del coágulo es necesaria porque una vez cohibida la hemorragia e iniciada la reparación de la ruptura vascular que la ocasionó, es necesario el restablecimiento de la permeabilidad vascular que por efecto de éste estuvo estrechada u ocluida. Este es el fundamento de la fibrinólisis. La fibrinólisis consiste en la ruptura de la red de fibrina por despegamiento de los filamentos y

su posterior fragmentación con lo que el coagulo se disuelve. Esta acción se debe a una pro enzima proteolítica, el plasminógeno que por acción de activadores se transforma en enzima activa, la plasmina. El plasminógeno se activa de una forma intrínseca (por el factor XII activado en la coagulación), y de forma extrínseca por una proteína liberada por tejidos (activador tisular del plasminógeno. La próstata, páncreas, los túbulos renales son ricos en el) (Fisbach DP, Fogdall RP 1985).

#### **4.6. TOXINAS BIOLÓGICAMENTE ACTIVAS**

Las Fosfolipasas A2 (PLA2s E.C. 3.1.1.4) son ubicaciones enzimáticas que catalizan la hidrólisis de los *sn*-2 acil uniones de *sn*-3 fosfolípidos (van Deenen y Haas, 1963). Estas enzimas son mediadores celulares normales y están relacionadas en muchas respuestas como; inflamación, homeostasis, hemorragias y otros. De esta manera muchos venenos de vertebrados e invertebrados tienen toxinas PLA2s que producen miotoxicidad, inducción de edema, inhibición de la coagulación y otras respuestas. Sobre las bases de las estructuras primarias, esas toxinas fueron las primeras clasificadas como PLA2 clase I, o como clase II, encontradas en las familias de las serpientes *Elapidae*, *Viperidae*, *Crotalidae*. (Vallentin y Lambeau., 2000).

Los sitios catalíticos de las PLA2 de clase I y clase II presenta una posición altamente conservada de ácido aspártico en la posición 49 (Asp 49), el cual está íntimamente relacionado en la unión del ion metálico de Calcio. El ion Calcio juega un papel esencial en el mecanismo catalítico de las enzimas. Sin embargo, algunas de las PLA2 en el veneno tienen un aminoácido sustituido tal como Lis49 en vez de Asp49 en los sitios de uniones del ion calcio y evolucionado en toxinas independientes de hidrólisis fosfolipídicas para ejercer sus funciones.

##### **4.6.1. Toxinas three-finger.**

Presentan un corazón central estabilizado por puentes S-S y sobresalen tres *loops* del péptido. En apariencia otro grupo de las toxinas del veneno de cobras con una actividad biológica completamente diferente (las "cardiotoxinas" o citotoxinas) presentan una similar arquitectura molecular como las de  $\alpha$ -neurotoxinas *three-finger*. Interesante relación en términos de actividad estructural y para un entendimiento de la evolución molecular (Fry, et al; 2003).

### **Bloqueadores de canales del ión calcio.**

Estos componentes se descubrieron en el veneno de la mamba negra, para medir su actividad sobre músculo aislado, unos 60 residuos de péptidos fueron aislados y llamados calciceptinas. Ellas están en la clase de toxinas generales *three-finger*. Esos péptidos se unen a canales de calcio tipo L, probablemente reconoce el sitio 1,4-dihidropiridina. Las calciceptinas no afectan los canales de calcio tipo N o tipo T (Garcia MC, et al.2001).

### **Cardiotoxinas.**

El veneno de las cobras fue muy conocido por sus efectos cardiovasculares "*in vivo*" y por causar daño directo a preparaciones cardíacas aisladas. Las fracciones de proteínas muestran tal actividad y por esta razón son llamadas "cardiotoxinas" tales fracciones podrían lisar las células particularmente eritrocitos y también por eso se las conoce como "citotoxinas." las cardiotoxinas purificadas mostraron ser homologas en tamaño y estructura a las  $\alpha$ -neurotoxinas de cadena corta (Wang CH, et al. 2005).

### **4.7. Venenos de *Micrurus*.**

La mayoría de los componentes del veneno están concentrados en un rango de peso molecular entre 6 y 16 kDa. Esto fue comprobado en la especie *M. spixii*, donde las proteínas fueron corridas en SDS-PAGE (Oliveira et al., 2003). La caracterización de los componentes del veneno se había dificultado hasta ahora, debido a la poca cantidad de veneno, para los estudios de química de proteínas. Por medio de la clonación abundante de cDNA de las glándulas venenosas permitió el inicio de la caracterización, (Ho et al., 1995,1997). De esta manera se comprueba que *M. coralinus* expresa una composición homologa de PLA2s de 119 residuos de aminoácidos (Oliveira et al., 2003). Observaciones clínicas muestran que estas mordeduras presentan efectos principalmente neurotóxicos, y en algunos casos de envenenamiento, muerte debido a deficiencia respiratoria (Weis and Mac Isaac, 1971; Ramsey et al., 1972; Vital Brazil et al., 1976, 1977; Moussatche y Melendez 1979). Se encontraron tres de cuatro PLA2s (tabla 1 A1, D5, D6). Tiene una característica de residuo C en la posición 11, que pertenece a los puentes disulfuro 11-18 encontrados en toxinas de elápidos. Estos resultados de la tabla 1 son obtenidos enfocando la búsqueda sobre las víboras y no en los elápidos, B1 muestra una gran similitud (97% idéntico en los fragmentos secuenciados) con unas PLA2s de *Crótalos scutelatus* agregando así con trabajos previamente reportados que las PLA2s crotálicas carecen de puentes disulfuro 11-18 (Renetsender et al., 1985). Sobre las bases de una clasificación secretora PLA2s (Chandra et al., 2000), los Elapidae pertenecen al grupo I, mientras que los Viperidae y Crotalidae al grupo II.

Al mismo tiempo 11 fracciones demostraron actividad de fosfolipasas A2 pero solamente cinco aparecieron homogéneas pro PAGE (Rosso et al., 1996). La actividad de PLA2s se demostró al inyectar intracerebroventricular a una concentración de 10-3000 ng / ratón esto para las especies de *Micrurus alleni yaseti* 63.88 siendo la más toxica (tabla 1). Esto fue novedoso que la actividad

enzimática específica no fue directamente proporcional a la letalidad como fue en el caso de *M. alleni yaseti* (Rosso et al., 1996).

Tabla 1. Composición de aminoácidos y masa molecular de 5 PLA2 aisladas del veneno de *M. nigrocintus nigrocintus* (Mnn) y *Micrurus alleni yatesi* (May).

AMINO ACIDO	Mnn 57.02	Mnn 58.84	Mnn 83.01	May 63.88	May 72.65	PLA2
	17					
ASPARTIC ACID	(17.05)	15 (14.98)	17 (16.86)	20 (20.20)	20 (20.08)	15-23
THREONINE	8 (7.84)	8 (7.71)	6 (5.78)	8 (7.71)	12 (11.54)	3-9
SERINE	5 (5.05)	6 (5.83)	6 (6.14)	6 (6.01)	8 (7.91)	3-9
GLUTAMIC ACID	5 (5.10)	7 (7.07)	8 (7.71)	6 (6.11)	12 (12.17)	5-13
PROLINE	3 (3.01)	2 (2.01)	2 (2.05)	2 (2.01)	4 (4.04)	3-6
GLYCINE	7 (7.07)	7 (7.00)	8 (7.78)	8 (8.05)	8 (7.97)	6-11
ALANINE	6 (5.89)	5 (5.13)	7 (7.20)	6 (6.10)	8 (8.02)	8-11
	14					
½ CYSTINE	(12.87)	12 (10.77)	12 (10.24)	12 (10.47)	14 (13.01)	12-14
VALINE	5 (5.01)	4 (3.86)	4 (4.04)	3 (2.87)	4 (3.98)	2-5
METHIONINE	2 (1.82)	2 (1.91)	2 (2.05)	1 (0.86)	2 (1.94)	1-3
ISOLEUCINE	2 (2.05)	2 (2.00)	3 (2.79)	2 (1.92)	4 (4.01)	2-9
	7					
LEUCINE	(7.011)	6 (6.03)	6 (5.82)	7 (7.14)	8 (7.89)	3-8
TYROSINE	7 (6.91)	6 (5.81)	6 (5.82)	2 (1.92)	2 (1.95)	7-11
PHENYLALANINE	5 (5.12)	4 (4.18)	5 (5.24)	4 (4.06)	4 (4.09)	2-4
HISTIDINE	4 (4.09)	3 (3.14)	4 (4.08)	2 (2.17)	4 (4.02)	1-4
	15	11				
LYSINE	(15.18)	(10.89)	7 (6.86)	11 (10.88)	8 (8.17)	5-11
ARGININE	4 (4.11)	4 (4.07)	4 (3.92)	3 (3.11)	4 (3.88)	2-9
TRIPTOPHAN	3 (2.88)	3 (2.91)	3 (2.80)	2 (2.12)	4 (3.81)	0-3
TOTAL	119.00	107.0	110.0	105.0	130.0	120
M. CALCULADO	13723.00	12472.0	12704.0	11597.0	14475.0	
M. SDS/PAGE	14000.00	12000.0	12000.0	11000.0	15000.0	

Fuente: Cortesía (Rosso et al., 1996).

#### 4.8. Dosis letal 50 (DL<sub>50</sub>)

La dosis letal 50 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 del 50% de la población. Dado que la dosis letal depende del peso corporal del animal, los resultados se expresan en términos de miligramos de tóxico por kilogramo de peso del animal, o en su defecto en microgramos por gramo. Es necesario tener en cuenta que el valor de la  $DL_{50}$  es inversamente proporcional a la letalidad del veneno lo cual nos indica que en concentraciones mínimas se puede producir un gran daño incluso la muerte (Yasnó-Varila 2005). Para determinar la  $DL_{50}$  del veneno de la especie *Micrurus* calculada en ratones *Mus musculus*, con un peso entre 18 y 20 g, se toman unos rangos que van desde 0.1 y 1.7 ug-g (Da Silva, Jr. y Aird, 2001), estas dosis ya han sido calculadas para otras *Micrurus*.

