

**EVALUACIÓN DE LOS EFECTOS RENALES INDUCIDOS POR EL VENENO DE
LA SERPIENTE *Bothrops ayerbei* Folleco, 2010 EN RATAS WISTAR, RATÓN
ALBINO SUIZO Y CÉLULAS MDCK**

MAYRA ALEJANDRA VELASCO REYES

**UNIVERSIDAD DEL CAUCA
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES EXACTAS Y DE LA EDUCACIÓN
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA
POPAYÁN
2013**

**EVALUACIÓN DE LOS EFECTOS RENALES INDUCIDOS POR EL VENENO DE
LA SERPIENTE *Bothrops ayerbei* Folleco, 2010 EN RATAS WISTAR, RATÓN
ALBINO SUIZO Y CÉLULAS MDCK**

**Trabajo de Grado presentado como requisito parcial para optar por el Título
de Bióloga**

**Director:
M.Sc. JOSÉ T. BELTRÁN VIDAL**

**Asesores:
M.Sc. ROBERTA JEANE BEZERRA JORGE**

Ph.D. JIMMY ALEXANDER GUERRERO

**UNIVERSIDAD DEL CAUCA
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES EXACTAS Y DE LA EDUCACIÓN
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA
POPAYÁN
2013**

NOTA DE ACEPTACIÓN

Jurado

Jurado

Prof. M.Sc. José T Beltrán Vidal
Director Trabajo de Grado

Ciudad y Fecha de Sustentación: Popayán _____ de _____ de _____

Dedico esta tesis de grado a mi padre por ser mi fortaleza, mi coraje y mi apoyo, y a Dios por habernos permitido a mí y a mi familia compartir la alegría de tenerte cerca y disfrutar contigo esta etapa de mi vida.

AGRADECIMIENTOS

A Dios por permitirme alcanzar mis objetivos y por ser mi calma en los momentos de angustia, y la fuerza reconfortante para seguir en cada momento.

Al Departamento de Biología por la formación recibida durante el transcurso de mi carrera

Al Centro de Investigaciones Biomédicas de la Universidad del Cauca (CIBUC), por brindarme las herramientas necesarias para culminar mi trabajo de grado.

A la Universidad Federal de Ceará por ofrecerme los recursos necesarios para realizar y culminar mi tesis de grado.

Al Laboratorio de Farmacología Venenos y Toxinas (LFAVET) por brindarme la infraestructura para desarrollar mi tesis de grado.

Al Grupo de Investigaciones Herpetológicas y Toxinológicas (GIHT) por los conocimientos aportados y la formación recibida.

A mi Director, Asesores y amigos M.Sc Profesor José Beltrán, Ph.D Jimmy Guerrero y M.Sc Roberta Bezerra por la confianza, dedicación y paciencia, por sus conocimientos y experiencias que aportaron a mi formación como profesional y como persona.

A mis padres Lucio Velasco y Ximena Reyes por ser siempre mi apoyo y brindarme lo necesario para culminar mi carrera, por sus cuidados y afectos siempre incondicionales.

A mis hermanos Fabián Velasco y Sandra Velasco por la alegría siempre reflejada en su rostro, por el apoyo en mi carrera y porque a su lado siempre tendré una sonrisa.

A mi novio Pedro por su paciencia y apoyo incondicional.

A mis compañeros de universidad por ser las personas con las que compartí toda mi formación académica y viví grandes aventuras.

A mis amigas y compañeras Andrea Corredor y Carolina Bolaños por estar siempre a mi lado, por su apoyo incondicional en mi vida y mi trabajo de grado y porque fueron una gran fortaleza en momentos difíciles.

A mis compañeros del Grupo de Investigaciones Herpetológicas y Toxinológicas (GIHT) Jorge Zúñiga, Luis Vera y María del Mar Rivera, por su dedicación y cuidado con los animales experimentales.

A mis compañeros del Laboratorio de Farmacología Venenos y Toxinas (LAFAVET) Clarissa Perdagio, Rosa Freitas, Lenisse Noguera, Dayana Galindez y Mario Chávez por ser los acompañantes en el desarrollo de mi tesis, por su amistad y conocimientos.

CONTENIDO

	Pág.
RESUMEN	13
INTRODUCCIÓN	14
1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	16
2. JUSTIFICACIÓN	17
3. OBJETIVOS	19
3.1 OBJETIVO GENERAL	19
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	19
4. MARCO TEÓRICO	20
4.1 CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS, HÁBITAT Y COMPORTAMIENTO DE <i>B. ayerbeii</i> .	21
4.2 ASPECTOS DEL ENVENENAMIENTO BOTHRÓPICO	22
4.3 CARACTERÍSTICAS BIOQUÍMICAS DEL VENENO	24
4.4 FISIOLOGÍA RENAL	24
4.5 INSUFICIENCIA RENAL AGUDA (IRA)	27
4.6 INULINA Y CREATININA	28
4.7 ALTERACIONES CELULARES DESARROLLADAS EN LA INSUFICIENCIA RENAL AGUDA	29
5. ANTECEDENTES	30
6. MATERIALES Y MÉTODOS	33
6.1 TIPO DE ESTUDIO	33
6.2 ANIMALES EXPERIMENTALES	33
6.3 TÉCNICAS DE TRABAJO	34
6.3.1 Perfusión de riñón aislado	34
➤ Grupos experimentales	34
➤ Sistema a utilizar	34
➤ Componentes del sistema	35

➤ Calibración del sistema	36
➤ Preparación del sistema	38
➤ Técnica quirúrgica	39
➤ Protocolo experimental	41
➤ Análisis bioquímico e histológico	42
➤ Cálculo de los parámetros renales	43
6.3.2 Jaulas Metabólicas	45
➤ Grupos experimentales	45
➤ Protocolo experimental	45
➤ Análisis Bioquímico	46
6.3.3 Ensayo citotóxico	46
➤ Linaje Celular	46
➤ Cultivo y mantenimiento de las células (MDCK)	46
➤ Prueba con MTT	48
➤ Protocolo experimental	49
6.3.4 Análisis estadístico	50
6.3.5 Comité de ética	51
7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	52
7.1 Perfusión de riñón aislado	52
7.2 Resultado de las alteraciones histológicas en el riñón	58
7.3 Jaulas metabólicas	62
7.4 Ensayo de viabilidad de las células	65
8. CONCLUSIONES	70
9. RECOMENDACIONES	71
10. BIBLIOGRAFÍA	72

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. <i>Bothrops ayerbei</i> con su coloración gris.	21
Figura 2. Distribución de <i>Bothrops ayerbei</i> , <i>B. asper</i> , <i>B. atrox</i> , <i>B. rhombeatus</i> y <i>Bothrocophias colombianus</i> en el Departamento del Cauca.	22
Figura 3. Sección de riñón humano que muestra los principales vasos que aportan el riego sanguíneo al riñón. Esquema de la microcirculación de cada nefrona.	26
Figura 4. Sistema de perfusión renal.	36
Figura 5. Valores de la presión de perfusión (PP), registrados durante la calibración del sistema por cinco velocidades de la bomba de perfusión.	37
Figura 6. Valores del fluxómetro, registrados durante la calibración del sistema por cinco velocidades de la bomba de perfusión.	37
Figura 7. Valores del volumen urinario, registrados durante la calibración del sistema por cinco velocidades de la bomba de perfusión	38
Figura 8. Visualización de la arteria femoral y aplicación de manitol 20%.	39
Figura 9. Visualización, identificación, canulación del uréter y canulación de la arteria renal a través de la arteria mesentérica.	41

Figura 10. Esquema simplificado del cultivo de células tubulares renales MDCK.	48
Figura 11. Ensayo de viabilidad de células por el método MTT.	50
Figura 12. Efecto del veneno total de <i>B. ayerbei</i> (10µg/mL) sobre la presión de perfusión, y la resistencia vascular renal.	52
Figura 13. Efecto del veneno total de <i>B. ayerbei</i> (10µg/mL) sobre el flujo urinario y la ritmo de filtración glomerular.	53
Figura 14. Efecto del veneno total de <i>B. ayerbei</i> (10µg/mL) sobre los porcentajes del transporte tubular de sodio y cloro.	53
Figura15 Evaluación histológica del grupo control riñón izquierdo, en la frontera de la zona medular cortical. Áreas de congestión, hemorragias y glomérulos intactos (a). (n=5, coloración de hematoxilina-eosina aumento 100x).	60
Figura 16. Análisis histológico de los grupos tratados por el veneno de <i>B. ayerbei</i> el cual mostró dilatación del espacio de Bowman y necrosis tubular aguda. (n=5, coloración de hematoxilina-eosina aumento 100x).	60
Figura 17. Análisis histológico de los grupos tratados con el veneno de <i>B. ayerbei</i> el cual mostró degeneración vacuolar hidrópica, presencia de hemorragias y grasa perirrenal.	61
Figura 18. Evaluación de los efectos de dosis subletales del veneno de <i>B. ayerbei</i> en ratones, obteniendo un aumento significativo en la dosis subletal de 75%.	63

Figura 19. Efecto citotóxico del veneno total de *B. ayerbeii* (200; 100; 50; 25; 12,5 y 6,25 $\mu\text{g}/\text{mL}$) sobre células MDCK, por el método de MTT después de 6h. 66

Figura 20. Efecto citotóxico del veneno total de *B. ayerbeii* (200; 100; 50; 25; 12,5 y 6,25 $\mu\text{g}/\text{mL}$) sobre células MDCK, por el método de MTT después de 12h. 66

Figura 21. Efecto citotóxico del veneno total de *B. ayerbeii* (200; 100; 50; 25; 12,5 y 6,25 $\mu\text{g}/\text{mL}$) sobre células MDCK, por el método de MTT después de 24h. 67

Figura 22. Comparación del efecto citotóxico del veneno total de *B. ayerbeii* (200; 100; 50; 25; 12,5 y 6,25 $\mu\text{g}/\text{mL}$) sobre células MDCK, por el método de MTT después de 6, 12 y 24 horas. 67

LISTA DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Clasificación clínica del Accidente Bothrópico.	23
Tabla 2. Parámetros de función renal (símbolos, unidades de medida y formas de cálculo empleando fórmulas).	43
Tabla 3. Efecto del veneno total de <i>B. ayerbeii</i> (10µg/mL) sobre la presión de perfusión (PP), resistencia vascular renal (RVR), flujo urinario (FU), ritmo de filtración glomerular (RFG), y el transporte de Na ⁺ , K ⁺ y Cl ⁻ (%TNa ⁺ , %TK ⁺ , %TCl ⁻).	54
Tabla 4. Análisis histológico de 5 animales experimentales. Tabla de las alteraciones encontradas en los riñones.	59
Tabla 5. Resultado estadístico del efecto de dosis subletales del veneno de <i>B. ayerbeii</i> en ratones.	63
Tabla 6. Efecto del veneno total de <i>B. ayerbeii</i> sobre la viabilidad de las células tubulares renales en diferentes concentraciones a las 6, 12 y 24h.	68

RESUMEN

El envenenamiento por serpientes del género *Bothrops* conduce a alteraciones sistémicas que pueden llevar a la muerte del paciente. Una de estas alteraciones es la insuficiencia renal aguda (IRA). Este trabajo tiene como objetivo evaluar las alteraciones renales producidas por el veneno de la serpiente *B. ayerbeii* (10µg/mL), mediante un sistema de riñón aislado de rata, y determinar el grado de citotoxicidad en células MDCK al utilizar diferentes concentraciones. Todos los parámetros fueron analizados por ANOVA de un factor con el test de Bonferroni, obteniendo como resultado una disminución significativa en la presión de perfusión (PP), la resistencia vascular renal (RVR) y el transporte de Cl⁻ y Na⁺ (%TNa⁺, %TCl⁻) con un aumento en el flujo urinario (FU) y el ritmo de filtración glomerular (RFG), sin cambios en el transporte de K⁺ (%TK⁺). Para determinar el grado de citotoxicidad se midió la viabilidad celular mediante el método de reducción de MTT encontrándose una disminución de la viabilidad celular en todas las concentraciones comparadas con el grupo control. Por lo que se concluye que el veneno de la serpiente *B. ayerbeii* tiene un efecto nefrotóxico directo.

INTRODUCCIÓN

La herpetofauna Colombiana no solamente es muy abundante sino también muy diversificada. En el mundo existen aproximadamente 3.000 especies, de las cuales 272 se hallan en Colombia (Castrillón *et al.*, 2007), debido a esto se encuentra un reporte hecho por el Sistema de Vigilancia Epidemiológica SIVIGILA del Instituto Nacional de Salud (INS) hasta la semana epidemiológica 52 del 2012, un total de 5143 casos de accidentes ofídicos (Paredes, 2012a).

La gravedad del envenenamiento depende en gran parte de la toxicidad de los compuestos del veneno de la serpiente y su relación con el hábitat (Palacios y Zarta, 2009); Los venenos de las serpientes que pertenecen a la familia Viperidæ, están químicamente compuestos de una gran cantidad de constituyentes orgánicos (proteínas y muchos tipos de enzimas) (Klauber *et al.*, 1972); lo que puede llegar a producir varios trastornos clínicos. Una de las complicaciones mas graves en las víctimas por envenenamiento Bothrópico, son las lesiones renales, que pueden ocurrir por acción directa sobre el endotelio vascular renal por parte de las metaloproteinasas (antiguamente llamadas hemorraginas) (Fox y Serrano, 2005) o por efecto de otras acciones, como la coagulante, o debido a la formación de microtrombos capaces de provocar isquemia renal por obstrucción de la microcirculación, propia de la coagulación intravascular diseminada, que puede resultar en necrosis tubular aguda (Manrique, 2000).

La patogenia de las alteraciones renales producidas después del envenenamiento por el género *Bothrops* no está muy bien definida, por lo que es importante llevar a cabo un estudio sobre los efectos renales que pueden producirse después de una mordedura por serpientes de este género.

En el Hospital Universitario “San José” de Popayán (Cauca) se han registrado desde el año 2000 hasta el 2008, 365 accidentes ofídicos, y la gran mayoría de estos envenenamientos fueron causados por la serpiente *Bothrops ayerbe*, con un total de 165 accidentes (43.2%) (Ayerbe y Latorre, 2010). Por lo anterior, este estudio pretende evaluar los efectos renales del veneno de la serpiente *B. ayerbe*, en riñón aislado de rata Wistar, ratón albino suizo y células MDCK (Madin Darby Canine Kidney). Con el fin de elucidar los mecanismos por los cuales se presentan alteraciones renales después del envenenamiento Bothrópico.