#### **4.9. *Mus musculus* como Biomodelo experimental**

La experimentación animal se define como una actividad que tiene como misión evidenciar y aclarar fenómenos biológicos sobre especies animales determinadas. El animal de experimentación es una de las piezas fundamentales en la biomedicina, tanto en los proyectos de investigación como en las pruebas diagnósticas y en los controles de los productos farmacológicos. Siendo los roedores los más utilizados (95%) del total de los animales experimentales, su fácil manejo y cuidado, así como su capacidad reproductiva, el tamaño y el tiempo generacional, ha permitido conseguir una variedad de cepas, con diferente sensibilidad a las técnicas no solo de reproducción, sino a las condiciones experimentales, donde las características genéticas de algunas cepas ha servido para expresar condiciones similares a diferentes patologías del humano y ha permitido dilucidar los mecanismos para entender mejor y combatir dichas patologías. De los roedores, la rata y el ratón superan en número a otras especies

como el hámster y el cobayo, también utilizados en la experimentación animal. Además, el ratón y la rata reaccionan fácilmente ante cosas o situaciones nuevas y su docilidad les permite una fácil manipulación. Por otra parte, el bienestar que le proporciona las condiciones sanitarias de un laboratorio tiene como consecuencia la reducción del desasosiego (estrés) disminuyendo así los errores en los resultados de la investigación (seminario Ofidismo. Estudiantes de Veterinaria. Universidad del Tolima).

En el presente estudio se utilizó como modelo experimental el ratón por su fácil manejo y porque nos permite ahorrar una buena cantidad del veneno ya que en este género *Micrurus* la cantidad del veneno es muy poca.

## **5. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **5.1. DISEÑO DE LA INVESTIGACIÓN**

Se utilizó el veneno total de dos individuos de *Micrurus clarki*. Estas serpientes se encuentran en cautiverio en el Serpentario del Centro de Investigaciones Biomédicas de la Universidad del Cauca (CIBUC).

Estudio experimental "in Vivo".

Factor de diseño: concentración 1.96µg de proteína / µl del veneno de serpiente *Micrurus clarki*.

Niveles: Concentración del veneno de serpiente *Micrurus clarki*. (25µl, 50µl, 75µl, 100µl), disuelto en 0.5mL de solución salina.

Unidad de respuesta: presencia o ausencia de placas hemorrágicas a nivel de la dermis en los ratones.

## **5.2. OBTENCIÓN DEL VENENO**

Para obtención de los venenos se realizaron las extracciones de los mismos siguiendo el método de Ayerbe y Guerrero (2002), que consiste en sujetar la serpiente por la cabeza, posteriormente se procede a abrir la boca exponiendo sus colmillos para colocarles los capilares y por último se masajea las glándulas del veneno con los dedos, luego se congela a -25°C, y se liofiliza. Para determinar la concentración final de veneno se utilizó el método de (Bradfort et al. 1951). Para lo cual se pasó el contenido del capilar a un tubo eppendorf formando el pool de veneno, al cual se le calculó el volumen total (Vt). Posteriormente se adicionó 10 ul de veneno y 490 ul de solución salina fisiológica (0.9%) en una cubeta de cuarzo y se lee al espectrofotómetro a 280 nm. Finalmente se aplica la ecuación de concentración final del pool de veneno que se describe a continuación:

## **5.3. Concentración final del veneno.**

$$\text{CFV (mg/ml)} = (A_{280}) (\text{Fd}) (\text{Vt})$$

Dónde:

CFV: Concentración final del pool de veneno

$A_{280}$ : Absorbancia a 280 nm.

Fd: Factor de dilución.

Vt: Volumen total del pool (Guerrero, 2002).

### 5.3.1 Cuantificación de proteína mediante el método de Bradford.

Procedimiento: Se disuelve 100 mg de azul brillante de coomasie G 250 en 50ml de etanol al 95% y añadirá 100 ml de ácido fosfórico (H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>) 85% (wv). Se diluirá a un litro cuando el colorante se haya disuelto completamente. Antes de utilizar el reactivo filtre en papel Whatman No 1.

Ensayo: Diluir la muestra de proteína a cuantificar para obtener una concentración entre 5 a 100 ug en un tubo ependorf en una cantidad de al menos 100 ul de la solución de proteínas. Preparar “estándares” que contengan un intervalo de 5 a 10 ug de proteína (se recomienda albúmina o gama globulina) en un volumen de 100 ul. Añadir 5ml de colorante e incubar por 30 minutos, medir la absorbancia a 595 nm (Bradford M.M; 1976).

### 5.4. DETERMINACIÓN DE LA DOSIS LETAL 50 (DL<sub>50</sub>)

Para realizar la DL<sub>50</sub> se empleó la técnica de Molidengo modificada por Carlos Sevcik (1987), utilizando 13 ratones *Mus musculus*, machos y hembras con un peso entre 12 y 15 g. A cada ratón se le aplicó una inyección I.P. del veneno de serpiente *Micrurus clarki*. Los efectos se observaron en un tiempo de 30 minutos, en el cual el ratón puede morir o no. Los resultados obtenidos se sometieron a análisis estadístico no paramétrico, mediante el cálculo de la mediana con el

método de Hodges y Lehmann con el programa estadístico Toxico. Sevcik (1998). Se partirá de una dosis letal conocida para el género *Micrurus*, el rango esta, entre 0.1 y 1.7  $\mu\text{g}$  de veneno/g (Da Silva, Jr. and Aird, 2001).

### **5.5. Determinación de la Dosis Letal 50 (DL<sub>50</sub>) del veneno de *Micrurus clarki*.**

La siguiente prueba se realizó con el fin de establecer el grado de letalidad del veneno de *Micrurus clarki*, el valor obtenido indico que al aplicar esa dosis a una población de ratones existe la probabilidad de que muera el 50% de la población y sobreviva el otro 50%. Para la realización de la prueba de DL<sub>50</sub> de Carlos Sevcik, es indispensable partir de una DL<sub>50</sub> conocida o sugerida. Para nuestro trabajo tomamos una dosis letal igual a 1 $\mu\text{g}$ -g (g=gramo-ratón), este valor se multiplica por el peso del ratón en g, el valor obtenido se dividió por la concentración del veneno que se encuentra disuelto en solución salina, el resultado obtenido en  $\mu\text{l}$  es la cantidad que se aplicó al ratón vía intraperitoneal I.P. A continuación, se realizaron las observaciones del efecto del veneno en un tiempo de 30 minutos, si el ratón muere (+), se resta el valor de la constante 0,04, si el ratón vive (-), le sumamos este valor. Los valores obtenidos se muestran en la tabla 2. El número de ratones empleados depende de la constancia de que al sumarle el valor de 0,04 muera un ratón o al restarle este valor viva según Sevcik (1987).

### **5.6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

Los resultados son presentados como la media  $\pm$  desviación estándar (DE) y un intervalo de confianza del 95%. Para la DL<sub>50</sub> la mediana obtenida con el método de Hodges y Lehmann. Elementos promediados 91, valores obtenidos a través del paquete estadístico de Carlos Sevcik (1998).

## 5.7. EFECTO HEMORRÁGICO

### Fundamento

La actividad hemorrágica resulta de la acción de metaloproteinasas de los venenos en la membrana basal de capilares y vénulas, lo que ocasiona la ruptura de la integridad de estos microvasos sanguíneos y la consecuente extravasación; este efecto es característico de venenos de serpientes de la familia Viperidae. La actividad hemorrágica se determinó en la piel de roedores, se utilizaron ratones, inyectados con soluciones de veneno por la vía intradérmica. Luego de una hora, se sacrificaron los ratones, se removió su piel y se midió el área hemorrágica en la superficie interna de la piel. La actividad se expresa como la Dosis Hemorrágica Mínima, que corresponde a la cantidad de veneno que induce un área hemorrágica de 10 mm de diámetro una hora después de la inyección.

Para lo cual se inyectó vía intradérmica I.D., tres grupos de tres ratones machos, con peso (18-20 g) con diferentes dosis de veneno (25  $\mu$ l, 50  $\mu$ l, 100  $\mu$ l), disueltos en 0.5 mL de solución salina (Gutiérrez *et al.*, 1985).

### Procedimiento

(1) Preparar soluciones conteniendo diferentes concentraciones del veneno a probar, utilizando solución salina como diluyente. Inicialmente se recomienda trabajar con concentraciones en el ámbito entre 1  $\mu$ g/mL y 200  $\mu$ g/mL.

(2) Inyectar 0.5 mL de cada solución por la vía intradérmica, en la región abdominal, a grupos de 3 ratones. Un grupo adicional de 3 ratones se inyectó con 0.5 mL de solución sin veneno (grupo control).

(3) Sacrificar los ratones mediante inhalación de éter una hora después de la inyección.

(4) Remover la piel y medir el área hemorrágica en la superficie interna. Los ratones control inyectados con PBS no deben presentar lesión hemorrágica.

(5) Determinar el diámetro de la lesión hemorrágica midiendo con una regla.

## **5.8. ACTIVIDAD COAGULANTE**

### **Fundamento**

Muchos venenos de serpientes contienen enzimas que actúan directamente sobre el fibrinógeno (serina proteinasas 'tipo trombina'), o sobre el factor X (metaloproteiniasas) o sobre la protrombina (serina proteinasas o metaloproteiniasas). El resultado de la acción de estas enzimas es la coagulación del plasma o, en el caso de las enzimas 'tipo trombina', la coagulación tanto del plasma como de las soluciones de fibrinógeno. La actividad se determina midiendo los tiempos de coagulación del plasma o del fibrinógeno luego de agregar diversas concentraciones de veneno, por condiciones de laboratorio se optó por medir el tiempo de sangría para determinar esta actividad.

### **Procedimiento**

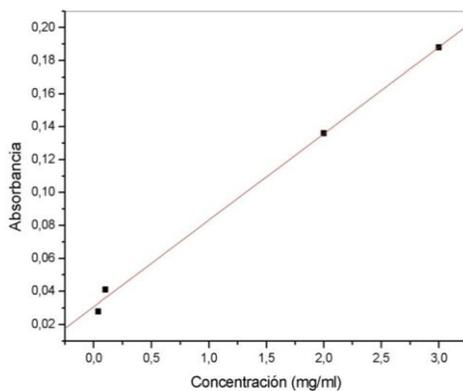
Se procedió mediante el método de (Alvarado y Gutiérrez, 1985), para la cual se inyectaron vía I.P., cuatro grupos de tres ratones machos, con peso (18-20 g) con diferentes dosis de veneno (25  $\mu$ l, 50  $\mu$ l, 75  $\mu$ l, 100  $\mu$ l), disuelto en 0.5mL de solución salina, un grupo adicional de 3 ratones se inyectó con 0.5 mL de solución salina sin veneno (grupo control). Luego de una hora, se limpió la zona de la almohadilla plantar del ratón y posteriormente se pinchó con una lanceta a una profundidad de 3-4 mm, y con un papel filtro en periodos de 15 segundos se limpió

la herida, teniendo cuidado de no dañar el botón plaquetario, hasta que el ratón deje de sangrar y se anota los tiempos que se demore el ratón en sanar, luego de esto, se sacrificaron los animales por inhalación de éter.

## 6. RESULTADOS

### 6.1. Obtención y cuantificación del veneno en mg de proteína

Figura 3. Cuantificación de las proteínas del veneno



[11/11/2009 04:17 "/Graph1" (2455146)]

Linear Regression for Data1\_B:

$$Y = A + B * X$$

Parameter	Value	Error	
A	0,03081	0,00351	
B	0,05248	0,00195	
R	SD	N	P

$$\frac{0,99862 \quad 0,00493 \quad 4 \quad 0,00138}{-----}$$

$$Y=0,03081+0,05248*X$$

**Fuente:** Elaboración propia.

Tabla 2. Concentración vs Absorbancia

Concentración mg/ml (albúmina)	Absorbancia
0,04	0,028
0,1	0,041
2,0	0,136
3,0	0,188

**Fuente:** Elaboración propia.

Concentración del veneno 1,014mg-ml

Volumen del veneno en solución salina= 0,5ml, toma 0,1ml de veneno se lleva a 0,5ml

Concentración del veneno = 1.96µg-µl

Peso del ratón # 1 = 12,9 g

Dosis inicial = 1 µg-g

$$1 \mu\text{g} - \text{g} \times 12,9 \text{ g} = 12,9 \mu\text{g}$$

$$12,9 \mu\text{g} \div 1,96 \mu\text{g}-\mu\text{l} = 6,6 \mu\text{l} \text{ Cantidad de veneno que se inyecta vía (i.p)}$$

Corresponde a la dosis de 1µg-g.

$$6,6 \mu\text{l} \div 12,9 \text{ g} = 0,5102$$

0,5102 Log = -0,3 como el ratón muere con esta dosis le restamos el

Valor de 0,04, obtenemos el valor -0,3310.

$$0,3310 \text{ antilog} = 0,466.$$

$$0,466 \times 13,6(\text{peso del ratón \#2}) = 6,3 \mu\text{l cantidad a inyectar de veneno ratón \#2}$$

$$6,3 \mu\text{l} \times 1,96\mu\text{g-}\mu\text{l} = 12,4\mu\text{g}$$

$$12,4\mu\text{g} \div 13,6 \text{ g (peso ratón \#2)} = 0,91 \mu\text{g-g Dosis inyectada al ratón \#2.}$$

Tabla 3. Valores obtenidos para la DL-50 del veneno total

	PESO	CANTI $\mu\text{l}$	DOSIS $\mu\text{g/g}$	MUERE +/VIVE-	log $\rightarrow$ antilog $\leftarrow$
<b>RATON 1</b>	12,9	6,6	1	MUERE	0,5102 $\rightarrow$ 0,3
<b>RATON 2</b>	13,6	6,3	0,91	VIVE	0,46 $\leftarrow$ 0,3310
<b>RATON 3</b>	12,3	6,2	0,99	MUERE	0,508 $\leftarrow$ 0,294
<b>RATON 4</b>	14,1	6,4	0,9	VIVE	0,46 $\leftarrow$ 0,337
<b>RATON 5</b>	14,4	7,2	0,97	MUERE	0,4975 $\leftarrow$ 0,2988
<b>RATON 6</b>	13,1	5,9	0,89	MUERE	0,456 $\leftarrow$ 0,341
<b>RATON 7</b>	13,9	5,7	0,8	VIVE	0,41 $\leftarrow$ 0,386
<b>RATON 8</b>	12,8	5,7	0,88	MUERE	0,45 $\leftarrow$ 0,347
<b>RATON 9</b>	14,7	5,9	0,79	VIVE	0,406 $\leftarrow$ 0,391
<b>RATON 10</b>	13,2	5,8	0,86	MUERE	0,44 $\leftarrow$ 0,356
<b>RATON 11</b>	12,7	5	0,78	VIVE	0,4 $\leftarrow$ 0,397
<b>RATON 12</b>	14,2	6,1	0,84	MUERE	0,43 $\leftarrow$ 0,364
<b>RATON 13</b>	14,4	5,6	0,76	VIVE	0,4 $\leftarrow$ 0,39

**Fuente:** Elaboración propia.

En el presente trabajo se obtuvo un una **DL<sub>50</sub> de 0,87  $\mu\text{g/g}$**  para el veneno de la serpiente *Micrurus clarki*. Siendo este el primer registro para esta especie, Mediana obtenida con el método de Hodges y Lehmann: El límite de confianza 95% mediana 0,835-0,915 elementos promediados: 91 valores obtenidos a través del paquete estadístico toxicon de Carlos Sevcik (1998).

Tabla 4. Valores obtenidos de algunas DL-50 de *Micrurus sp.*

Taxa	i.m.	i.p	i.v
<i>Micrurus albicinctus</i>	0,8	0,7	0,5
<i>M. corallinus</i>	0,2	0,09	0,04
<i>M. hemprichii ortonii</i>	2	1,7	1,5
<i>M. brasiliensis</i>	0,7	0,6	0,5
<i>M. baliocoryphus</i>	0,6	0,5	0,4
<i>M. spixii obscurus</i>	1,2	0,9	0,8
<i>M. spixii spixii</i>	0,7	0,4	0,2
<i>M. ibiboboca</i>	1,8	1,5	1,2
<i>M. altirostris</i>	0,6	0,5	0,3
<i>M. altirostris</i>	0,7	0,5	0,2
<i>M. frontalis</i>	0,8	0,6	0,5
<i>M. frontalis</i>	0,7	0,6	0,4
<i>M. pyrrhocryptus</i>	0,7	0,6	0,5
<i>M. l. lemniscatus</i>	0,5	0,4	0,2
<i>M. l. carvalhoi</i>	0,7	0,5	0,3
<i>M. l. helleri</i>	0,4	0,2	0,1
<i>M. s. surinamensis</i>	0,8	0,6	0,4
<i>M. s. surinamensis</i>	0,6	0,4	0,2

<i>M. clarki</i>	0,87
<i>B. moojeni</i>	4,7

**Fuente.** Adaptada de (Da Silva, Jr. y Aird, 2001). Valores tomados en µg/g de peso. Valores pequeños indican una gran toxicidad.

## 6.2. Signos de envenenamiento y tiempos de observación en la DL50.

Tabla 5. Signos de envenenamiento vs tiempo en horas (h)

	¼ (h)	½(h)	1 (h)	24 (h)	48 (h)
<b>SIGNOS DE ENVENENAMIENTO</b>					
<b>SIALORREA</b>	3/13	9/9	6/6	0/6	0/5
<b>HIPERHIDROSIS</b>	0/13	9/9	6/6	0/6	0/5
<b>DIFICULTAD RESPIRATORIA</b>	4/13	9/9	3/6	2/6	0/5
<b>EXITABILIDAD</b>	13/13	0/13	0/9	0/7	0/5
<b>SOMNOLENCIA</b>	0/13	4/13	9/9	7/7	0/5
<b>LAGRIMACION</b>	4/13	9/9	6/6	1/6	0/5
<b>ONDULACIONES DE LA COLA</b>	0/13	4/13	3/6	1/6	0/5
<b>ATAXIA (marcha errática)</b>	3/13	4/13	5/6	1/6	0/5
<b>CONVULSIONES</b>	0/13	4/13	4/6	1/6	0/5

<b>MOV ESPASTICOS</b>	0/13	4/13	3/6	1/6	0/5
<b>DISTENCION</b>	13/13	9/9	6/6	0/6	0/5
<b>MUERTE</b>	0/13	4/13	3/6	1/6	0/5

**Fuente:** Elaboración propia.

### 6.3. MANIFESTACIONES CLÍNICAS DEL ENVENENAMIENTO

Figura 4. Pilo erección, distensión abdominal, hipotermia



**Fuente:** Elaboración propia.

Figura 5. Midriasis, efectos simpatolíticos colinérgicos.



**Fuente:** Elaboración propia.

Los efectos simpatolíticos colinérgicos muestran pequeñas evidencias de la participación de la ingesta del ión calcio intra o extracelular mejorando la neurotransmisión en células de mamíferos. Zut et al. (1999) postularon que la ausencia de calcio extracelular disminuye la ingestión del L-glutamato mejorando la remoción del ión Calcio externo en los sinaptosomas promoviendo la despolarización de la membrana sinaptosomal y la consecuente activación de los canales de sodio voltaje dependientes (VDSCs) puesto que son sensibles a la tetrodotoxina (TTX) (Cecchini et al., 2005). Los iones de calcio extracelular no interfieren significativamente con ingestión  $^3\text{H-L}$ -glutamato, el veneno no ejerce este efecto inhibitorio de la ingesta del  $^3\text{H-L}$ -glutamato por los sinaptosomas cortico-cerebral de la rata (RCCS) en ausencia de ion calcio extra-celular. De esta manera la ausencia o disminución del ion calcio extracelular, suspende la actividad de las toxinas, así las PLA2s necesitan calcio en concentraciones micromolares, para ejercer sus actividades enzimáticas. Inactivación irreversible de las PLA2s por la alquilacion de bromo fenacil bromidio (BPB) es usada para suprimir completamente sus actividades catalíticas, toxicidad central y consecuentemente actividad epileptogénica (Dorandeu et al., 1998).