1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En Colombia la frecuencia y la severidad en el accidente ofídico fueron condiciones esenciales para ser clasificado de interés en salud pública, debido a esto se ha venido presentado un incremento anual en el reporte de este evento por el SIVIGILA, (Paredes, 2012b) cifra que puede aumentar por factores como el curanderismo y la medicina tradicional que no reportan los casos, así mismo se sostiene que estos accidentes para Colombia tienen una letalidad de 0,96% y una mortalidad de 0,84% por cada 1.000.000 habitantes dato reportado en el año 2010 (López y Valera, 2011).

Para el Departamento del Cauca se reporta un mayor grado de accidentalidad por ser una región con mayor variedad de serpientes (80% de las especies nacionales) (Ayerbe y Latorre, 2010), en donde la familia de ofidios que reporta mayor incidencia es la familia Viperidæ (89%); el género con mayor número de mordeduras es *Bothrops* (77%) y la especie más comprometida es *Bothrops ayerbei* (Ayerbe y Latorre, 2010). Una de las problemáticas por envenenamiento ofídico y más exactamente por el envenenamiento Bothrópico es el manejo inapropiado del cuadro clínico en el cual se pueden presentar complicaciones que conllevan a la muerte del paciente, siendo una de las principales causas la presencia de hemorragias intracerebrales y la falla renal aguda (Restrepo y Peña, 2007).

Por ello surgen preguntas importantes como: ¿cuáles podrían ser las alteraciones fisiológicas e histológicas en riñón aislado de rata Wistar y ratón albino suizo producidas por el veneno de *B. ayerbei*?, así como también, ¿cuál sería el grado de citotoxicidad que puede presentar el veneno de *B. ayerbei* en células MDCK?

2. JUSTIFICACIÓN

El envenenamiento ofídico, es una condición prevalente relacionada con actividades de campo en regiones tropicales, por lo que se presentan altas cifras de accidentalidad en Colombia. Como consecuencia de la mordedura de serpiente, se produce en el paciente un síndrome de envenenamiento denominado ofidismo, que puede ser clasificado en tres grados: leve, moderado y grave. Siendo el envenenamiento grave un riesgo de muerte o de secuelas, debido a la sintomatología clínica en la cual se presenta sangre incoagulable, necrosis o hinchazón local que se puede extender más allá de la extremidad mordida, hemorragia local y sistémica, e/o hipotensión o insuficiencia renal (Otero *et al.*, 2002).

Debido a los efectos renales reportados en el envenenamiento grave, es necesario llevar a cabo estudios para contribuir al diagnóstico y tratamiento adecuado de esta complicación, varias investigaciones ya se han realizado en serpientes del género *Bothrops* (Barbosa *et al.*, 2002; Martins *et al.*, 2005; Evangelista *et al.*, 2010), y para Colombia se reportan estudios de aspectos clínicos por ofidismo (Enríquez *et al.*, 1993; Ayerbe, 1998; Ayerbe, 2000). Teniendo en cuenta que en los casos de envenenamiento influyen algunos factores externos tales como: clima, altitud, humedad, tipo de presas disponibles, y algunos otros factores internos como: sexo, edad, ciclo hormonal, nutrición y estado de salud (Palacios y Zarta, 2009) se hace necesario realizar pruebas en cada especie.

La especie *B. ayerbei* recientemente reportada para el suroccidente de Colombia anteriormente se consideraba como *B. asper* y luego como *B. cf. asper* sp 1. Por lo que hasta antes del año 2010 no se cuenta con información específica sobre la

capacidad de lesión renal ni el grado de citotoxicidad que pudiera presentar, como consecuencia de esto es pertinente realizar una evaluación de los efectos renales inducidos por el veneno de esta serpiente en ratas Wistar, ratón albino suizo y células MDCK, con el fin de contribuir al buen manejo clínico en el tratamiento del envenenamiento ofídico, y aportar al conocimiento biológico de la especie respecto a las propiedades de su veneno y sus posibles aplicaciones en el campo de la farmacología.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GENERAL

Evaluar los efectos renales inducidos por el veneno de *Bothrops ayerbeii* en ratas Wistar y ratón albino suizo, así como el grado de citotoxicidad en células MDCK.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Identificar los efectos renales causados por el veneno de la serpiente *B. ayerbeii* en riñón aislado de ratas *Rattus norvergicus* de la cepa Wistar.

Reconocer los efectos renales causados por el veneno de *B. ayerbeii* en ratón albino suizo utilizando jaulas metabólicas.

Observar las alteraciones histológicas renales, causadas por el veneno de *B. ayerbeii* en ratas Wistar.

Determinar los efectos del veneno *B. ayerbeii* en la viabilidad de las células tubulares renales (MDCK).

4. MARCO TEÓRICO

Las serpientes pertenecen a la clase Reptilia, orden Squamata, suborden Serpentes y están agrupadas junto con las lagartijas (Lacertilia) y los llamados lagartos de aspecto vermiforme (Amphisbænia) (Ayerbe y Latorre, 2010).

En Colombia, por su diversidad de fauna se han identificado aproximadamente ocho familias, 71 géneros y 272 especies, de las cuales 49 son venenosas y pertenecen a dos familias y nueve géneros (Paredes, 2012b). Los principales géneros que afectan a los humanos son *Bothrops* y *Lachesis* los cuales hacen parte de la familia Viperidæ, subfamilia Crotalinæ; esta subfamilia se caracteriza por tener rasgos anatómicos importantes lo que permite su identificación como son: la presencia de fosa termo-receptora entre el ojo y las fosas nasales, cabeza bien delimitada del resto del cuerpo, generalmente de forma triangular o acorazonada, en la región dorsal existen varias hileras de escamas carenadas, el ojo es pequeño, la pupila es elíptica y vertical, presentan dentición de tipo solenoglifo, poseen el aparato venenoso mejor desarrollado y por lo tanto son las mayores productoras de veneno. Su cuerpo en la parte distal se adelgaza para dar lugar a la cola, que es de escasa longitud con relación al cuerpo, es gruesa y termina en punta a veces rematada por una pequeña terminación córnea en forma de uña (*Bothrops*) o en un espolón (*Lachesis*) (Ayerbe, 2007).

4.1 CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS, HÁBITAT Y COMPORTAMIENTO DE *Bothrops ayerbei*

Entre las serpientes del género *Bothrops* encontramos, la especie *Bothrops ayerbei* (figura 1) que se diferencia por ser más alargada que *B. rhombatus* y algo menos robusta que *B. asper* con un diseño supracefálico muy notorio en ambos sexos. En su forma adulta, es una serpiente grande con un dorso que consta de una matriz de 14 a 19 figuras triangulares oscuras (negro) en forma de equis, mariposas o corbatines con la característica de que algunas de las equis están divididas, es decir, no son equis perfectas, pues a lo largo del cuerpo algunas se separan por la parte central superior, quedando una mitad de la equis en cada uno de los lados (derecho e izquierdo); en ocasiones se tocan las dos mitades y en ocasiones están separadas por unas cuantas escamas a lo largo del cuerpo; presentando bordes claros (crema) (Folleco, 2010).



Figura 1. *Bothrops ayerbei* con su coloración gris (Ayerbe y Latorre, 2010).

En cuanto a su distribución geográfica, la especie *Bothrops ayerbei* ó equis del Patía, se encuentra al sur del río Cauca, desde la margen sur del divorcio de aguas de los ríos Cauca y Patía, en los municipios de Popayán, Timbío y el sudeste de el Tambo hacia la cuenca del río Patía incluido el Norte de Nariño (Folleco, 2010).

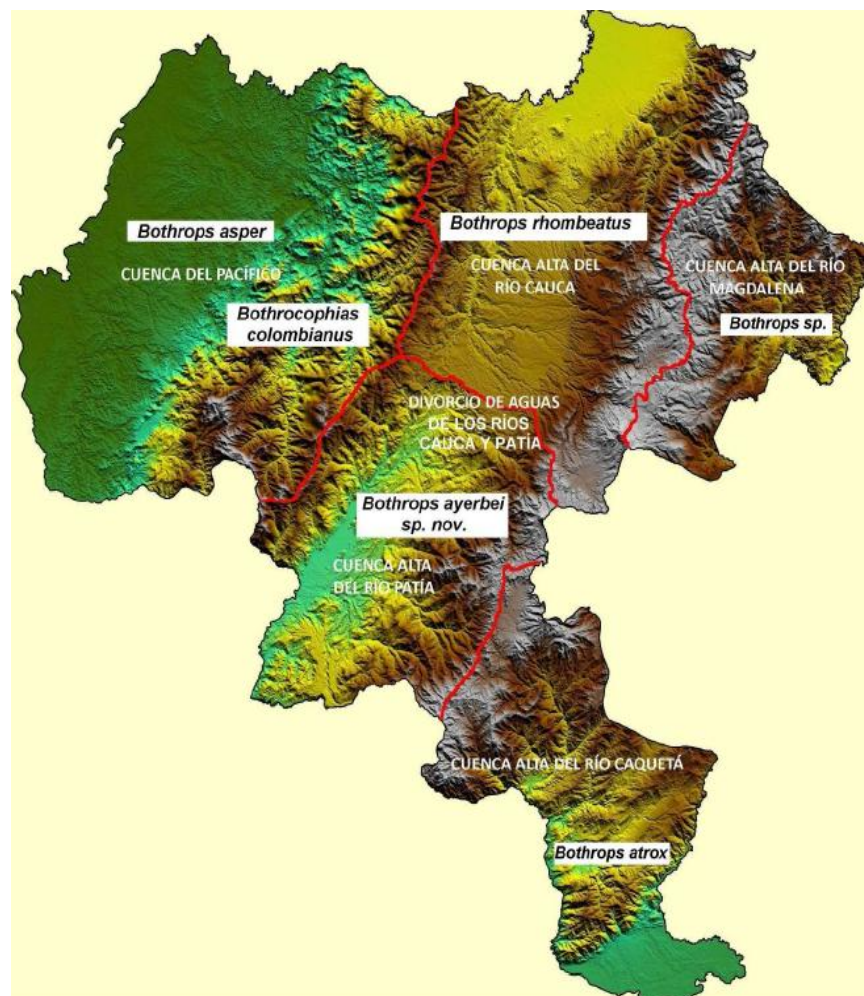


Figura 2. Distribución de *Bothrops ayerbei*, *B. asper*, *B. atrox*, *B. rhombeatus* y *Bothrocophias colombianus* en el Departamento del Cauca (Folleco, 2010).

4.2 ASPECTOS DEL ENVENENAMIENTO BOTHRÓPICO

El envenenamiento Bothrópico se clasifica a nivel clínico en leve, moderado y grave, y a su vez cada uno de ellos en local o sistémico, y el tratamiento se realiza con base en la clasificación de mayor severidad (Tabla 1).

Tabla 1. Clasificación clínica del Accidente Bothrópico (Castrillón *et al.*, 2007; Ayerbe, 2007).

CLASIFICACIÓN	LOCAL	SISTÉMICO	PARACLÍNICOS
AUSENTE	No hay signos locales ni sistémicos de envenenamiento después de seis horas del accidente (Mordedura “en seco” es decir sin inoculación de veneno).		NORMALES
LEVE	Edema que compromete un solo segmento; eritema perilesional, dolor local mínimo sin otros cambios en 6 horas.	No hay sangrado No hay compromiso hemodinámico No hay complicaciones	NORMALES
MODERADO	Edema que compromete dos segmentos; sangrado local escaso, flictenas, Equimosis y/o petequias localizadas con dolor tolerable.	Gingivorragia No hay compromiso hemodinámico moderado.	Fibrinógeno: 100-200 mg/dl; TC: >20 minutos; TP, TPT prolongados 1 ó 2 veces lo normal, Trombocitopenia (plaquetas entre 100.000 y 150.000) Hematuria microscópica.
SEVERO	Edema que compromete tres segmentos e incluso tronco; equimosis a distancia, sangrado severo. Absceso del área ofendida.	Sangrado severo por sitio diferente al área lesionada Compromiso hemodinámico Presencia de complicaciones como coagulación intravascular diseminada, insuficiencia renal aguda, sangrado del SNC	Fibrinógeno: 50-99 mg/dl; TC: >20 minutos Trombocitopenia (plaquetas < 100.000) TP, TTP prolongados 2 a 3 veces lo normal, hematuria franca, alteración progresiva de las pruebas de función renal.

En los casos severos de envenenamiento Bothrópico, a pesar de un impresionante edema hemorrágico, la característica más notoria es la condición de sangrado, ya sea local o sistémico, seguida de una necrosis importante del miembro mordido con extensa pérdida de tejidos blandos. Flictenas conteniendo un líquido seroso y hemorrágico son muy comunes, así como también extensas áreas equimóticas. Los síntomas iniciales se caracterizan por un dolor quemante inmediato, seguido del edema hemorrágico, hay sangrado por las heridas efectuadas por los colmillos, así como por encías, tracto digestivo, respiratorio y por el sistema urinario. Las alteraciones en las características de la coagulación de sangre también son comunes, aún en casos de poca severidad (Bolaños, 1982).

4.3 CARACTERÍSTICAS BIOQUÍMICAS DEL VENENO

Los venenos de las serpientes son una salivación especializada, que varía su composición de acuerdo con la especie; están compuestos principalmente por proteínas tóxicas y no tóxicas, y algunas con actividad enzimática que constituyen entre el 90 al 95% del peso seco y en muy bajo porcentaje por compuestos no proteicos como carbohidratos, nucleótidos, lípidos, iones como Na^+ , K^+ , Co^{++} , Zn^{++} , Ca^{++} , Mg^{++} , detritus celulares y bacterias (Patiño y Stella, 2002).