Figura 6. Movimientos Espásticos en manos y pies, posteriormente tónico crónico generalizados, precedidos por periodos de apnea tres a cuatro veces por minuto.



**Fuente:** Elaboración propia.

El veneno de *M. lemniscatus carvalhoi* produce un bloqueo neuromuscular e inhibe la respuesta para agonistas colinoreceptores de Ach, sin afectar las respuestas para KCL, en preparaciones musculares de pollo. Estos resultados sugieren que el veneno actúa preferencialmente en receptores nicotínicos post-sinápticos, interfiriendo con la transmisión neuromuscular sin afectar membranas musculares adyacentes (Serafin et al., 2002).

Figura 7. Produce una tetania por la no recaptura de Ach.



**Fuente:** Elaboración propia.

Además, es importante para investigar el modo de acción de venenos de cada especie y subespecie de *Micrurus* porque la mayoría de los efectos predominantes es la inhibición de los colinoreceptores (Vital-Brazil, 1987; Vital-Brazil y Vieira, 1996).

Figura 8. Comezón generalizada, disfunción urinaria



**Fuente:** Elaboración propia.

Figura 9. Complicaciones a nivel del sistema nervioso central.



**Fuente:** Elaboración propia.

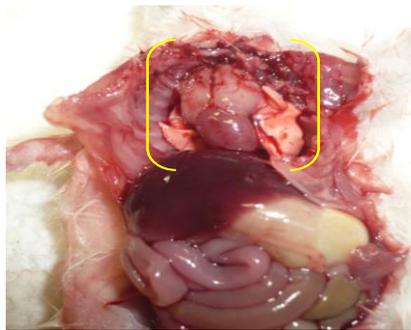
Esto se ve reflejado por equilibrio alterado, confusión mental, apnea, somnolientos, letárgicos. Las PLA2s juegan un papel relevante en eventos como daño neuronal (Bazan et al., 1995). Altos niveles de L-glutamato en la hendidura sináptica tiene considerables consecuencias como síntomas de enfermedades convulsivas y perturbación nerviosa (Miller et al., 1997). Además La neurotoxicidad es un factor prominente para la letalidad del veneno (Cecchini et al., 2005). Está bien establecido que la actividad participante de la PLA2s en eventos que resultan en daño neuronal (Kolko et al., 1996).

Figura 10. Movimientos de la cola pocos minutos antes de morir.



**Fuente:** Elaboración propia.

Figura 11. Infiltrados hemorrágicos difusos.



**Fuente:** Elaboración propia.

Infiltrados hemorrágicos difusos presentes en la pleura y parénquima pulmonar, hipertrofia de cámaras auriculares, además de derrame pericardico por liquido del pericardio y miocardio porque el corazón esta edematizado. Estudios más recientes han determinado que el veneno de estas serpientes *M. frontalis*, *M. brasiliensis*, *M. baliocorypus*, *M. pyrrhocryptus* y *M. lemniscatus* causa dilatación visceral, pulmonar y hemorragia subendocardial, cuando se inyecta a los ratones vía i.v. (da Silva, sin publicar). Ratones inyectados con proteínas de *M. frontalis* causan dilatación toraxica, hemorragia pulmonar y abdominal y sangrado urinario (Cecchini et al., 2005). En este trabajo no se reportaron sangrado urinario, además la dilatación pulmonar y la hemorragia subendocardial se producen cuando se inyecta a los ratones vía i.p.

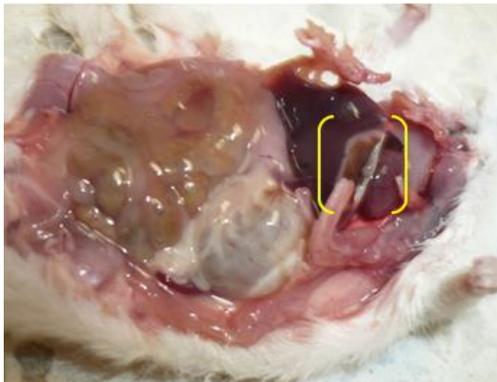
Figura 12. Lisis de las paredes intestinales



**Fuente:** Elaboración propia.

Lisis de las paredes intestinales, se observa hipersecreción intestinal, dilatación de las asas intestinales, pared muy delgada y brillante con burbujas en su interior exceso liquido.

Figura 13. Hígado con textura sólida a gelatinosa friable, con manchas a un lado del órgano.



**Fuente:** Elaboración propia.

Figura 14. Daño a nivel del riñón por posible acción de las metaloproteinasas.



**Fuente:** Elaboración propia.

#### 6.4. RESULTADOS DEL EFECTO HEMORRAGICO.

Tabla 6. Actividad Hemorrágica.

<b>RATONES</b>	<b>DOSIS HEMORRAGICA MINIMA (DHM)</b>	<b>Dosis <math>\mu\text{g/g}</math></b>
<b>GRUPO CONTROL</b>		
Raton 1	4	0
Raton 2	3	0
Raton 3	3,5	0
<b>GRUPO 1 (25 <math>\mu\text{L}</math>)</b>		
Raton 1	3	0,52
Raton 2	3,5	0,52
Raton 3	4	0,52
<b>GRUPO 2 (50 <math>\mu\text{L}</math>)</b>		
Raton 1	4	5,2
Raton 2	4	5,2
Raton 3	3,5	5,2
<b>GRUPO 3 (100 <math>\mu\text{L}</math>)</b>		
Raton 1	5	9,8
Raton 2	4	9,8

Raton 3

4,5

9,8

**Fuente:** Elaboración propia.

Figura 15. Grupo control para efecto hemorrágico.



**Fuente:** Elaboración propia.

Figura 16. Placa hemorrágica con veneno 5.2  $\mu\text{g/g}$ .



**Fuente:** Elaboración propia.

Placas hemorrágicas no mayores de 5 milímetros

Figura 17. Placa hemorrágica con veneno



Fuente: Elaboración propia.

## 6.5. Actividad Coagulante

Tabla 7. Tiempos de Sangría

GRUPO CONTROL	TIEMPOS DE SANGRIA		Desviación estándar	S	Prueba (t)
	(min)	Promedio			
Raton 1	1,25	1,207	0,067		2,780
Raton 2	1,13				
Raton 3	1,24				
<b>GRUPO 1 (25 µL)</b>					
Raton 1	1,45	1,837	0,335	0,058	5,386
Raton 2	2,05				
Raton 3	2,01				
<b>GRUPO 2 (50 µL)</b>					
Raton 1	1,48	1,407	0,127	0,010	9,724
Raton 2	1,26				
Raton 3	1,48				
<b>GRUPO 3 (75 µL)</b>					

Raton 1	1,48				
Raton 2	1,30	1,440	0,125	0,010	11,647
Raton 3	1,54				
<b>GRUPO 4 (100 µL)</b>					
Raton 1					
Raton 2	1,48	1,420	0,085	0,006	18,338
Raton 3	1,36				

**Fuente:** Elaboración propia.

En el presente trabajo se obtuvo un incremento en el tiempo de sangría para los grupos que se aplicó el veneno, mirando un aumento a medida que la concentración se va acrecentando dándonos a conocer de esta manera la posible Actividad de tipo Coagulante. El valor de T para un intervalo de confianza del 95% ( $P \leq 0.05$ ) valor crítico de  $|t|$  para valores de p con cuatro grados de libertad (2.78).

**Figura 18.** Proceso para la actividad coagulante.



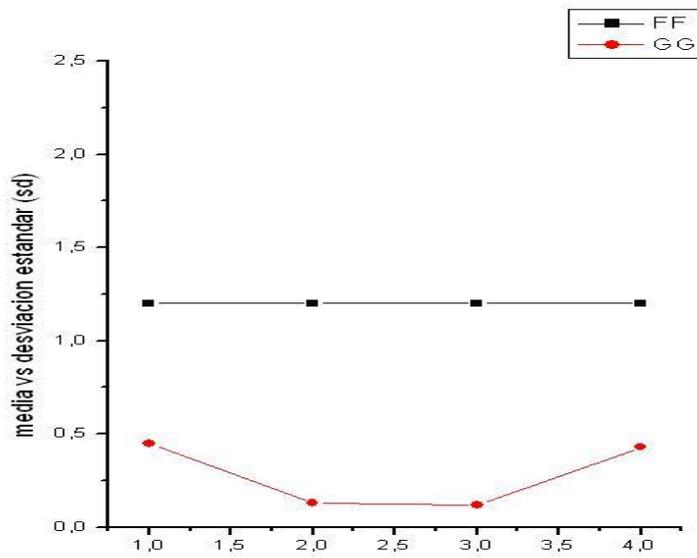
**Fuente:** Elaboración propia.

Tabla 8. Actividades toxicas inducidas por el veneno de *Micrurus clarki*.

<b>DL<sub>50</sub>: Dosis Letal 50 (µg/g) Ratón</b>	<b>Letalidad</b>
<b>DHM: Dosis Hemorrágica Mínima (µg/g)</b>	0,87 (0,835-0,915 )
<b>DCM: Dosis Coagulante Mínima (µg/g)</b>	0
	5,2 ± (0,13)

Fuente: Elaboración propia.

Figura 19. Media grupo control vs desviación estándar grupos con veneno.



Fuente: Elaboración propia.

## 7. DISCUSIÓN

En el presente trabajo se realizaron cuatro estudios, primero determinación de la concentración de proteína indispensable para realizar cualquier tipo de ensayos biológicos, segundo determinación de la Dosis Letal 50, tercero caracterización de la Actividad Hemorrágica y cuarto caracterización de la Actividad Coagulante.

### **DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNA**

Para el presente trabajo se encontró que la concentración de proteína presente en el veneno de *Micrurus clarki* es de 1,014mg-ml, este resultado esta dentro de los rangos obtenidos por (Bolaños et al., 1975) y una cantidad de proteína extraído por ordeño igual a 4.9 mg/ ml. Conjuntamente Cecchini et al 2005 encontró una cantidad de veneno aproximadamente de 7 mg/ml extraído por ordeño.

### **DETERMINACIÓN DE LA DOSIS LETAL 50**

La determinación de la Dosis Letal 50 para *Micrurus clarki* es de 0.875 µg-g. Es el primero que se reporta para la especie *Micrurus clarki*, y no varía de los valores obtenidos para las serpientes del genero *Micrurus*. Son extremadamente tóxicos ya que produce un bloqueo a nivel de placa motora terminal con efectos pre y, o post-sinápticos (da Silva, Aird, 2001), en la tabla # 4, se comparan diferentes DL<sub>50</sub> de serpientes *Micrurus* y se puede observar que la toxicidad es inversamente

proporcional a la cantidad de veneno inyectada en los especímenes de lo cual podemos concluir que la  $DL_{50}$  entre menos cantidad se inyecte es mas letal.

En cuanto a la letalidad del veneno de *Micrurus clarki* podemos observar un alto grado en comparación con otras familias de serpientes (*Viperidae*, *Crotalinae*) esta letalidad se podría dar por el tamaño de los animales, puesto que al no ser tan robusto, la evolución los favorece potenciando el efecto del veneno y de esta manera compensar el tamaño de su cuerpo.

Aunque la preferencia de presas incide directamente en la letalidad del veneno de esta forma la serpiente *Micrurus clarki* debería tener una alta letalidad con respecto a la presa de su preferencia, este tipo de estudios no se han llevado a cabo en este aspecto podríamos tomar como referencia su  $DL_{50}$  para ratones la cual es muy toxica en comparación con otra especie de *Micrurus* (*M. frontalis*, *M. pyrrhocryptus*, *M. spixii*) que son preferentemente ofiófagos, además algunas de estas taxas tienen a los anfibios como preferencia secundaria (Da Silva et al., 2001), de esta manera son dosis letales muy cercanas y además están relacionadas con la preferencias de presas.

El veneno de cada especie de serpiente presenta efectos particulares, los cuales dependen de la especificidad de presas que consuma, esto se debe a su distribución geográfica por ende es importante que la letalidad del veneno se evalúe dependiendo del su región.

Otro camino para analizar la susceptibilidad del veneno de la serpiente coral es clasificar la taxa de *Micrurus* concedido para el conocimiento de preferencia de presas. La clasificación de la preferencia de presas de las especies de *Micrurus* son incompletas pero se basan en conocimientos actuales (da Silva, Aird. 2001).

Características comunes tales como variabilidad en algunas actividades biológicas entre el veneno de diferentes especies de *Micrurus* han sido demostradas en estudios comparativos (Gutiérrez et al., 1983, 1992., Air and Da Silva 1991, Tan and Ponnudurai, 1992., Alape-Girón et al., 1994).

### **CARACTERIZACIÓN DE LA ACTIVIDAD HEMORRÁGICA**

Para el ensayo de la actividad Hemorrágica se demostró que el veneno de *Micrurus clarki* no presenta actividad local, al igual que la serpiente *Micrurus pyrrhocriptus* (Da Silva et al., 2001). En cuanto a las PLA2s del veneno de *Micrurus*, son escasos los estudios que se han realizado debido a la cantidad mínima de veneno obtenida por ordeño (Cecchini et al 2005), No obstante algunas especies presentan actividad hemorrágica (mediante ensayos experimentales) como los encontrados en la serpiente *Micrurus nigrocinctus* que causa fuertes hemorragias pulmonares e intestinales en ratones (Moussatché et al., 1976; y Gómez-Leiva., 1978). Conjuntamente Sánchez et al. (1992) No encontró actividad hemorrágica o necrótica en el veneno de *M. frontalis* de Minas Gerais, cuando se ensayaron en ratas, y en humanos no han sido reportadas las actividades hemorrágicas por envenenamiento de serpientes *Micrurus* de sur América, (Ayerbe, en comunicación personal manifiesta que las serpientes *Micrurus* no presentan actividad hemorrágica para pacientes con mordedura micrurica, esta propiedad es netamente de las serpientes de la familia *Viperidae*).

Sorpresivamente el veneno de *Micrurus albicinctus*, *Micrurus fulvius*, *Micrurus nigrocinctus* y *Micrurus multicinctus* mostró un 13 % de la actividad del veneno de *Bothrops moojeni* y la actividad de la serpiente *Naja naja* (cobra común) de la familia *Elapidae* supera el porcentaje de esas serpientes *Micrurus* (da Silva y Aird., 2001).

Los componentes bioquímicos y farmacológicos del veneno aislado de las serpientes de coral no son bien documentados. Después de los primeros intentos para purificar las proteínas del veneno (Ramsey et al., 1971), solamente dos PLA2s han sido caracterizadas del veneno de *Micrurus fulvius microgalbineus* y *Micrurus nigrocintus nigrocintus* (Possani et al., Arroyo et al., 1987), posteriormente, se ha realizado un estudio cromatográfico comparativo del veneno de serpientes corales Brasileñas (Da Silva et al., 1991), desde el punto de vista inmunoquímico, los venenos de *Micrurus* y otros Elápidos contienen algunos componentes *cross-reacting* (Minton, 1979., Alape-Giron et al., 19994).

Casi todos los venenos de *Micrurus* tienen una alta actividad de PLA2s pero diferentes líneas para otras enzimas (Aird and Da Silva, 1991., Tan and Ponnudurai., 1992). Por ejemplo: algunos de esos venenos tienen actividad *in vitro* anticolinesterasa y anticoagulante (Kumar et al., 1973., Tan and Ponnudurai, 1992., Alape-Giron et al., 1996). Recientes estudios también han revelado que los efectos tóxicos del veneno PLA2s no pueden ser fácilmente correlacionada con su actividad catalítica, sugiriendo que podría específicamente unir a proteínas blancas (Valentin et al., 1999).

### **CARACTERIZACIÓN DE LA ACTIVIDAD COAGULANTE**

En el ensayo de la Actividad de Coagulación, se halla un aumento significativo en el tiempo de sangrado Tabla 7, corroborando de esta manera con los estudios realizados por (Rosso et al., 1996., Silveira-de-Oliveira et al., 2000., de Oliveira et al., 2003., Cecchini et al 2005), el cual realizo estas pruebas con serpientes del genero *Micrurus*. Existiendo una correlación con el tiempo de sangría para los ratones control.

Tabla 9. Actividades enzimáticas de *Micrurus sp.*

	Tiempos de coagulación (min)	Actividad PLA2	Ruptura de liposomas (%)	Miotoxicidad U/L	Edema (%)
<b>Ejemplos</b>					
<b>Ca/PBS</b>	3.5 ± 0.5	0.00	0.00	365.35±9.63	9.58±0.58
<b>Tween 2 %</b>	--	--	100.00	--	0.00
<b><i>M. lemniscatus</i></b>	>45	38.5±3.5	53.12±1.8	1530.08±101.93	57.8±1.03
<b><i>M. frontalis</i></b>	>45	<b>89.9±2.1</b>	59.83±1.2	1858.72±100.56	<b>73.2±1.12</b>
<b><i>M. surinamensis</i></b>	>45	28.6±3.4	37.23±3.4	1104.85±112.35	80.5±0.89
<b><i>M. nigrocinctus</i></b>	>45	<b>75.3±1.9</b>	56.02±1.3	2259.10±139.78	93.7±1.25

**Fuente:** Tomada de (Cecchini et al 2005).

El veneno de cuatro serpientes corales *M. lemniscatus carvalhoi*, *M. frontalis frontalis*, *M. surinamensis surinamensis*, *M. nigrocinctus nigrocinctus* fue ensayada para muchas actividades biológicas. *M. frontalis frontalis*, *M. nigrocinctus nigrocinctus* mostró una alta actividad anticoagulante y de PLA2 tabla anterior. La secuencia de toxinas nos muestra que son similares a las PLA2 tipo I de los elápidos del viejo mundo y para muchas neurotóxicas post-sinápticas (Rosso et al., 1996., Silveira-de-Oliveira et al., 2000., de Oliveira et al., 2003). Toxinas PLA2s son implicadas directa e indirectamente en la formación de edema (Lomonte et al., 1993). Sánchez et al (1992) detectó una actividad inductora de edema en el veneno de *M. frontalis* comparable con el inducido por sub especies *B. alternatus* y *C. durissus*. Los autores también reportaron que actividades procoagulantes fibrinolíticas hemorrágicas y necróticas fueron ausentes en el veneno de *M. frontalis*. El daño liposomal es una evidencia de gran actividad de PLA2s. El veneno de *M. lemniscatus carvalhoi* produjo este efecto en una dosis y manteniendo una temperatura dependiente (Rosso et al., 2005). Este factor sugiere que la fluidez de de las membranas biológicas, son un factor clave para la actividad enzimática (Diaz et al., 1991., Soares et al., 2000 a,b, 2001).

Proteasas hemorrágicas no han sido aisladas del veneno de la serpiente coral, sin embargo la hemorragia inducida por fosfolipasas podría ser argumentada por la

acción de 5'-nucleotidasa, una enzima ubicua en el veneno de la serpiente coral, que inhibe la agregación plaquetaria inducida por ADP, ácido arquidonico y colágeno y consecuentemente suprime la coagulación sanguínea sin causar lisis plaquetaria (Ouyang y Huang, 1983). Mientras eventos genéticos de selección neutral y filogenéticos seguramente influencia la composición del veneno, entre las especies de *Micrurus* examinadas, (*M. brasiliensis*, *M. baliocorypus*, *M. pyrrhocryptus*, *M. frontalis* y *M. albicintus*), la preferencia de las presas parece ser, un determinante en la composición enzimática del veneno (da Silva, Aird, 2001).

La falta de actividad catalítica del veneno para ejercer eficiencia en la actividad neurotóxica. Son herramientas atractivas para el desarrollo de agentes terapéuticos en el estudio de blancos moleculares en membranas celulares (Cecchini et al., 2005).