Esta secreción viscosa posee una coloración amarilla de gran complejidad química que puede poseer hasta 30 fracciones diferentes, entre proteínas o péptidos con actividad enzimática o farmacológica; aminoácidos libres; ácidos orgánicos; azúcares como glucosa, manosa y galactosa; aminos biógenas como acetilcolina, histamina, serotonina; ácidos grasos; agua, detritus celulares, iones como sodio, calcio y zinc; hialuronidasa, enzima que facilita la difusión del veneno a los tejidos;

riboflavina y L-aminoácido-oxidasa responsables del color amarillo del veneno y de las propiedades antibacterianas respectivamente (Palacios y Zarta, 2009).

4.4 FISIOLÓGÍA RENAL

Los riñones efectúan una gran variedad de funciones para el cuerpo la mayor parte de las cuales son esenciales para la vida. Entre estas funciones encontramos la excreción de productos metabólicos, la regulación del equilibrio hídrico y electrolítico, la regulación de la presión arterial, y el equilibrio ácido-básico así como también la secreción, metabolismo y excreción de hormonas (Guyton y Hall, 2006).

Anatómicamente los dos riñones se encuentran fuera de la cavidad peritoneal en contacto estrecho con la pared abdominal posterior, uno a cada lado de la columna vertebral, cuando se realiza un corte de arriba abajo, las dos regiones principales que se pueden ver son la corteza externa y la región interna denominada médula. La médula se divide en múltiples masas de tejidos en forma de cono llamadas pirámides renales. La base de cada pirámide se origina en el borde entre la corteza y la médula y termina en la papila, que se proyecta en el espacio de la pelvis renal, una continuación en forma de abanico de la porción superior del uréter. El borde externo de la pelvis se divide en bolsas abiertas, llamadas cálices mayores, que se extienden hacia abajo y se dividen en los cálices menores, que recogen la orina de los túbulos de cada papila (figura 3). Las paredes de los cálices, pelvis y el uréter contienen elementos contráctiles que empujan la orina hacia la vejiga, donde se almacena hasta que se expulsa en la micción (Guyton y Hall, 2006).

El riñón se encuentra compuesto por varias unidades funcionales llamadas nefronas, las cuales son las encargadas de la generación de orina, cada nefrona contiene un penacho de capilares glomerulares llamado glomérulo, por el que se filtran grandes cantidades de líquido desde la sangre y un túbulo largo en el que el líquido filtrado se convierte en orina (figura 3) (Guyton y Hall, 2006).

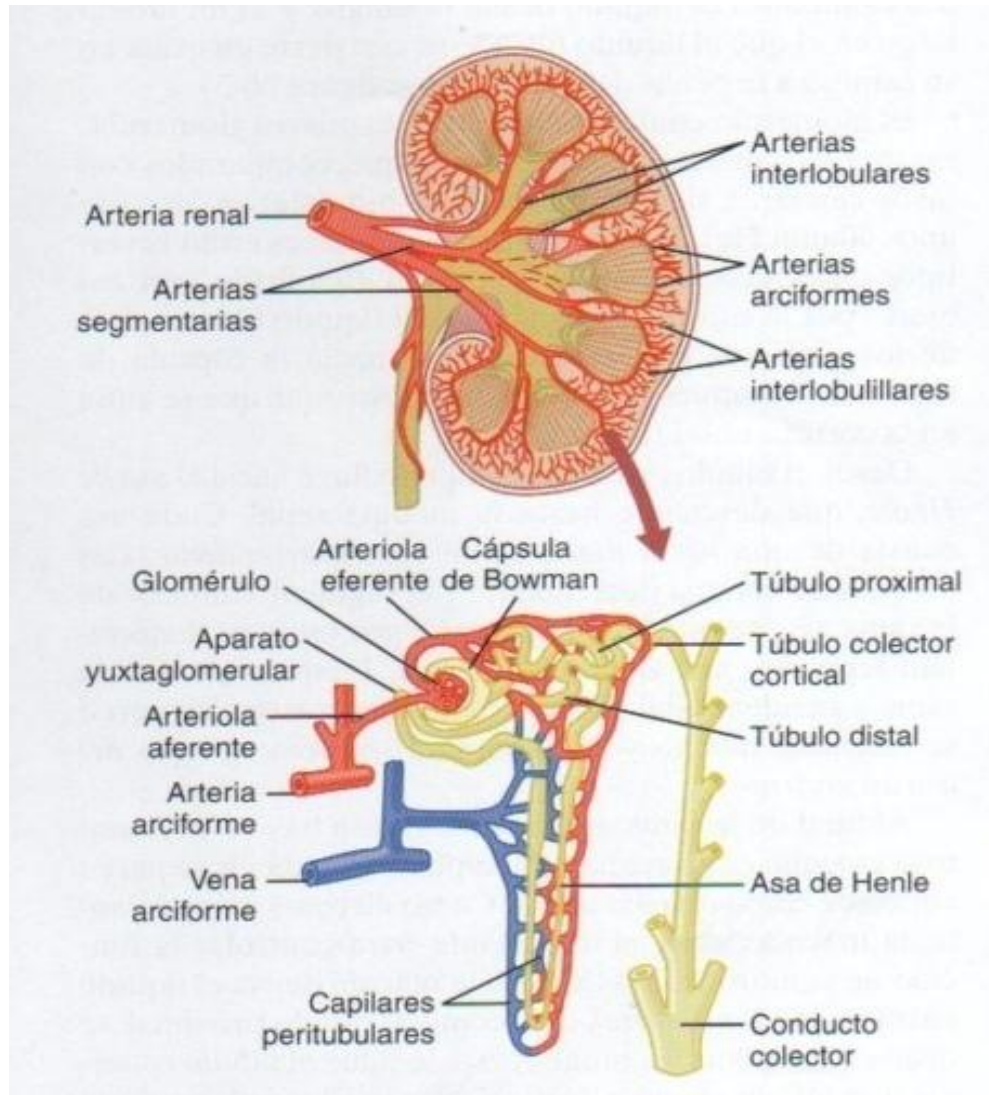


Figura 3. Sección de riñón humano que muestra los principales vasos que aportan el riego sanguíneo al riñón. Esquema de la microcirculación de cada nefrona (Guyton y Hall, 2006).

4.5 INSUFICIENCIA RENAL AGUDA (IRA)

Una de las características del envenenamiento Bothrópico, es que puede causar alteraciones en toda la estructura del riñón, llevando a glomerulonefritis, glomerulitis, nefritis intersticial, arteritis, necrosis tubular, necrosis cortical e insuficiencia renal (Perdigão, 2011).

La insuficiencia renal aguda (IRA) es la complicación más grave del envenenamiento por *Bothrops* en humanos. Todas las estructuras renales pueden estar implicadas, aunque, la necrosis tubular aguda (NTA), es la causa más común de IRA. La patogénesis de la NTA en envenenamiento por mordedura de serpiente puede estar relacionada con trastornos hemodinámicos, reacciones inmunológicas y nefrotoxicidad directa, aunque la evidencia de este último factor aún no está comprobada (Castro *et al.*, 2004).

Muchos factores han sido implicados en la patogénesis de la IRA, inducidos por el veneno de algunas especies representativas del género *Bothrops*, se sabe que causan lesiones degenerativas en las células del epitelio tubular, con la coagulación glomerular y necrosis tubular aguda. Algunos efectos evaluados en *B. jararaca*, reportan que la nefrotoxicidad en ratas se produce por acción directa, lo que conduce a anomalías glomerulares y tubulares, que son independientes de cualquier interferencia sistémica o hemodinámica que podría generar daño tubular. Sin embargo las manifestaciones sistémicas tales como la hemorragia y la inestabilidad hemodinámica pueden ocurrir con la coagulación generalizada vascular. Depósitos intraglomerulares de fibrina contribuyen al desarrollo de una necrosis tubular aguda, a través de la interrupción del suministro de sangre a los

túbulos. Además el veneno de *Bothrops* genera vasoconstricción renal, lo que aumenta el estado de isquemia de los riñones (Barone *et al.*, 2011).

4.6 INULINA Y CREATININA

La inulina es un polisacárido con un peso molecular de 5200 daltons que no posee una carga eléctrica, lo cual hace que pueda filtrarse libremente por el capilar glomerular, además no se liga a proteínas plasmáticas y no es secretada o reabsorbida por los túbulos renales; por lo anterior, es una sustancia ideal para la medición de la filtración glomerular FG mediante su aclaramiento. Es considerado como un marcador verdadero en condiciones de la FG normal o reducido (Maldonado *et al.*, 1993).

La creatinina es un catión de bajo peso molecular (113 daltons), fisiológicamente inerte que se distribuye a través del espacio de agua corporal total, no se liga a proteínas plasmáticas, y se filtra libremente a través del capilar glomerular. La creatinina se produce endógenamente, ya que es el producto de degradación por hidrólisis no enzimática de la creatina. Compuesto que almacena la energía en el músculo. La concentración sérica de creatinina se mide en la mayoría de los laboratorios usando un método colorimétrico basado en una reacción química en la cual la creatinina reacciona con ácido pícrico. Esta se conoce como la reacción de Jaffé (Maldonado *et al.*, 1993).

4.7 ALTERACIONES CELULARES DESARROLLADAS EN LA INSUFICIENCIA RENAL AGUDA

Diferentes patrones de muerte celular pueden estar involucrados en el proceso de citotoxicidad inducida por los venenos. Los acontecimientos citotóxicos de esas sustancias son de gran importancia para el entendimiento de la fisiopatología de los accidentes ofídicos y de sus complicaciones sistémicas, una elucidación de esos mecanismos, permite la interferencia en algunos puntos de vía de señalización y elucidan el desenvolvimiento de fármacos y estrategias terapéuticas más eficaces (Perdigão, 2011).

Muchos factores están involucrados en el desarrollo de la IRA, inducida por el veneno de serpientes en respuesta a accidentes ofídicos. Estos factores podrían ser causados por una serie de lesiones específicas que ocurren a nivel celular. Después de la lesión renal inicial, el riñón desarrolla una respuesta molecular que determina el destino de la célula. Cuatro destinos celulares son identificados en la IRA: las células pueden sufrir necrosis; apoptosis; división celular; o comportarse indiferente al estrés (Perdigão, 2011).

5. ANTECEDENTES

Varios estudios sobre los efectos renales causados por *Bothrops* se han llevado a cabo en Latinoamérica, uno de ellos fue realizado por Barbosa *et al.*, 2002, en donde se analizó la toxicidad renal de la serpiente *B. moojeni* y sus principales miotoxinas observándose intensas alteraciones en la fisiología renal, incluyendo una caída en el RVR asociado con diuresis, natriuresis y kaliuresis, y su miotoxinas Bmtx-I promovió efectos similares a los del veneno total.

Otro trabajo realizado por Barbosa *et al.*, 2005, evalúa la actividad renal del veneno de *B. jararacussu* y dos miotoxinas I (BthTx-I; Lys 49) y II (BthTX-II; Asp 49), y su bloqueo por indometacina, concluyendo que la miotoxinas BthTx-I y II causan alteraciones renales y que la indometacina es capaz de antagonizar completamente los efectos renales inducidos por las dos miotoxinas, lo que sugiere la participación de mediadores inflamatorios en los efectos renales, por otro lado estos efectos también pudieron ser dados por la actividad enzimática de las miotoxinas.

Braga *et al.*, 2006b purificó y evaluó la actividad biológica de la trombina como sustancia aislada del veneno de *B. insularis* lo que produjo un aumento en la secreción de insulina y alteración de los parámetros vasculares, glomerulares y tubulares del riñón aislado de rata, síntomas que podrían ser causados por agentes vaso activos liberados en respuesta a los efectos de la trombina.

Otro trabajo realizado por Braga *et al.*, 2006a aisló una isoforma de lectina tipo C de *B. insularis* por procedimientos cromatográficos e investigó sus efectos en

riñón aislado de rata, obteniendo como resultado la alteración de todos los parámetros evaluados que podrían reflejar una lesión directa en el glomérulo y las células tubulares renales, con un aumento en la permeabilidad en las células endoteliales glomerulares. Además se presentó depósito de proteínas en el espacio de Bowman que podría ser el efecto de la interacción de la lectina tipo C con células endoteliales o debido a la liberación de otros mediadores por las células mesangiales, tubulares y endoteliales.

En otro estudio realizado en riñón de rata aislado por Braga *et al.*, 2008 evaluó los efectos renales de la fosfolipasa A₂ (PLA₂) del veneno de *B. insularis* obteniendo como resultado la alteración de todos los parámetros renales evaluados y se sugirió que podría ser dado por los efectos miotóxicos de la PLA₂.

Más recientemente Evangelista *et al.*, 2010 identificó los efectos renales y cardiovasculares del veneno de *Bothrops marajoensis* y la PLA₂ encontrando que tanto el veneno como la PLA₂ producen hipertensión y bradicardia con un bloqueo en la conducción eléctrica en el corazón. Y en el riñón se reportó una disminución en el transporte de electrolitos causados por la acción de la PLA₂, y alteraciones del flujo urinario y la tasa de filtración glomerular causadas por el veneno total, el cual se produce por un mecanismo aun desconocido.

Otro trabajo reciente realizado por Linardi *et al.*, 2011, estudió las alteraciones renales morfológicas y funcionales causado por el veneno de *B. alternatus* en ratas y los cambios de la expresión y actividad del ATPasa Na⁺ / K⁺, obteniendo como resultados cambios morfológicos y funcionales significativos en el tejido renal de ratas con una mejora en la actividad y expresión de la ATPasa Na⁺ / K⁺.

Este aumento de ATPasa Na^+ / K^+ puede atenuar la disfunción renal durante el daño inducido por el veneno.

Hacia el 2011 Perdigão, evaluó los efectos de la serpiente *Bothropoides insularis* y su fracción PLA_2 sobre células tubulares renales, con el fin de observar los mecanismos de nefrotoxicidad, en este proceso se observó que el veneno de *B. insularis*, ejerció un efecto citotóxico en cultivo de células tubulares renales MDCK, y se demostró que la citotoxicidad está relacionada posiblemente con el mecanismo de muerte por apoptosis de forma dependiente a la concentración.

Para Colombia no se han descrito reportes directos de los efectos renales, sin embargo se encuentra en Pineda *et al.*, 2002, las características clínicas causadas por el accidente ofídico, reportado en las regiones de Yopal y Leticia.