Variaciones filogenéticas en la composición del veneno consisten esencialmente de eventuales cambios genéticos súper impuestos en la preferencia histórica de las presas. Así la mayoría de las variaciones geográficas probablemente representen una adaptación para presas localmente disponibles (da Silva, Aird, 2001).

Los datos de toxicidad del veneno de las *Micrurus* son letales para un amplio rango de vertebrados es óptimo para incapacitar a sus presas. Las toxinas no enzimáticas no son más letales (Fransis et al., 1997), han co-evolucionado con componentes enzimáticos la mayoría de los cuales son de baja toxicidad. Porque los datos de toxicidad que representan principalmente la contribución de toxinas no enzimáticas están de acuerdo a los datos enzimáticos, es probable que conclusiones similares acerca de comparaciones composicionales entre los

venenos podrían ser esbozados, permitiendo ensayar toxinas no enzimáticas (da Silva, Aird, 2001).

A parte de las serpientes que presentan actividad neurotóxica también tenemos muchos escorpiones y conos de mar, que presentan este tipo de efecto. Tanto en animales como en humanos ciertos síntomas son predominantes trastorno de los reflejos, calambres, convulsiones y parálisis que llevan a la muerte (Guerrero V., J 2002). El veneno de las serpientes está compuesto por diferentes tipos de toxinas muchas de las cuales presentan actividad neurotóxica, y son específicas para diferentes tipos de canales iónicos esto nos permite tener una amplia gama de actividades farmacéuticas (Guerrero V., J 2002).

## 8. CONCLUSIONES

La  $DL_{50}$  del veneno total de *Micrurus clarki* se calculó con el uso de ratones de la cepa ICR y que correspondió a 0,87  $\mu\text{g/g}$  indicando elevada letalidad del veneno, puesto que se trabajó con aprox. 20 $\mu\text{l}$  de veneno.

Los datos tomados de esta prueba de  $DL_{50}$  son los primeros que se dan a conocer para esta especie *Micrurus clarki* a la comunidad científica, esto puede deberse a la dificultad para la recolección de estos especímenes, si le sumamos el conflicto armado que se desarrolla en este país es complicado acceder a los sitios de recolección para coleccionar estas serpientes, adicionalmente la poca cantidad de veneno que producen estas especies al ordeñarlas.

Existe una relación en cuanto a la letalidad de las serpientes *M. frontalis*, *M. pyrrhocryptus*, *M. spixii* y la dieta de estas serpientes puesto que son de tipo ofiófagos.

Muchos de los datos obtenidos en este trabajo, tanto en letalidad como en efectos clínicos causados, a más de los ensayos de Actividad Hemorrágicas y Coagulante coinciden plenamente con los obtenidos en trabajos previamente publicados para otras especies de serpientes del genero *Micrurus*.

Este veneno no presento actividad hemorrágica local como en algunas especies del genero *Micrurus* pero si se observo cierta actividad de efectos de fosfolipasa. Como el producido por el veneno de *M. frontalis*, *M. brasiliensis*, *M. baliocorypus*, *M. pyrrhocryptus*, y *M. albicintus*. Tienen actividad de 5'-nucleotidasa actividad comparable con del veneno de *Bothrops moojeni* (da Silva, Aird, 2001).

No necesariamente, la cantidad de miligramos de proteína por ml están directamente relacionados con la letalidad del mismo (Jimmy Guerrero comunicación personal), ya que su concentración es de 1,014mg-ml, de esta manera los aspecto clínicos no están relacionados con la cantidad de proteínas, sino con el efecto de esos péptidos y de esas proteínas en las células de los organismos en este caso las presas.

El veneno de la serpiente *M. clarki* presento un aumento significativo en los tiempos de sangría, lo cual nos permite descubrir que probablemente exista una Actividad fosfolipasica.



## 9. RECOMENDACIONES

Se sugiere ampliar de manera detallada el estudio de las fracciones del veneno ya que en este trabajo no se realizó estos procesos de la utilización del HPLC, puesto que de acuerdo a sus manifestaciones clínicas y revisiones bibliográficas se conoce que en estas especies del género *Micrurus* existe una gran especificidad en la fracciones del veneno.

Desarrollar investigaciones partiendo de unas pruebas muy puntuales que nos permitan, realizar pruebas farmacológicas para evaluar la actividad biológica de dichas sustancias y así observar la actividad de forma más detallada (actividad del fibrinogeno).

Se recomienda tener en cuenta los resultados de este trabajo, para formular futuras investigaciones puesto que este trabajo es pionero para esta especie *Micrurus clarki* y se conoce muy poco de la actividad farmacológica de este veneno.

Trabajar con órganos aislados "*in vitro*" para determinar qué tipo de bloqueo sináptico produce y de esta manera dar una aplicación a ciertas enfermedades del sistema nervioso central.

Para la realización de futuros experimentos con el veneno de esta especie de serpiente se necesita una buena cantidad de veneno y estas especies es muy poco lo que produce, por ende es indispensable se realice un "pool" de venenos de serpiente de la misma especie o hacer ordeños periódicos y mantener congelado el veneno par así prevenir su desnaturalización.

Además si se continúa con la investigación de estos animales y los de otro tipo, es necesario conocer el comportamiento, su biología y de tener plenamente identificada su taxonomía de la especie que se desea trabajar.

En el trabajo de laboratorio se debe tener especial cuidado, cuando se va a trabajar con este tipo de veneno, en primer lugar por letalidad del mismo, y segundo por la poca cantidad de veneno que se obtiene en el ordeño, se necesita tener una gran destreza en la manipulación de las jeringas y un buen manejo en la parte analítica para realizar unos buenos cálculos y lograr así unos buenos resultados.

Estos ensayos biológicos son fundamentales para posteriores investigaciones, puesto que para desarrollar un tipo de suero antiofídico o posibles actividades farmacológicas es indispensable partir de una Dosis Letal 50.

## 10. Bibliografía

Alvarado, Arcelia, et al. Obtención de una fracción crotálica con acción hemoaglutinante y evaluación "in vivo" e "in Vitro" del probable daño a tejidos. Tec. Pecu Méx. 2004; 42(2). 247-260.

Anderson, P., et al. 1974. Tolerance to the Effects of D9-Tetrahydrocannabinol in Mice on Intestinal Motility, Temperature and Locomotor Activity. Psychopharmacologia. 43, 31-36.

Ángel, Rodrigo. Serpientes de Colombia. Guía práctica para su clasificación y tratamiento del envenenamiento causado por sus mordeduras. Facultad nacional de agronomía. Medellín. Vol. XXXVI No 1. 1983.

Apesteguía, S. and Zaher, H. (2006) A cretaceous terrestrial snake with robust hindlimb and a sacrum. Nature 440, 1037–1040.

Ayerbe, S. 1982. Ofidiotoxicosis Micrúrica en el Cauca: Reporte de un caso Fatal. Cuad. de Med. Popayán (Col.), 7 : 1 - 7.

Beaman KR, Beck DD, McGurty BM. The Beaded Lizard (*Heloderma horridum*) and Gila Monster (*Heloderma suspectum*): A bibliography of the family Helodermatidae. Smithson Herpetol Inf Serv 2006; 136:1–66.

Bogert CM. Dentitional phenomena in cobras and other elapids with notes on adaptive modifications of the fangs. Bull Am Mus Nat Hist 1943; 131:285–360.

Bonilla, Angélica. Bonilla Leonardo. Ciencia del animal de laboratorio: el primer peldaño hacia la neurociencia y la experimentación animal. Universidad del Tolima. Facultad de Ciencias. 2006.

Bolaños, R., L. Cerdas & J.W. Abalos. 1978. Venoms of coral snakes (*Micrurus* sp.): Report on a multivalent antivenin for the Americas. Bull. Pan Am. Health Org. 12: 23-27.

Bolaños, R.; L. Cerdas and R. Taylor. 1975 The production and Characteristics of a Coral Snakes (*Micrurus mipartitus hertwigi*). Antivenin Toxicon 13:139-142.

Bradford MM. A rapid and sensitive for the cuantitation of microgram quantitates of protein dye binding. Analytical Biochemistry 72. 248-254. 1976.

Brazil OV, Fontana MD, Heluany NF. Nature of the postsynaptic action of crotoxin at guinea-pig diaphragm end-plates. J Nat Toxins, 2000; 9:33-42.

Calvete, J.J., Marcinkiewicz, C. and Sanz, L. (2007) Snakes venomics of *Bitis gabonica gabonica*. Protein family composition, subunit organization of venom toxins, and characterization of dimeric disintegrins bitisgabonin-1 and bitisgabonin-2. J. Proteome Res. 6, 326–336.

Calvete, J.J., Juárez, P. and Sanz, L. (2007) Snakes venomics. Strategy and applications. J. Mass Spectrom. 42, 1405–1414.

Cambell y Lamar W.L.1989 The Venomous Reptiles of Latin America cornell University Press. Ithaca and London USA. 425pp.

Campbell, J. A. and Lamar W. W. 1989 The venomous reptiles of Latin America, Comstock Publishing Associates. 425pp Peters, J. A., and B. Orejas-Miranda.

1970. Catalogue of the Neotropical Squamata. Part I: Snakes. Bull. U.S. Natl. Mus., no. 297. viii + 347 pp.07.

Carsi JM, Potter LT. m1-Toxin isotoxins from the green mamba (*Dendroaspis angusticeps*) that selectively block m1 muscarinic receptors. *Toxicon* 2000; 38(2):187–98.

Carsi JM, Valentine HH, Potter LT. m2-toxin: A selective ligand for M2 muscarinic receptors. *Mol Pharmacol* 1999; 56(5):933–7.

Castaño-Mora, O. V. (Ed.). Libro rojo de reptiles de Colombia. Bogotá, Colombia: Libros rojos de especies amenazadas de Colombia. Instituto de Ciencias Naturales-Universidad Nacional de Colombia, Ministerio del Medio Ambiente, Conservación Internacional-Colombia, 2002. 160 p.