Actualmente no se han encontrado reportes de los efectos renales del veneno de la serpiente *B. ayerbeii*, únicamente estudios de su caracterización, y su biología general.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Tipo de estudio

Este tipo de estudio es experimental en el cual se llevó a cabo tres metodologías: el primero consistió en un sistema *ex – vivo* sin interrupción de flujo en riñón aislado de ratas *Rattus norvegicus* cepa Wistar, al cual se le aplicó una dosis total (10µg/mL) del veneno de *B. ayerbei*, con recogimiento de muestras fisiológicas e histológicas y observación de los mecanismos de acción. El segundo estudio se realizó en un sistema *in-situ* con ratones *Mus musculus* utilizando jaulas metabólicas, con recogimiento de muestra de sangre. En el tercer estudio se utilizaron células renales de perro MDCK y se observó la viabilidad de estas células al aplicar diferentes concentraciones del veneno total de *B. ayerbei*.

6.2 Animales experimentales

Se utilizaron ratas Wistar machos, en estado adulto con un peso de entre 260 y 300g, Además se utilizaron ratones Albino Suizo *Mus musculus*, con un peso de entre 20 y 25g; ubicados en el Bioterio del Departamento de Fisiología y Farmacología de la Universidad Federal del Ceará (Brasil).

Las serpientes *Bothrops ayerbei* se mantuvieron en terrarios de vidrio rotulados, en el Centro de Investigaciones Biomédicas de la Universidad del Cauca CIBUC, con alimentación de ratones y agua *ad libitum*.

6.3 Técnicas de trabajo

6.3.1 Perfusión de riñón aislado.

- Grupos experimentales.

Para evaluar los efectos del veneno se utilizó un grupo de 5 animales.

En el grupo control los riñones fueron perfundidos con solución de Krebs-Henseleit modificado con 6g% de albumina bovina, y en el grupo de experimentación los riñones se perfundieron con solución de Krebs-Henseleit modificado con 6g% de albumina bovina, y se añadió el veneno total de *B. ayerbeii* (10 µg / mL) 30 minutos después del tiempo 0 de perfusión.

- Sistema a utilizar

El sistema que se manejó fue un sistema de perfusión de riñón aislado con recirculación (Fonteles *et al.*, 1983), con dos subsistemas uno *in situ* y otro *in vitro*, ambos mantenidos a una temperatura de 37°C. Este sistema presenta una ventaja porque mantiene constantes los parámetros de la función renal (Figura 4).

➤ Componentes del sistema de perfusión

- Condensador: Sirve como depósito para la solución perfusora.
- Colector de orina: Frasco que recibe la orina desde el riñón a intervalos de 10 min.
- Jeringa graduada: Recoge muestras del perfundido a intervalos de 10 minutos
- Bomba de perfusión (Watson): Mantiene el flujo de la perfusión renal.
- Filtro (USA-Millipore-5 μ m): Promueve una mejor perfusión a través de la filtración constante de la solución.
- Oxigenado (pulmón artificial): Es donde se produce el intercambio de gases (O_2 al 95% y 5% CO_2) que consiste en la utilización de tubos silastic.
- Baño María (Fanem-modelo 100): Mantiene la temperatura entre 36 y 37 °C y el funcionamiento del pulmón constante.
- Fluxómetro: Permite leer el flujo de la perfusión durante el experimento.
- Captabolas: Cámara que retiene las burbujas y previene la embolia del órgano.
- Manómetro de mercurio: Permite la lectura directa de la presión de perfusión

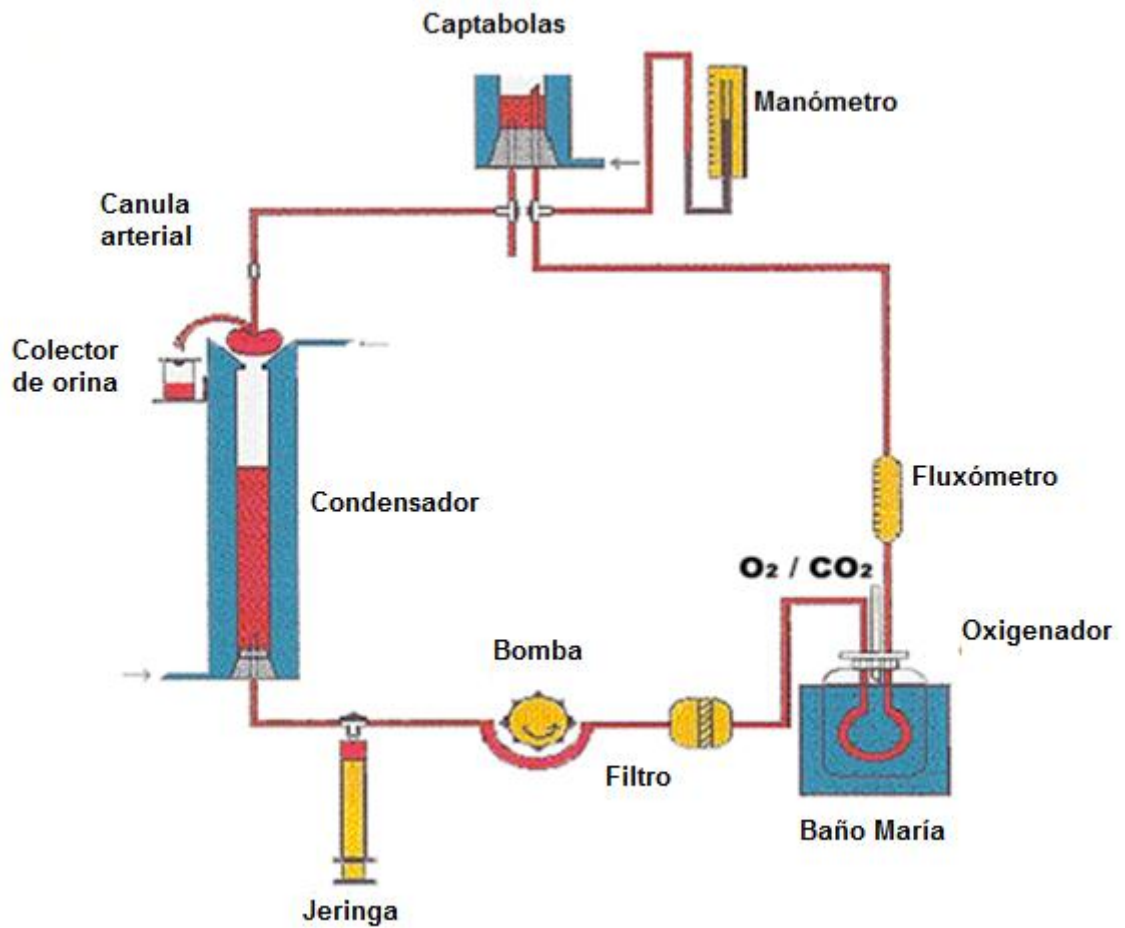


Figura 4. Sistema de perfusión renal (Sousa, 2004).

➤ Calibración del sistema

Antes del inicio experimental el sistema fue calibrado, evaluando en cada una de las bombas la presión de perfusión (PP) en mmHg, el fluxómetro en L/h y el volumen de la orina colectado en mL/min (Figura 5, 6,7).

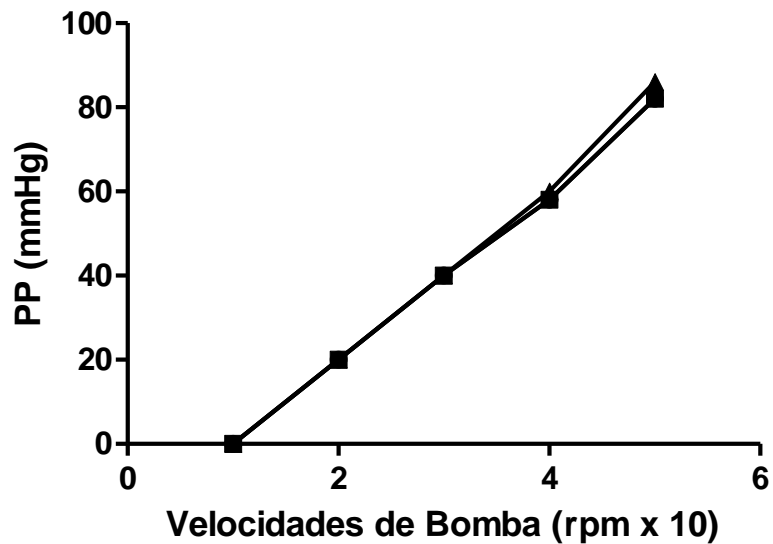


Figura 5. Valores de presión de perfusión (PP), registrados durante la calibración del sistema por cinco velocidades de la bomba de perfusión.

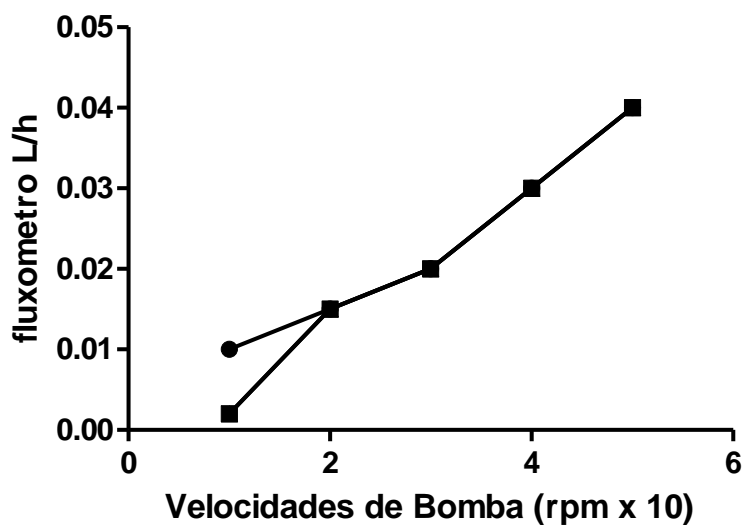


Figura 6. Valores del fluxómetro, registrados durante la calibración del sistema por cinco velocidades de la bomba de perfusión.

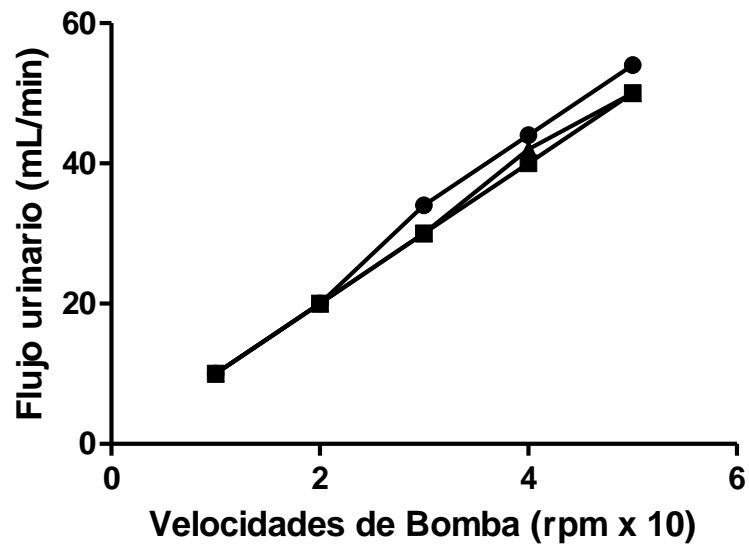


Figura 7. Valores del volumen urinario, registrados durante la calibración del sistema por cinco velocidades de la bomba de perfusión.

➤ Preparación del sistema

Antes de cada protocolo de experimentación, el sistema fue lavado con detergente y agua destilada, después fue montado y calibrado. La calibración se llevó a cabo con el sistema en funcionamiento en presencia de 0,9% de solución salina, calentada a una temperatura entre 36-37 °C. Por cada unidad de la bomba de infusión (1, 2, 3, 4 y 5) se colectó solución salina durante un minuto en una probeta milimetrada (flujo en la punta de la cánula), y se anotaron las medidas del fluxómetro y la presión de perfusión a través del manómetro conectado al sistema. Para una mejor adaptación del sistema a las unidades de bombeo, se le establecieron 3 minutos de intervalo entre cada recolección.

La solución a empleada en los experimentos, es una modificación de Krebs-Henseleit asociado con 6 g% de albúmina bovina. Esta adicción a la solución fue desarrollada para mantener la función renal sin cambios durante la experimentación.

➤ Técnica quirúrgica.

Para la técnica quirúrgica las ratas cepa Wistar fueron pesadas y anestesiadas por vía intraperitoneal (IP) con pentobarbital sódico 50 mg / kg. A continuación, los animales fueron transportados a una mesa de disección en donde se les realizó una técnica quirúrgica siguiendo el método descrito por (Balhmann *et al.*, 1967; Nishiitsutji-Uwo *et al.*, 1967; Ross, 1978; Fonteles *et al.*, 1983), en el cual, la vena femoral izquierda, es aislada para la administración de 3 ml de manitol al 20% con el propósito de mejorar el acceso quirúrgico para el uréter (Figura 8).



Figura 8. Visualización de la arteria femoral y aplicación de manitol 20%.

Después de la limpieza de la pared abdominal con jabón y alcohol, se hizo una incisión sobre la base de la línea media y perpendicular a la primera dos incisiones para aumentar el campo quirúrgico. Con eso la cavidad abdominal, se expuso y las vísceras abdominales fueron puestas hacia el lado izquierdo para visualizar el riñón derecho, seguidamente se realizó la limpieza del tejido graso que se encuentra en exceso en esta área.

Inmediatamente después, el uréter derecho fue diseccionado del tejido aislado, el tejido conjuntivo y la grasa que lo rodeaba, para ser canulado a través de un tubo de polietileno (PE50), a una distancia de aproximadamente 3 cm del tallo renal a través de una pequeña incisión (Figura 9A). Con el fin de evitar la interferencia de la glándula fisiológica suprarrenal derecha en el experimento, esta fue identificada, aislada y cortada, luego se procedió a desencapsular el riñón. Después de completar estos procedimientos, se anuló la arteria renal, de la arteria mesentérica superior, y tras la identificación, con un pequeño corte en la tela se introdujo la cánula de 3-5 mm, y se fijo la cánula a la arteria (Figura 9B). Poco después, el riñón fue aislado con una pinza y se seccionó la porción de extirpación del riñón y del uréter, quedando así debidamente puesto en libertad. Terminado esto, el riñón fue acoplado al sistema y se esperó aproximadamente 20 minutos para la adaptación, después de tener el riñón derecho acoplado al sistema, se procedió a retirar el riñón izquierdo para comparación histológica.

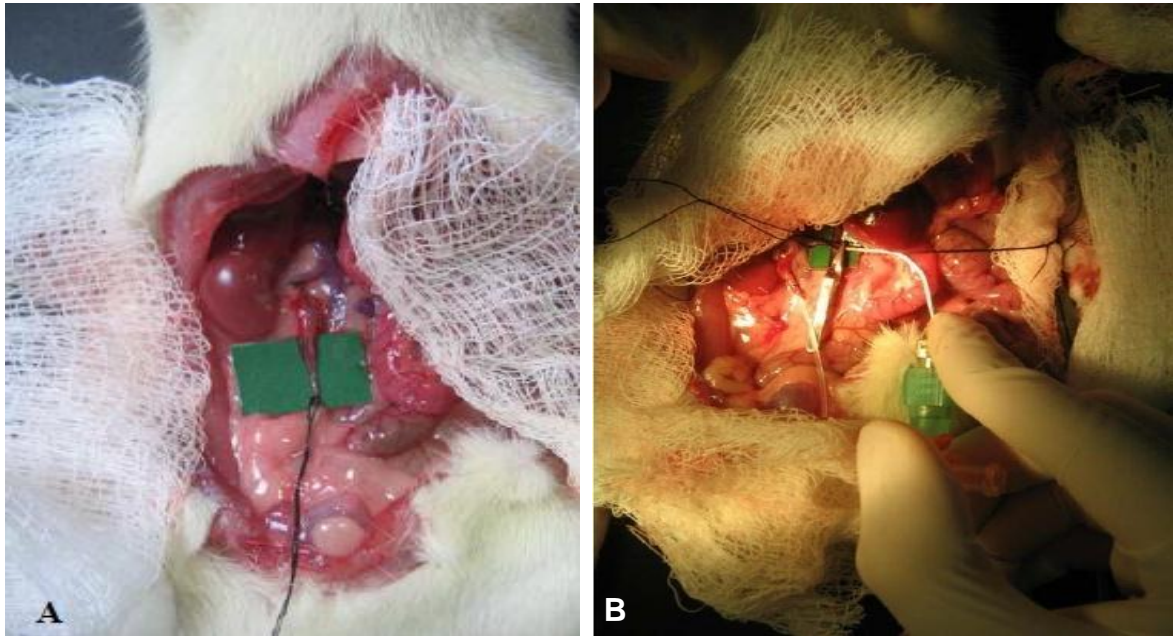


Figura 9. Visualización, identificación y canulación del uréter (A). Visualización y canulación de la arteria renal a través de la arteria mesentérica (B).

➤ Protocolo experimental.

Una vez el riñón fue colocado en el sistema, los primeros 20 minutos fueron considerados para la estabilización y la adaptación a las nuevas condiciones. Después de este período, se marcó el tiempo cero y se determinaron 30 minutos de control interno, al terminar este tiempo se administró el veneno total de *B. ayerbeii* (10 $\mu\text{g/ml}$). El tiempo total de infusión del órgano fue de 120 minutos. Durante este período, se anotaron cada 5 minutos las medidas del fluxómetro y la presión de perfusión. A intervalos de 10 minutos, de manera intercalada, se recogió la solución del perfundido en tubos de Eppendorf y la orina en botellas anteriormente pesadas, al recoger la muestra, estas botellas fueron pesadas nuevamente y se anotaron los datos, inmediatamente fueron almacenadas a -20°C

para análisis posteriores de potasio, sodio, cloro, inulina y osmolaridad, datos importantes en la determinación de los parámetros de la función renal.

➤ Análisis bioquímico e histológico.

Las pruebas bioquímicas se llevaron a cabo en la Unidad de Investigación Clínica de la Universidad Federal de Ceará. Se tomaron dosis de sodio, potasio y cloro por el método de iones selectivos (RapidChem 744 – Bayer® diagnostica). La inulina se midió a partir del mismo material, por hidrólisis directa y se realizó la lectura en un espectrofotómetro, siguiendo el protocolo descrito por Fonteles 1983. La osmolaridad de las muestras se medirá con un osmómetro (osmómetro de presión de vapor - WESCOR modelo 5100c).

Para las muestras histológicas el riñón perfundido (derecho) y no perfundido (izquierdo) fueron diseccionados longitudinalmente y envasados en frascos con formol al 10%, estas muestras fueron analizadas en el Laboratorio de Anatomía Patológica y Biopsia en el Departamento de Patología y Medicina Forense de la Universidad Federal de Ceará.

➤ Cálculos de parámetros renales

Las siguientes fórmulas se utilizaron para la determinación de los parámetros de la función renal (Tabla 2) (Martínez *et al.*, 1978).

Tabla 2. Parámetros de función renal (símbolos, unidades de medida y formas de cálculo empleando fórmulas).

1. FU (mL.g⁻¹.min⁻¹) = Flujo urinario
FU = (Peso del volumen urinario/ Peso del riñón izquierdo) x 10
2. PP = Presión de perfusión (mmHg)
PP = Análisis por el manómetro de mercurio
3. RFG (mL.g⁻¹.min⁻¹) = Ritmo de filtración glomerular
RFG = (DOU in / DOP in x FU) siendo DOU in = Densidad óptica de la inulina en la orina y DOP in = Densidad óptica de la inulina en el perfundido
4. FPR (mL.g⁻¹.min⁻¹) = Flujo de perfusión renal
FPR = Registrado cada 10 min/peso del riñón/ a intervalos de tiempo)
5. RVR (mmHg/mL.g⁻¹.min⁻¹) = Resistencia vascular renal
RVR = PP (mmHg) / FPR
6. FNa⁺ = (μEq.g⁻¹.min⁻¹) = Sodio filtrado
FNa ⁺ = RFG x PNa ⁺ (PNa ⁺ = Concentración de sodio en el perfundido)
7. ENa⁺ = (μEq.g⁻¹.min⁻¹) = Sodio excretado
ENa ⁺ = FU x UNa ⁺ (UNa ⁺ = Concentración en la orina)
8. TNa⁺ = (μEq.g⁻¹.min⁻¹) = Sodio transportado
TNa ⁺ = FNa ⁺ - ENa ⁺

9. %TNa⁺ = Porcentaje de sodio transportado

$$\%TNa^+ = TNa^+ \times 100 / FNa^+$$

10. FK⁺ (μEq.g⁻¹. min⁻¹) = Potasio filtrado

$$FK^+ = RFG \times PK^+ \quad (PK^+ = \text{concentración de potasio en el perfundido})$$

11. EK⁺ (μEq.g⁻¹. min⁻¹) = Potasio excretado

$$EK^+ = FU \times UK^+ \quad (UK^+ = \text{Concentración de potasio en la orina})$$

12. TK⁺ (μEq.g⁻¹. min⁻¹) = Potasio transportado

$$TK^+ = FK^+ \times EK^+$$

13. %TK⁺ (μEq.g⁻¹. min⁻¹) = Porcentaje de potasio transportado

$$\%TK^+ = TK^+ \times 100 / FK^+$$

14. FCl⁻ (μEq.g⁻¹. min⁻¹) = Cloro filtrado

$$FCl^- = RFG \times PCl^- \quad (PCl^- = \text{concentración de cloro en el perfundido})$$

15. % TCl⁻ (μEq.g⁻¹. min⁻¹) = Cloro excretado

$$ECl^- = FU \times UCl^- \quad (UCl^- = \text{concentración de cloro en la orina})$$

16. TCl⁻ (μEq.g⁻¹. min⁻¹) = Cloro transportado

$$TCl^- = FCl^- \times ECl^-$$

18. Cosm (mL.g⁻¹.min⁻¹) = Aclaramiento osmótico

$$(U_{osm} / P_{osm}) \times FU \quad (U_{osm} = \text{osmolaridad urinaria y } P_{osm} = \text{osmolaridad del perfundido})$$

6.3.2 Jaulas Metabólicas.

➤ Grupos experimentales.

Para esta prueba se utilizaron 32 ratones *Mus musculus* machos, con un peso entre 20 a 25g, los cuales fueron distribuidos en 4 grupos, tres de experimentación que fueron el control positivo a los cuales se les aplicó dosis subletales del veneno de *B. ayerbeii* y un control negativo con solo aplicación de PBS.

Cada grupo de experimentación se encuentra compuesto por 8 ratones, a el primer grupo se le inoculó el 50% de la DL₅₀ hallada previamente, el segundo grupo tuvo un 75% de la DL₅₀ y el tercer grupo fue inoculado con el 25% de la DL₅₀, utilizando como vehículo diluyente en cada grupo PBS a un ph de 7,2.

➤ Protocolo experimental.

Cada grupo de 8 ratones fue separado en 2 ratones por jaula metabólica y tuvieron un tiempo de aclimatación de 48 horas con agua y comida *ad libitum*, transcurridos las 48 horas a cada grupo se le inoculó por vía intraperitoneal una dosis subletal (25, 50, 75%) de la DL₅₀, y se procedió a pesar la comida y medir el volumen de agua colocados en cada jaula metabólica. El periodo de experimentación fue de 24 horas con la obtención de una muestra de orina por cada jaula metabólica que fue almacenada a -4°C, paralelamente se tomaron las mediciones de agua y se anotó el pesaje de comida consumidas en cada jaula metabólica. Una vez terminado esto los animales fueron anestesiados con

pentobarbital sódico al 3%, 50 mg/kg, y se tomaron muestras de sangre de la vena cava las cuales fueron guardadas a una temperatura de 4°C hasta su análisis.

- Análisis bioquímico.

Las pruebas bioquímicas se llevaron a cabo en la Unidad de Investigación Clínica de la Universidad Federal de Ceará. La orina y la sangre fueron centrifugadas a 3500 rpm durante 12 minutos a 8°C, el sobrenadante fue extraído se midió la creatinina por hidrólisis directa y se realizó la lectura por espectrofotometría.

6.3.3 Ensayo citotóxico.

- Linaje celular.

Las células utilizadas fueron células tubulares renales epiteliales MDCK obtenidas en el Departamento de Bioquímica de la Universidad de São Paulo (USP).

- Cultivo y mantenimiento de las células (MDCK).

Las células tubulares renales MDCK, fueron cultivadas en garrafas plásticas estériles con un medio RPMI 1640 suplementado con 10% de suero bovino fetal (SBF), 100 UI/mL de penicilina y estreptomicina 100 µg/ml, y mantenidas a una

temperatura de 37 °C en estufa con una atmósfera de CO₂ al 5%. El crecimiento celular fue observado con la ayuda de un microscopio de inversión (Fresheny, 2000).

Antes de cada experimento las células MDCK se mantuvieron en el medio de cultivo RPMI 1640 sin SBF durante 24 horas para sincronizar las células en la fase G0 del ciclo celular. Después de este tiempo fueron trasladadas a botellas de cultivo para exposición a tripsina-EDTA (0,25/0,02%v/v) durante aproximadamente 5 minutos en estufa de CO₂ a 37 °C, luego el medio fue resuspendido y centrifugado durante 5 minutos a 4000 rpm (Martins *et al.*, 2005; Chaim, 2005). Después se resuspendió nuevamente y se cuantificaron las células en una cámara de Neubauer. Las células MDCK fueron sembradas 1x10⁵ células / mL en placas de 96 pocillos (Figura 10). Corridas 24 horas de sembrado, los posos fueron tratados con diferentes concentraciones del veneno total de *B. ayerbei*, y se estudiaron por 6, 12 y 24 horas.

Como grupo control fueron considerados los posos o sedimentos que contenían células MDCK tratadas únicamente con PBS (solución fosfato salino), sustancia utilizada para dilución del veneno.

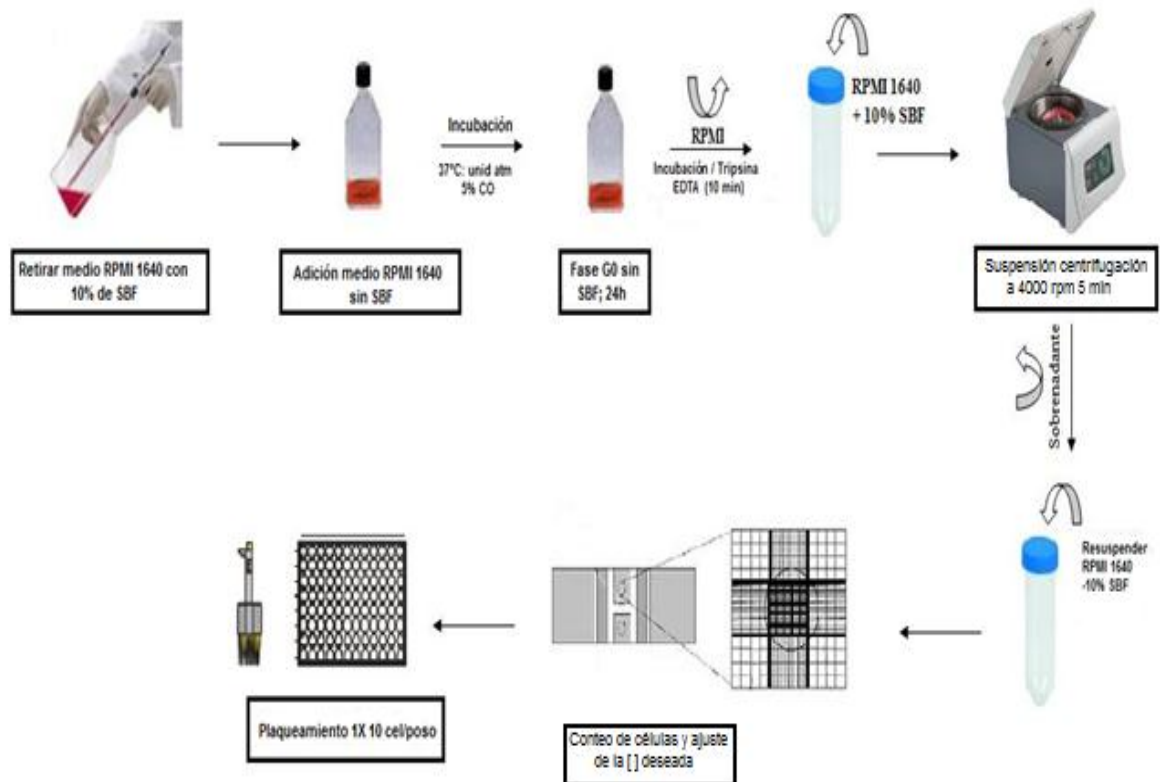


Figura 10. Esquema simplificado del cultivo de células tubulares renales MDCK (Perdigão, 2011).