Cecchini, A.L., Marcussi, S., Silveira, L.B., Borja-Oliveira, C.R., Rodrigues-Simioni, L., Amara, S., Stabeli, R.G., Giglio, J.R., Arantes, E.C., Soares, A.M., 2005. Biological and enzymatic activities of *Micrurus* sp. (Coral) snake venoms. *Comp. Biochem. Physiol. Part A* 140, 125–134.

Chang, C.C. & K.H. Tseng. 1978. Effect of crotamine, a toxin of South American rattlesnake venom, on the sodium channel of murine skeletal muscle. *Br. J. Pharmacol.* 63: 551-559.

Charaterization of alpha-neurotoxin and phospholipase A2 activities from *Micrurus* venoms. Determinations of the amino acid sequence and receptor-binding ability of the major alpha-neurotoxin from *Micrurus nigrocinctus nigrocinctus*. *Eur J Biochem.* 1996 May 15:238(1): 231-9.

Chimienti F, Hogg RC, Plantard L, Lehmann C, Brakch N, Fischer J, et al. Identification of SLURP-1 as an epidermal neuromodulator explains the clinical phenotype of Mal de Meleda. *Hum Mol Genet* 2003; 12 (22):3017–24.

Da Silva Jr., N.J., Aird, S.D., 2001. Prey specificity, comparative lethality and compositional differences of coral snake venoms. *Comp. Biochem. Physiol.* 128, 425–456.

Da Silva, Jr., N.J., 1995. Molecular systematics and evolution of venoms in the South American 'triad' coral snakes *Micrurus*, *Elapidae*. Ph.D. Dissertation. Department of Zoology, Brigham Young University, Provo, UT, USA.

Da Silva, Jr., N.J., Sites, J.W. 2001. Phylogeny of the South America triad coral snakes *Ž* *Serpentes: Elapidae*. based on molecular characters., In press, *Herpetologica*.

Da Silva Jr., N.J., Griffin, P.R., Aird, S.D., 1991. Comparative chromatography of Brazilian coral snakes *Micrurus*. venoms. *Comp. Biochem. Physiol.* 100B, 117-126.

Damico, D.C., Nascimento, J.M., Lomonte, B., Ponce-Soto, L.A., Joazeiro, P.P.,Novello, J.C., Marangoni, S., Collares-Buzato, C.B., 2007. Cytotoxicity of *Lachesis muta muta* snake (bushmaster) venom and its purified basic phospholipase A (2) (LmTX-I) in cultured cells. *Toxicon* 49 (5), 678–692.

Demaret JP, Chwetzoff S, Brunie S. Dimeric character of a basic phospholipase-A2 from cobra venom — experimental and modeling study. *Protein Eng* 1990; 4(2):171–6.

de Weille JR, Schweitz H, Maes P, Tartar A, Lazdunski M. Calciseptine, a peptide isolated from black mamba venom, is a specific blocker of the L-type calcium channel. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991; 88:2437–40.

Dubovskii PV, Lesovoy DM, Dubinnyi MA, Konshina AG, Utkin YN, Efremov RG, et al. Interaction of three-finger toxins with phospholipid membranes: comparison of S- and P-type cytotoxins. *Biochem J* 2005; 387:807–15.

Dufton MJ. Classification of elapid snake neurotoxins and cytotoxins according to chain-length — evolutionary implications. *J Mol Evol* 1984; 20(2):128–34.

Envenenamiento por mordedura de serpientes. Circular 000092 del 29 de octubre de 2004. Ministerio de Salud. Colombia.

Fisbach DP, Fogdall RP. Coagulación fundamentos. Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana S.A., 1985.

Fontana MD, Vital Brazil O - Mecanismo da potencialização causada pela quinidina e procainamida sobre o bloqueio neuromuscular produzido pela d-tubocurarina. *Ciência e Cultura* 1973; 25:485.

Fohlman J. Comparison of 2 highly toxic Australian snake-venoms — taipan (*Oxyuranus s. scutellatus*) and the fierce snake (*Parademansia microlepidotus*). *Toxicon* 1979; 17 (2):170–2.

Fox, J.W. and Serrano, S.M.T. (2005) Snake toxins and hemostasis. *Toxicon* 45, 951–1181.

Francis, B., Jorge da Silva Jr., N., Casais e Silva, L.L., Seebart, C., and. Kaiser, I.I., 1997. Toxins isolated from the venom of the Brazilian coral snake *Micrurus frontalis frontalis*. include hemorrhagic type phospholipases A2 and postsynaptic neurotoxins. *Toxicon* 35, 1193-1203.

Francis, B., Williams, E.S., Seebart, C., Kaiser, I.I., 1993. Proteins isolated from the venom of the common tiger snake (*Notechis scutatus scutatus*) promote hypotension and hemorrhage. *Toxicon* 31, 447–458.

Francis, B., Schmidt, J., Yang, Y., Orlando, R., Kaiser, I.I., 1995. Anions and the anomalous gel filtration behaviour of notexin and scutoxin. *Toxicon* 33, 779–789.

Fry BG. From genome to “venome”: Molecular origin and evolution of the snake venom proteome inferred from phylogenetic analysis of toxin sequences and related body proteins. *Genome Res* 2005; 15(3):403–20.

Garcia MC, Hernandez-Gallegos Z, Escamilla J, Sanchez JA. Calciseptine, a Ca channel blocker, has agonist actions on L-type Ca<sup>2+</sup> currents of frog and mammalian skeletal muscle. *J Membr Biol* 2001;184:121-9.

Gibbs, H.L. and Rossiter, W. (2008) Rapid evolution by positive selection and gene gain and loss: PLA(2) venom genes in closely related *Sistrurus* rattlesnakes with divergent diets. *J. Mol. Evol.* 66, 151–166.

Gibbs, H.L., Sanz, L. and Calvete, J.J. (2009) Snake population venomomics: proteomics-based analyses of individual variation reveals significant gene regulation effects on venom protein expression in *Sistrurus* rattlesnakes. *J. Mol. Evol.* 68, 113–125.

Gómez-Leiva, M.A., 1978. Comparative study of the hemolytic activity of venoms of *Micrurus nigrocinctus*, *Bungarus multicinctus* and *Naja naja*. In: Rosenberg, P. Ž Ed., Toxins, Animal, Plant and Microbial. Academic Press, New York, p. 433.

González Marquetti R., Bello Gárciga J.L. Evaluación química y biológica del ditiocarbamato 43gv040 durante sus estudios preclínicos. Estudios de estabilidad.

Goularte, F.C., M.A. Cruz-Hofling, J.C. Cogo, J.M. Gutiérrez & L. Rodrigues-Simioni. 1995. The ability of specific antivenom and low temperature to inhibit the myotoxicity and neuromuscular block induced by *Micrurus nigrocinctus* venom. *Toxicon* 33: 679-689.

Greene, H.W. (1983) Dietary correlates of the origin and radiation of snakes. *Am. Zool.* 23, 431–441.

Greene, H.W. (1997) *Snakes: The Evolution of Mystery in Nature*, University of California Press, Berkeley.

Gutiérrez, J.M., Lomonte, B., León, G., Alape-Girón, A., Flores-Díaz, M., Sanz, L., Angulo, Y. and Calvete, J.J. (2009) Snake venomomics and antivenomics: proteomic tools in the design and control of antivenoms for the treatment of snakebite envenoming. *J. Proteomics* 72, 165–182.

Gutiérrez, J.M., Rojas, G., Jorge da Silva Jr., N., Nuñez, J., 1992. Experimental myonecrosis induced by the venoms of South American *Micrurus* Ž coral snakes. *Toxicon* 30, pp. 1299\_1302.

Gutiérrez JM, Gené JA, Rojas G, Cerdas L. Neutralization of proteolytic and hemorrhagic activities of Costa Rican snake venoms by a polyvalent antivenom. *Toxicon.* 1985; 23(6): 887-93.

Guerrero V., J. A. Aislamiento, purificación y evaluación de neurotoxinas del escorpión *Centruroides margaritatus* (Buthidæ) del Municipio del Patía, Departamento del Cauca, Colombia. Popayán, 2002, 98 p. Trabajo de grado (Biólogo). Universidad del Cauca. Facultad de Ciencias Naturales, Exactas y de la Educación. Énfasis en zoología.

Ho, P.L., Soares, M.B., Maack, T. et al., 1997. Cloning of an unusual natriuretic peptide from the South American coral snake *Micrurus corallinus*. Eur. J. Biochem. 250, 144\_149.

Hernandez J., C. A. Estudio filogenético molecular de las especies y subespecies del genero Heloderma 2004.

Irwin, R.L., Olivier, K.L., Mohamed, A.H., Haast, W.E., 1970. Toxicity of elapid venoms and an observation in relation to geographical location. Toxicon 8, 51\_54.

Jackson K. The evolution of venom-delivery systems in snakes. Zool J Linn Soc 2003; 137:337–54.

Jerusalinsky D, Harvey AL. Toxins from mamba venoms: Small proteins with selectivities for different subtypes of muscarinic acetylcholine receptors. TIPS 1994; 15:424-30.

Jorge, M.T., Sano-Martins, I.S., Tomy, S.C., Castro, S.C.B., Ferrari, R.A., Ribeiro, L.A., Warrell, D.A., 1997. Snakebite by the Bushmaster (*Lachesis muta*) in Brazil: Case report and review of the literature. Toxicon 35, 545–554.

Juárez P, Comas I, González-Candelas F, Calvete JJ. Evolution of snake venom disintegrins by positive darwinian selection. Mol Biol Evol 2008; 25(11):2391–407.

Kardong KV. Evolutionary patterns in advanced snakes. *Am Zool* 1980; 20:269–82.

Kardong KW. Colubrid snakes and Duvernoy's "venom" glands. *J Toxicol Toxin Rev* 2002; 21(1 y 2):1–19.

Kardong KV. The evolution of the venom apparatus in snakes from colubrids to viperids and elapids. *Mem Inst Butanan* 1982; 46:105–18.

Kochva E. The development of the venom gland in the opisthoglyph snake *Telescopus fallax* with remarks on *Thamnophis sirtalis* (Colubridae, Reptilia). *Copeia* 1965:147–54.