➤ Prueba con MTT.

La prueba consistió en un análisis colorimétrico que mide indirectamente la citotoxicidad (Mosmann, 1983). El MTT 3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-2-H bromuro es una sal de tetraóxido soluble en agua, que se convierte en cristales de formación de color púrpura insoluble en agua, cuando se produce la ruptura del anillo de tetraóxido por deshidrogenasas mitocondriales y otras enzimas lisosomales. El MTT no interactuará directamente con las deshidrogenasas pero sí

con derivados, NADH y NADPH. Los cristales formados se solubilizaron, formando un producto coloreado por el cual se hace la medición de la densidad óptica en un espectrofotómetro a 570 nm de absorbancia. La intensidad del producto coloreado es directamente proporcional al número de células viables presentes en la muestra, lo que confirma la reducción de la capacidad del sistema en el MTT (Heinrich *et al.*, 2005).

➤ Protocolo experimental.

Corridas 24 horas de sembrado, los posos fueron tratados con diferentes concentraciones del veneno de *B. ayerbeii* (200; 100; 50; 25; 12,5; 6,25; 3,12 y 1,56 $\mu\text{g}/\text{mL}$) en placas de 96 posos, 100 μL del sobrenadante del medio de cultivo fueron removidos y se adicionaron 10 μL de MTT 2,5 mg/mL disuelto en PBS. Después fueron incubados por 4 horas en estufa a 37°C en 5% de CO₂ y se adicionó 90 μL de solución de dodecilsulfato sódico (SDS) a 10% disuelto en HCL 0,01N, para disolver los cristales que se formaron. Las placas se mantuvieron en una estufa a 37°C y 5% de CO₂ por 17 horas, transcurrido este tiempo se realiza la lectura en un espectrofotómetro con una absorbancia de 570nm (Figura 11).

El porcentaje de variabilidad de los grupos fue calculado por la comparación de absorbancia de los grupos experimentales en relación al grupo control, considerándose como 100% la variabilidad media del grupo control (Gómez, 2006; Mosmann, 1983).

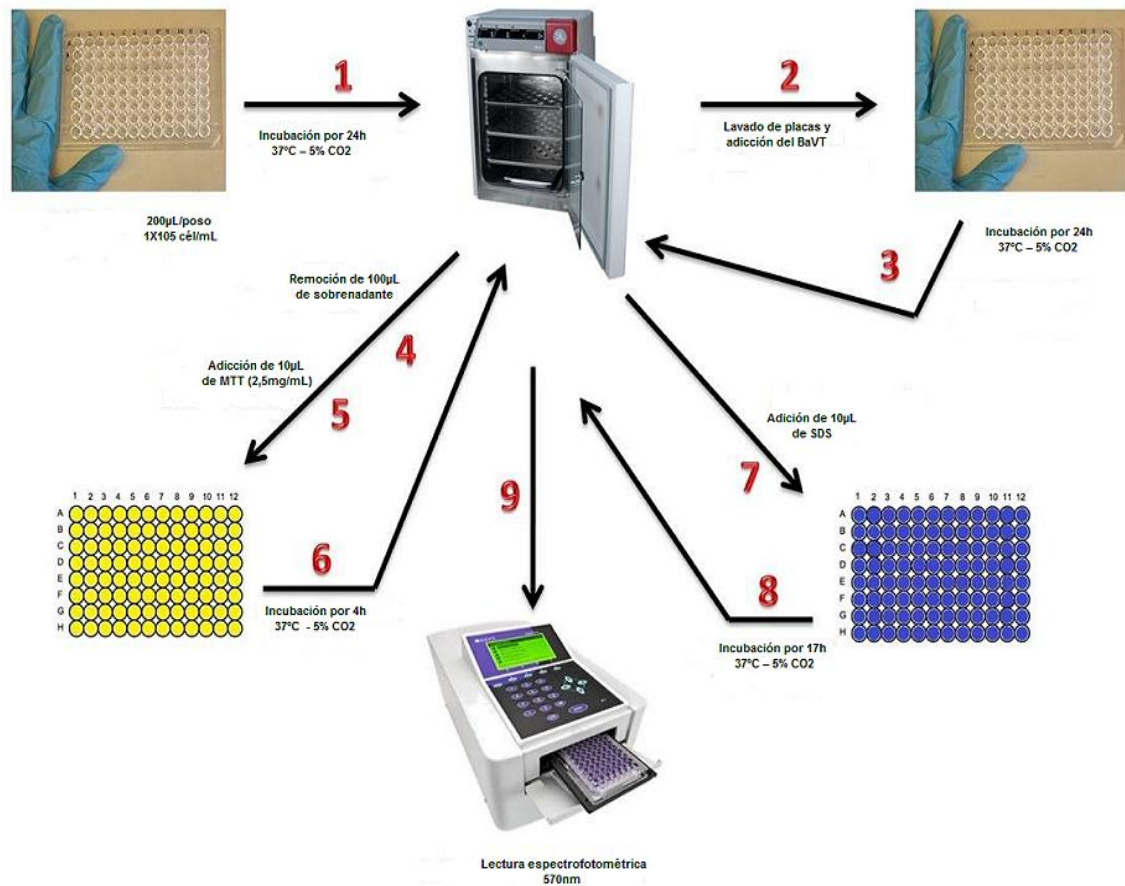


Figura 11. Ensayo de viabilidad de células por el método MTT(Perdigão, 2011).

6.3.4 Análisis estadístico.

Para el análisis estadístico de riñón aislado de acuerdo al comportamiento de los datos, $p > 0,05$ se aplicó ANOVA de un factor, al cual se le realizó una prueba de comparación múltiple aplicando Bonferroni. Todas las tablas y gráficas para evaluar los parámetros renales se estudiaron de acuerdo al variable tiempo, y los datos recogidos a intervalos de 30 minutos.

En la utilización del método de jaulas metabólicas de acuerdo al comportamiento de los datos, $p > 0,05$ se aplicó ANOVA de un factor, al cual se le realizó una prueba de comparación múltiple aplicando Bonferroni.

El análisis estadístico para cultivo celular se basó en una comparación de los porcentajes de viabilidad celular Vs la concentración del veneno, determinándose la IC_{50} (concentración inhibitoria media capaz de disminuir la viabilidad celular a un 50%), a partir de una curva de regresión no lineal utilizando el programa GraphPad Prism®, versão 5.01. los datos fueron comparados por ANOVA, aplicando Bonferroni.

6.3.5 Comité de ética

El proyecto y todos los experimentos fueron hechos de acuerdo a las recomendaciones del Comitê de Ética em Pesquisa com Animais (CEPA) de la Universidad Federal del Ceará.

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1 Perfusión de riñón aislado

El veneno de la serpiente *B. ayerbei* (10µg/mL), causó una disminución de la presión de perfusión (PP) a los 60, 90 y 120 min después de la infusión del veneno (figura 12A), la resistencia vascular renal (RVR) también disminuyó, siendo significativa a los 60 min, con un leve aumento a los 90min (figura 12B), en los parámetros de flujo urinario (FU), hubo un aumento con una mayor significancia a los 90 y 120 min (figura 13A), junto con los resultados obtenidos en el ritmo de filtración glomerular (RFG) (figura 13B). Para los parámetros del porcentaje de transporte tubular de Na⁺ (%T Na⁺) y Cl⁻ (%TCl⁻), se dio una disminución a los 60 y 90 min (figura 14A-B), mientras que en el porcentaje tubular del transporte de K⁺ (%TK⁺) no se vio ningún cambio significativo en comparación con el grupo control, Los datos se expresan como la media ± SEM de cinco animales diferentes p< 0,05 (Tabla 3).

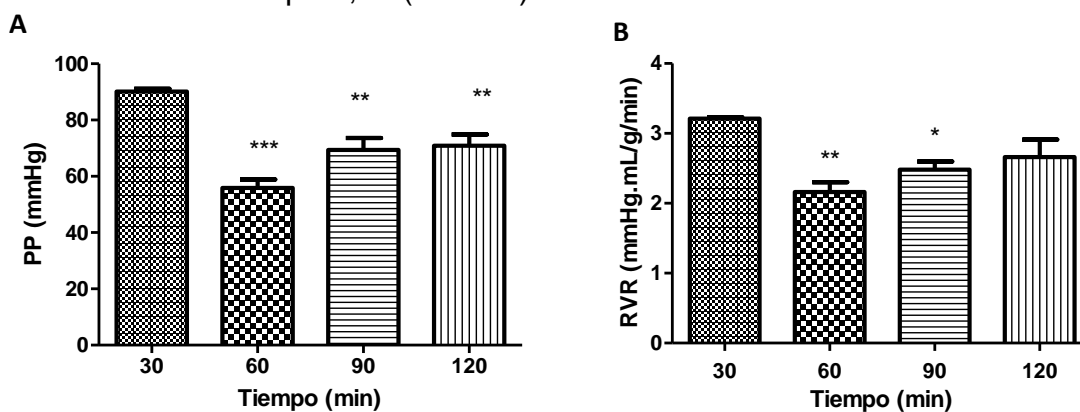


Figura 12. Efecto del veneno total de *B. ayerbei* (10µg/mL), sobre la presión de perfusión (A), y la resistencia vascular renal (B). Los datos se expresan como la media ± SEM de cinco animales diferentes. Los análisis estadísticos se realizaron mediante ANOVA, (*) p< 0,05.

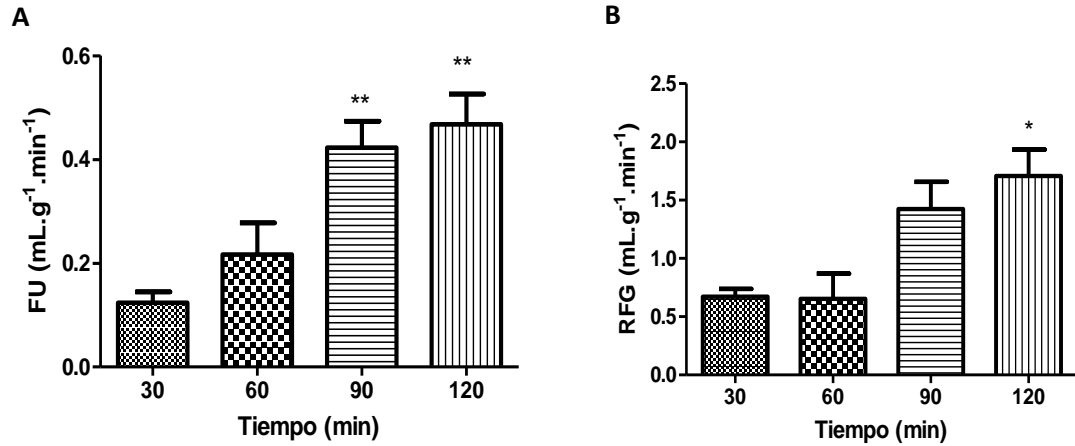


Figura 13. Efecto del veneno total de *B. ayerbei* (10µg/mL) sobre el flujo urinario (A) y la ritmo de filtración glomerular (B). Los datos se expresan como la media ± SEM de cinco animales diferentes. Los análisis estadísticos se realizaron mediante ANOVA, (*) p < 0,05.

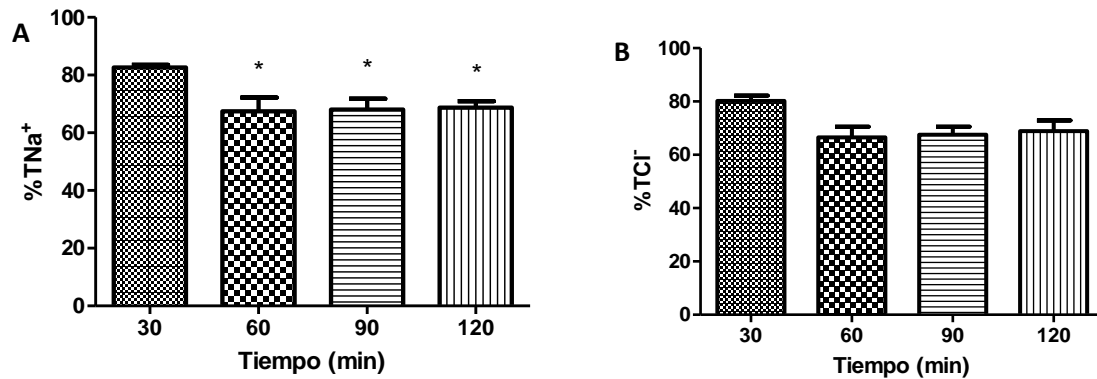


Figura 14. Efecto del veneno total de *B. ayerbei* (10µg/mL) sobre el porcentaje del transporte tubular de sodio (A) y cloro (B). Los datos se expresan como la media ± SEM de cinco animales diferentes. Los análisis estadísticos se realizaron mediante ANOVA, (*) p < 0,05.

Tabla 3. Resultados estadísticos expresados como la media \pm SEM de 5 riñones. Efecto del veneno total de *B. ayerbeii* (10 μ g/mL) sobre la presión de perfusión (PP), resistencia vascular renal (RVR), el flujo urinario (FU), ritmo de filtración glomerular (RFG), y el porcentaje del transporte de Sodio, Potasio y Cloro (%TNa⁺, %TK⁺, %TCl⁻).