MacFarlane RG. An enzyme cascade in the blood clotting mechanism and its function as a biochemical amplifier. *Nature*. 1994; 202:98-9.

Markland S, Francis. 1998. Snake venoms and the hemostatic system *Toxicon* Vol. 36, No. 12, pp. 1749±1800.

Mackessy, S.P. (1991) Morphology and ultrastructure of the venom glands of the northern Pacific rattlesnake *Crotalus viridis oreganus*. *J. Morphol.* 208, 109–128.

Martínez Parente, Juan. La rata de laboratorio y el bioterio de la unidad sur del cinvestav. *Prácticas de Biología Celular 2004-2005 Departamento de Biología Celular – UB.*

Marx H, Rabb GB. Phyletic analysis of fifty characters of advanced snakes. *Fieldiana (Zool)* 1972; 63:1–321.

McDowell RS, Dennis MS, Louie A, Shuster M, Mulkerrin MG, Lazarus RA. Mambin, a potent glycoprotein IIb–IIIa antagonist and platelet aggregation inhibitor structurally related to the short neurotoxins. *Biochemistry* 1992; 31:4766–72.

Ménez, A. (2002) *Perspectives in Molecular Toxinology*, John Wiley & Sons Ltd., Chichester, UK.

Meier, J. and White, J. (1995) *Handbook of Clinical Toxicology of Animal Venoms and Poisons*, CRC Press, Boca Raton.

Meier, J., Theakston, R.D.G., 1986. Approximate LD50 determinations of snake venoms using eight to ten experimental animals. *Toxicon* 24, 395–399.

Miwa JM, Ibanez-Tallon I, Crabtree GW, Sanchez R, Sali A, Role LW, et al. lynx1, an endogenous toxin-like modulator of nicotinic acetylcholine receptors in the mammalian CNS. *Neuron* 1999; 23(1):105–14.

Moraes, F.V., Souza-c-Silva, M.C.C.K., Barbaro, C., Leitao, M.A., Furtado, M.F. D., 2003. Biological and immunochemical characterization of *Micrurus altirostris* venom and serum neutralization of its toxic activities. *Toxicon* 41, 71–79.

Mouhat S, Jouirou B, Mosbah A, De Waard M, Sabatier JM. Diversity of folds in animal toxins acting on ion channels. *Biochem J* 2004;378:717–26.

Nei, M., Gu, X. and Sitnikova, T. (1997) Evolution by the birth-and-death process in multigene families of the vertebrate immune system. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 7799–7806.

Navarro JL, Cesar JM, Fernández MA, Fontcuberta J, Reverter JC, Gol-Freixas J. Morbilidad y mortalidad en pacientes con tratamiento anticoagulante oral. *Rev Esp Cardiol.* 2007; 60:1226-32.

Lee, Chen-Yuan. Handbook of experimental pharmacology. Continuation of handbuch der experimentellen pharmacologie. Vol 52 editorial board 1979.

Li, Z.Y., Yu, T.F., Lian, E.C., 1994. Purification and characterization of L-amino acid oxidase from king cobra (*Ophiophagus hannah*) venom and its effects on human platelet aggregation. *Toxicon* 32, 1349–1358.

Lynch, V.J. (2007) Inventing an arsenal: adaptative evolution and neo-functionalization of snake venom phospholipase A2 genes. *BCM Evol.Biol.* 7, 2.

Lind P, Eaker D. Amino-acid-sequence of the alpha-subunit of taipoxin, an extremely potent pre-synaptic neurotoxin from the Australian snake taipan (*Oxyuranus s. scutellatus*). *Eur J Biochem* 1982;124(3):441–7.

Osipov AV, Kasheverov IE, Makarova YV, Starkov VG, Vorontsova OV, Ziganshin RK, et al. Naturally occurring disulfide-bound dimers of three-fingered toxins — a paradigm for biological activity diversification. *J Biol Chem* 2008;283(21):14571–80.

Otero R, Raúl Guillermo Osorio, Rafael Valderrama y César Augusto Giraldo. *Toxicón* Vol. 30, N°5/6, pp. 611-620. 1992.

Patthy L. Modular assembly of genes and the evolution of new functions. *Genetica* 2003; 118(2–3):217–31.

Pawlak J, Mackessy SP, Sixberry NM, Stura EA, Le Du MH, Menez R, et al. Irditoxin, a novel covalently linked heterodimeric three-finger toxin with high taxon-specific neurotoxicity. *FASEB J* 2008:fj.08–113555.

Pérez-Gómez F, Alegría E, Berjón J, Iriarte JA, Sumadle J, Salvador A, et al. Comparative effects of antiplatelet, anticoagulant, or combined therapy in patients with valvular and nonvalvular atrial fibrillation. A randomized study. *J Am Coll Cardiol*. 2004;44:1557-66.

Pineda, D. R. y Renjifo, J. M.. Accidente ofídico. En: PINEDA D. R. (Ed.) *Accidentes por animales venenosos*. Bogotá: Instituto Nacional de Salud, 2002. p. 17-69.

Regidor Braojos, Leandro. Solans Lampurlanés, Xavier. Neurotoxicidad: agentes neurotóxicos. Centro Nacional de Condiciones de Trabajo. Nota Técnica de Prevención. NTP 487.

Riascos Bernal D F, Aceros Muñoz HA. Efecto in vitro del litio sobre la excitabilidad de la preparación frenico-diafragma de rata y su relación con el temblor

Rodríguez-Acosta, Alexis. Los venenos y el síndrome de envenenamiento ofídico. Instituto de Medicina Tropical. Sección de Inmunoquímica. Universidad Central de Venezuela.

Rodriguezithurralde D, Mbugua P, Karlsson E. Fasciculins, tight-binding acetylcholinesterase (ache) inhibitors isolated from *Dendroaspis* venoms. *Arch Biol Med Exp* 1984; 17(2):R173.

Rosso JP, Vargas Rosso O, Gutierrez JM, Rochat H, Bougis PE. Characterization of alpha-neurotoxin and phospholipase A2 activities from Micrurus venoms. Determination of the amino acid sequence and receptor-binding ability of the major alpha-neurotoxin from Micrurus nigrocinctus nigrocinctus. Eur J Biochem. 1996 May 15;238(1):231-9 .

Roze, J. A. 1983. New World coral snakes (Elapidae): a taxonomic and biological summary. Mem. Inst. Butantan 46 [1982]: 305-338.

Sanz, L., Escolano, J., Ferretti, M., Biscoglio, M.J., Rivera, E., Crescenti, E.J., Angulo, Y., Lomonte, B., Gutiérrez, J.M. and Calvete, J.J. (2008) Snake venomomics of the South and Central American Bushmasters. Comparison of the toxin composition of Lachesis muta gathered from proteomic versus transcriptomic analysis. J. Proteomics 71, 46–60.

Sanz, L., Gibbs, H.L., Mackessy, S.P. and Calvete, J.J. (2006) Venom proteomes of closely related Sistrurus rattlesnakes with divergent diets. J. Proteome Res. 5, 2098–2112.

Scanlon, J.D. and Lee, M.S.Y. (2000) The pleistocene serpent Wonambi and the early evolution of snakes. Nature 403, 416–420.

Seminario Ofidismo. Estudiantes Veterinaria. Universidad del Tolima. Ibagué 2005.

Sevcick, C. LD 50 determination : objections to the method of Beccari as modified by Molidengo. En: Toxicon. Vol. 25 (1987); p. 1213-1224.

Taub AM. Comparative histological studies on Duvernoy's gland of colubrid snakes. Bull Am Mus Nat Hist 1967; 138:1–50.

Theakston RD, Reid HA. Development of simple standard assay procedures for the characterization of snake venom. Bull World Health Organ. 1983; 61(6): 949-56.

Vega J. E. fraccionamiento de los venenos de las serpientes *Micrurus mipartitus*. *B. asper* Identificación de las fracciones con actividad permeabilizante en membrana de fosfolípidos. Departamento del Cauca, Colombia. Popayán, 2007 Pp 1-131 Trabajo de grado (Químico). Universidad del Cauca. Facultad de Ciencias Naturales, Exactas y de la Educación.

Vidal N. Colubroid systematics: evidence for an early appearance of the venom apparatus followed by extensive evolutionary tinkering. J Toxicol Toxin Rev 2002; 21:21–41.

Vidal N, Hedges SB. Higher-level relationships of caenophidian snakes inferred from four nuclear and mitochondrial genes. C R Biol 2002; 325(9):987–95.

Vidal N, Delmas AS, David P, Cruaud C, Couloux A, Hedges SB. The phylogeny and classification of caenophidian snakes inferred from seven nuclear protein-coding genes. C R Biol 2007; 330(2):182–7.

Viljoen CC, Botes DP. Snake-venom toxins—purification and amino-acid sequence of toxin ta2 from *Dendroaspis angusticeps* venom. J Biol Chem 1974; 249(2):366–72.

Vital-Brazil, O., 1980. Venenos ofídicos neurotóxicos. Rev. Ass. Med. Brazil 26, 212–218.

Vital-Brazil, O., 1987. Coral snake venoms: mode of action and pathophysiology of experimental envenomation. Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo 29, 119–126.

Wagstaff, S.C., Sanz, L., Juárez, P., Harrison, R.A. and Calvete, J.J. (2009) Combined snake venomomics and venom gland transcriptomic analysis of the ocellated carpet viper, *Echis ocellatus*. *J. Proteomics* 71, 609–623.

Wang CH, Monette R, Lee SC, Moriey P, Wu WG. Cobra cardiotoxin- induced cell death in fetal rat cardiomyocytes and cortical neurons: Different pathway but similar cell surface target. *Toxicon* 2005, in press.

Wollberg M, Kochva E, Underwood G. On the rictal glands of some atractaspid snakes. *Herpetol J* 1998; 8:137–43.

Yee JSP, Nanling G, Afifiyan F, Donghui M, Lay PS, Armugam A, Jeyaseelan K. Snake postsynaptic neurotoxins: Gene structure, phylogeny and applications in research and therapy. *Biochimie* 2004; 86:37-149.