Variables	60 min	90 min	120 min
PP (mmHg)			
Control	90,10 \pm 1,00	90,10 \pm 1,00	90,10 \pm 1,00
<i>B. ayerbeii</i>	55,90 \pm 3,00 ***	69,40 \pm 4,20 **	70,90 \pm 4,00**
RVR (mmHg.mL.min)			
Control	3,210 \pm 0,020	3,210 \pm 0,020	3,210 \pm 0,020
<i>B. ayerbeii</i>	2,160 \pm 0,140 **	2,480 \pm 0,120 *	2,480 \pm 2,660
RFG (mmHg.mL.min)			
Control	0,672 \pm 0,066	0,672 \pm 0,066	0,672 \pm 0,066
<i>B. ayerbeii</i>	0,654 \pm 0,216	1,425 \pm 0,233	1,707 \pm 0,228 *
FU (mL.g.min)			
Control	0,1240 \pm 0,021	0,1240 \pm 0,021	0,1240 \pm 0,021
<i>B. ayerbeii</i>	0,2170 \pm 0,061	0,4230 \pm 0,051**	0,4680 \pm 0,058 ***
% TNa ⁺			
Control	82,66 \pm 0,86	82,66 \pm 0,86	82,66 \pm 0,86
<i>B. ayerbeii</i>	67,46 \pm 4,77 *	68,08 \pm 3,71 *	68,74 \pm 2,19 *
%TK ⁺			
Control	64,75 \pm 2,36	64,75 \pm 2,36	64,75 \pm 2,36
<i>B. ayerbeii</i>	60,93 \pm 4,84	67,85 \pm 3,70	68,20 \pm 2,25
%TCl ⁻			
Control	80,24 \pm 2,00	80,24 \pm 2,00	80,24 \pm 2,00
<i>B. ayerbeii</i>	66,55 \pm 4,00	67,56 \pm 3,00	68,84 \pm 4,00

Las alteraciones en los parámetros de la presión de perfusión presentados, indican que el veneno de la serpiente *B. ayerbei*, causó alteraciones tubulares y glomerulares compatibles con la insuficiencia renal aguda (IRA), la cual es una de las complicaciones que pueden llevar a la muerte por envenenamiento Bothrópico. Sin embargo el mecanismo por el cual se lleva a cabo este proceso no es muy bien entendido. Varios factores han sido implicados en la patogénesis de la IRA por mordedura de serpientes y algunos estudios sugieren que es multifactorial, e implica alteraciones hemodinámicas, reacciones inmunológicas y nefrotoxicidad directa (Morais *et al.*, 2013).

En este estudio se utilizó el veneno total de la serpiente *B. ayerbei* para investigar cual es el efecto que se produce en el riñón aislado sin la interferencia de factores sistémicos, obteniendo como resultados la alteración de los parámetros evaluados con una disminución en la presión de perfusión (PP), la resistencia vascular renal (RVR) y el porcentaje de transporte tubular de sodio (%TNa⁺), así como también un aumento en el flujo urinario (Fu) y el ritmo de la filtración glomerular (RFG), efectos similares observados en el veneno total de *B. jararacussu* (Havt *et al.*, 2001), donde se presentó una disminución en la PP y la RVR, con un incremento significativo en la tasa de filtración glomerular (TFG) y el FU, seguido de una disminución del %TNa⁺ y %TK⁺.

Otro estudio realizado con veneno de *B. pirajai* (Havt *et al.*, 2005), causó reducciones en la PP, la RVR, el FU, la TFG, y %TNa⁺ y %TK⁺. Por último *B. moojeni* (Barbosa *et al.*, 2002) presentó una disminución en la PP, la RVR, y del %TNa⁺, %TK⁺, %TCI⁻, con un aumento en el UF, y la TFG.

Estos autores coinciden en que la disminución en la PP, la RVR y el transporte de Na^+ podrían ser causados por la activación de mediadores inflamatorios como las prostaglandinas, bradicininas y óxido nítrico liberadas por las células tubulares y/o vasculares como respuesta a la toxicidad del veneno, lo que promueve una vasodilatación (Barbosa *et al.*, 2002; Havt *et al.*, 2003; Havt *et al.*, 2005), asimismo, Norões en 2009 realiza un estudio con veneno de *B. atrox* en donde sugiere que la liberación de mediadores inflamatorios como las citocinas y el óxido nítrico participa en alteraciones sistémicas (Vera *et al.*, 2000) que podrían causar los efectos del veneno en la perfusión renal, debido a que el óxido nítrico es un vasodilatador que altera la hemodinámica renal y contribuye en el control fisiológico de la presión arterial, por lo que podría estar asociado en la disminución de la presión de perfusión por mecanismos aun no elucidados, y éste además participa en la excreción de los fluidos extracelulares, por lo que la excreción de Na^+ que resulta en una disminución en la perfusión renal, podría estar asociada a este proceso (Filho y Zilberstein, 2000).

Por otro lado Evangelista 2009 evaluó los efectos renales de *B. marajoensis* (30 mg / ml) obteniendo como resultados la disminución de la PP, la RVR, el FU, TFG y el transporte tubular de sodio. Aquí se menciona que la liberación renal de bradicinina seguida de óxido nítrico podría estar implicada en la caída (Ferreira *et al.*, 1992), principalmente de la PP y la RVR. Seguidamente sugiere que los cambios descritos para la reducción de FU y TFG pueden estar relacionados con la liberación de factor activador plaquetario PAF, sin embargo los datos de la disminución de FU y TFG no se asemejan a los resultados encontrados en este trabajo, pero atribuye el aumento de la TFG, FU y la eliminación de sodio a factores natriuréticos, con la continua disminución de la presión de perfusión renal y la resistencia al final del experimento.

Fisiológicamente la vasodilatación arterial promovida por estas sustancias disminuye la resistencia en los segmentos vasculares de los riñones, lo que tiende a aumentar el flujo sanguíneo renal y por tanto llevaría a la disminución de la fracción de filtración, aumentando la filtración glomerular (Guyton y Hall, 2006), resultado observado en la perfusión al aumentar el RFG. Por otro lado Norões, 2009 sugiere que los efectos en la perfusión renal estarían siendo causados por el aumento en la producción de óxido nítrico, lo que podría promover el aumento de la tasa de filtración glomerular (Barbosa *et al.*, 2002). y la diuresis independientemente de la caída de la RVR (Havt *et al.*, 2001).

Se sabe que los venenos de las serpientes son mezclas complejas de moléculas de diferente naturaleza bioquímica, con un predominio de proteínas dotadas de actividad enzimática, por lo cual no se podrían elucidar detalladamente los mecanismos por los cuales se presentan alteraciones en el riñón aislado, además a ciertos componentes del veneno se les pueden atribuir actividades específicas (Angulo y Lomonte, 2009), por lo que varios estudios se han realizado con fracciones de veneno de la serpiente *B. insularis*, en riñón aislado. Entre estas fracciones esta la PLA₂ (Braga *et al.*, 2008), la lectina Tipo-C (Braga *et al.*, 2006a) y la trombina (Braga *et al.*, 2006b). Las cuales alteraron todos los parámetros renales evaluados produciendo un aumento en la PP, la RVR, el FU y RFG, datos diferentes a los obtenidos con el veneno total de *B. ayerbei*, por lo que cada una de estas fracciones actúa sobre diferentes mecanismos promoviendo daño renal, y la combinación de dos a más toxinas que actúan sinérgicamente pueden tener más de una actividad específica (Angulo y Lomonte, 2009). Finalmente las alteraciones presentadas en este trabajo podrían haber sido modificadas por los eicosanoides como lo son las prostaglandinas, bradicininas e histaminas, como consecuencia del proceso inflamatorio, las cuales desempeñan funciones importantes de autorregulación en la función renal, mediante la modificación de la hemodinámica renal, tubular y glomerular (Braga *et al.*, 2006).

7.2 Resultado de las alteraciones histológicas en el riñón

El análisis histológico se realizó comparando las muestras de riñón aislado perfundido derecho, con el riñón izquierdo no perfundido, obteniendo como resultado áreas de congestión discretas en el grupo control, sin alteraciones en el glomérulo, el intersticio y los vasos (Figura15). Los riñones perfundidos con el veneno total de *B. ayerbei*, presentaron áreas de degeneración vacuolar hidrópica de las células tubulares renales, hemorragias, grasa perirrenal (Figura 17) y dilatación del espacio de Bowman (Figura16A).

En este estudio se evaluaron las alteraciones histológicas producidas por el veneno de la serpiente *B. ayerbei* (10µg/mL), en riñón aislado, (figuras 15 y 16), obteniendo como resultado en la observación, una congestión discreta en todos los órganos, áreas hemorrágicas en el parénquima de los órganos RD 719, RI 719, RD 619 y RI 619, y grasa perirenal en los animales RI 819, RD 819, RD 419 y RI 419 (Tabla 4), debido a que los resultados fueron presentados tanto en el riñón izquierdo (control) como el riñón derecho (experimental). Se podría sugerir que estas observaciones son ocasionadas por la manipulación quirúrgica, o bien por el anestésico utilizado, y por lo tanto, este daño no fue dado por el veneno de la serpiente *B. ayerbei*.

En la tabla 4 se presenta como valor positivo (+) la presencia de la sintomatología descrita, y como valor negativo (-) la ausencia de la sintomatología, los marcados como RI (Riñón izquierdo) corresponder al grupo control, y los marcados como RD (Riñón derecho) corresponden al grupo experimental.

Tabla 4. Análisis histológico de 5 animales experimentales. Tabla de las alteraciones encontradas en los riñones.

	RI319	RD319	RI819	RD819	RI719	RD719	RI619	RD619	RI419	RD419
Degeneración	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)
Necrosis	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
Inf. Aguda	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
Inf. Crónica	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
Hemorragia	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)
Calcificación	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
Hipertrofia	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
Hiperplasia	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
Congestión	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
Pigmentación	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
Dilatación del espacio de Bowman	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)	(+)
Arquitectura	OK	OK	OK	Ok	OK	OK	OK	OK	OK	OK

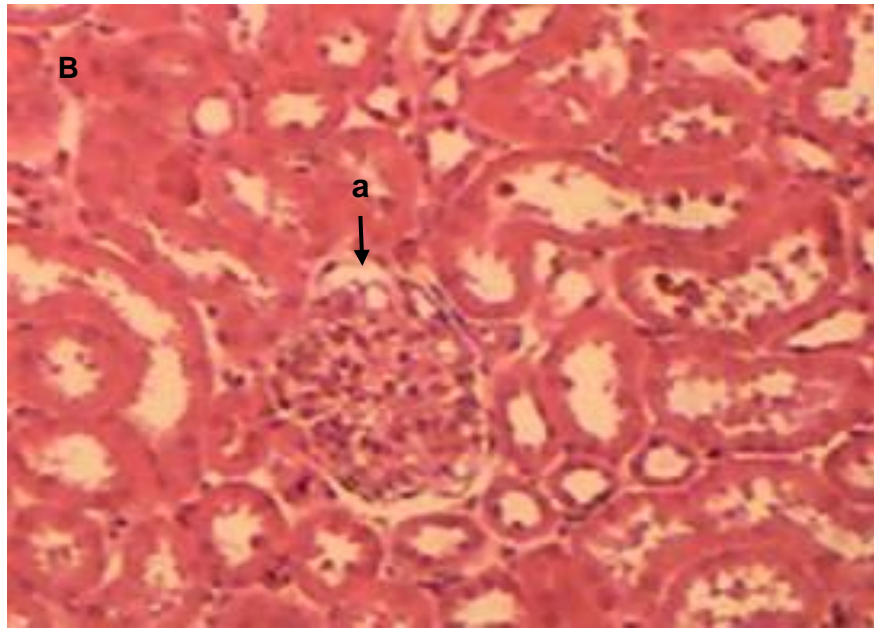
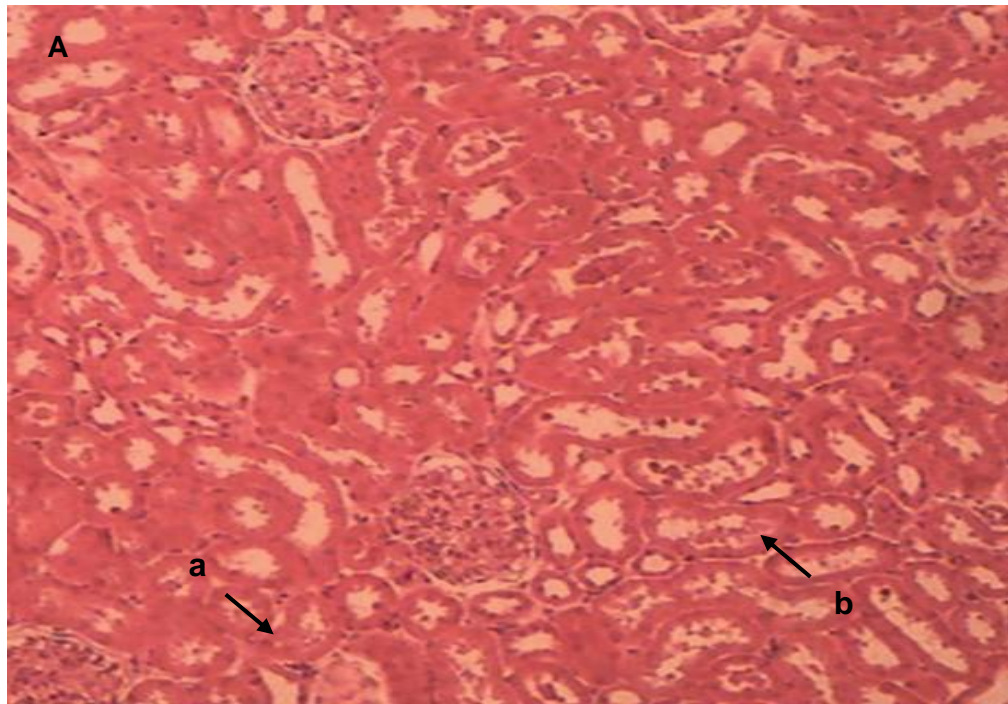


Figura 15. Evaluación histológica del grupo control riñón izquierdo, en la frontera de la zona medular cortical. A) Áreas de congestión (a), hemorragias (b). B) Glomérulos intactos (a). (n=5, coloración de hematoxilina-eosina aumento 100x).

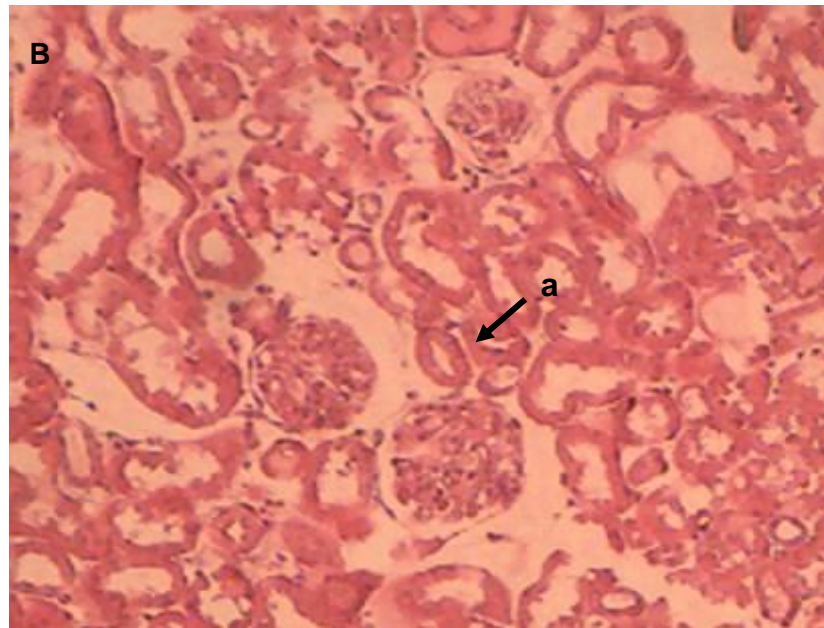
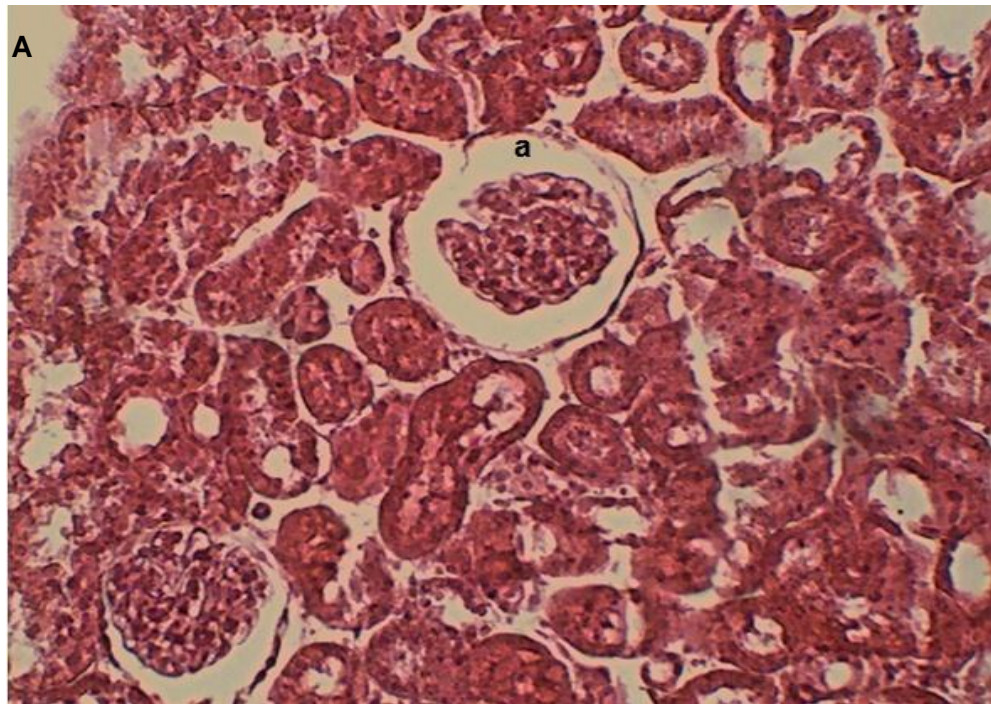


Figura 16. Análisis histológico de los grupos tratados por el veneno de *B. ayerbei* el cual mostró A) dilatación del espacio de Bowman (a) y B) necrosis tubular aguda (a). (n=5, coloración de hematoxilina-eosina aumento 100x).

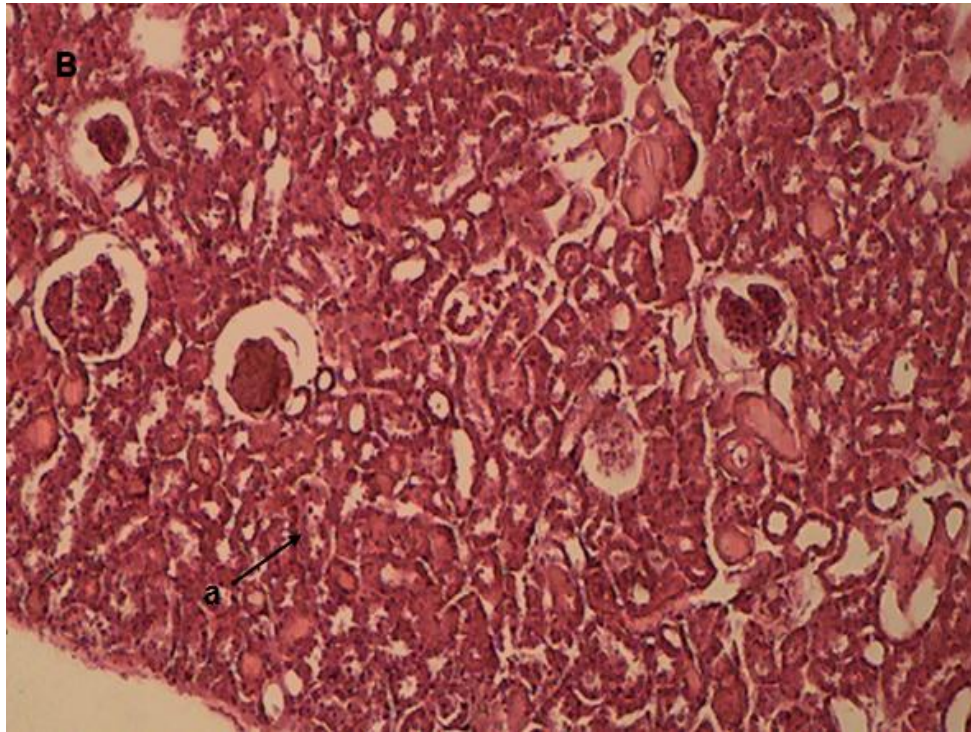


Figura 17. Análisis histológico de los grupos tratados por el veneno de *B. ayerbeii* el cual mostró: degeneración vacuolar hidrópica (a), presencia de hemorragias y grasa perirrenal. (n=5, coloración de hematoxilina-eosina aumento 100x).

Seguidamente como se muestra en la Figura 16A y la Tabla 4 una alteración importante encontrada, solo en los riñones experimentales, es la dilatación en el espacio de Bowman, que se presenta en la enfermedad glomeruloquística, la cual reporta una dilatación de los espacios glomerulares con atrofia de los ovillos, y sugiere que puede originarse, por compresión de los túbulos renales proximales asociada con fibrosis, o bien como consecuencia de procesos inflamatorios Salinas *et al.*, 2008. según estudios realizados por Linardi *et al.*, 2011, utilizando el veneno de *B. alternatus*, demostró cambios morfológicos en el tejido renal de ratas, al aumenta la excreción de algunos iones, por lo que se sugiere que podría

estar dada por el deterioro funcional en el túbulo proximal. En otro estudio realizado por Castro *et al.*, 2004 se observaron los efectos de *B. jararaca* en los túbulos proximales renales a través de la liberación de Lactato Deshidrogenasa (LDH) en la lesión celular, demostrando que este veneno causa un daño directo en los túbulos proximales, con exclusión de cualquier interferencia sistémica o hemodinámica que pudiera haber causado daño tubular. Esta lesión producida en los túbulos proximales puede generar una obstrucción, lo que incrementaría la presión en el espacio de Bowman (Salinas *et al.*, 2008), y por consiguiente llevaría a una dilatación en el mismo. Otra característica observada fue la presencia de necrosis tubular (figura 16B) en el riñón izquierdo de algunos animales experimentales, el cual pudo ser ocasionado debido a una fuga del líquido perfundido a través de los capilares glomerulares, actividad atribuida a la lectina tipo-C de *B. insularis* en la cual Braga *et al.*, 2006a asocia con característica de proteínas mostrando actividad de adhesión celular por lo que sugiere que algunas glicoproteínas como las integrinas, que se expresan en el endotelio hacen posible la unión o enlace con otras células endoteliales o con otras glicoproteínas de la membrana basal (Barrero, 2008), ayudando a la adhesión celular mediante su capacidad para alterar la conformación del citoesqueleto por medio de la contracción celular, esto por consiguiente ocasionaría una ampliación de los poros endoteliales de unión intercelular (Marcinkiewicz *et al.*, 2005) y determinarían la fuga del líquido de perfusión a la cápsula de Bowman. Debido a que la expresión de las integrinas es estimulada por ciertas citoquinas proinflamatorias se explicaría el aumento de la permeabilidad vascular que se observa en la inflamación aguda. (Barrero, 2008).

Por lo anterior la alteración observada en la dilatación del espacio de Bowman (Figura 16A), podría estar dada por una lesión en los túbulos proximales como respuesta inflamatoria o por nefrotoxicidad directa. Y la necrosis tubular estaría asociada a la adhesión celular estimulada por citoquinas proinflamatorias.

7.3 Jaulas metabólicas

Mediante la utilización de jaulas metabólicas, se evaluó el aclaramiento de creatinina en sangre, utilizando 32 ratones separados en cuatro grupos, a cada grupo de 8 ratones se le administró por vía intraperitoneal una concentración de la DL_{50} , del veneno de la serpiente de *B. ayerbei*, así el primer grupo fue de 25%, el segundo de 50% y el tercero de 75%. Pasadas 24 horas se evaluaron los efectos obteniendo como resultado un aumento significativo en el aclaramiento de creatinina en el grupo evaluado con la concentración del 75% de la DL_{50} (Figura 17). Se llevó a cabo un análisis estadístico por comparación utilizando ANOVA de un factor (Tabla 5). Los datos se expresan como la media \pm SEM de 32 animales experimentales.

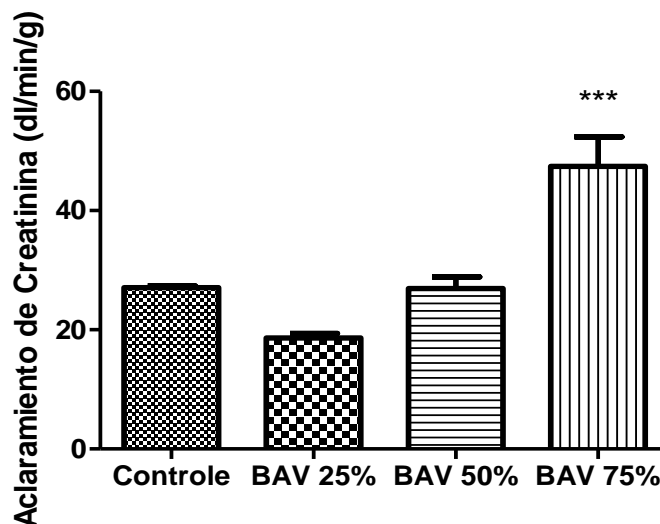


Figura 18. Evaluación de los efectos de dosis subletales del veneno de *B. ayerbei* en ratones, obteniendo un aumento significativo en la dosis subletal de 75%. Los datos se expresan como la media \pm SEM * $p < 0,05$.

En la tabla 5 se muestran el análisis estadístico de aclaramiento de creatinina en sangre, comparando los tres grupos experimentales, con diferentes dosis y el control.

Tabla 5. Resultado estadístico del efecto de dosis subletales del veneno de *B. ayerbeii* en ratones. Los datos se expresan como la media \pm SEM * $p < 0,05$.

	Control	BaV 25%	BaV 50%	BaV 75%
Aclaramiento				
de creatinina	27,07 \pm	18,65 \pm	26,91 \pm	47,44 \pm
(dL/min/g)	0,3163	0,7316	1,985	4,943

De acuerdo a lo observado anteriormente se obtuvo un aumento en el aclaramiento de creatinina en sangre, varios documentos sugieren que la detección de las alteraciones en los niveles absolutos de creatinina sérica, urea plasmática y el volumen urinario son criterios importantes para la identificación de la IRA (Gómez, 2006). Fisiológicamente la creatina se filtra libremente a través del glomérulo, en cambio se reabsorbe mal en los túbulos renales, por lo que su excreción se da en grandes cantidades (Guyton y Hall, 2006). Teniendo esto en cuenta, se podría sugerir que el aumento en el aclaramiento de creatinina se da por un daño a nivel del glomérulo, lo cual no permite que haya una filtración de la misma

Por otra parte Barone *et al.*, 2011, evalúa el efecto del veneno de *B. jararaca* y los tratamientos del ácido lipóico y la simvastatina en la función renal, obteniendo

como resultado un aumento en la creatinina sérica, lo cual puede ser producido por una acción directa que conduce a anormalidades glomerulares y tubulares, o por manifestaciones sistémicas tales como la hemorragia y la inestabilidad hemodinámica que pueden ocurrir con la coagulación vascular generalizada.

Los mecanismos por los cuales se produce el aumento en creatinina, no se pueden elucidar muy bien, ya que el resultado de esta metodología no proporciona la información necesaria, por lo tanto el aumento de creatinina puede ser causado por cualquier mecanismo. La falta de otros datos se hace relevante para descartar otras alteraciones.

El análisis de creatinina en orina hubiera sido útil para la comparación de esta proteína en sangre, sin embargo no se pudo llevar a cabo porque la cantidad recogida no era suficiente para desarrollar el procedimiento. Debido a esto tampoco se pudo realizar análisis de Na^+ , Cl^- y K^+ en orina, los cuales hubieran proporcionado mayor información.

Se concluye que el aumento de creatinina puede ser dado por un daño a nivel del glomérulo o por manifestaciones sistémicas producidas por el veneno de *B. ayerbei*.

7.4 Ensayo de viabilidad de las células

Se realizó el análisis de la viabilidad de las células MDCK ($1,0 \times 10^5$ cél/mL), las cuales constituyen un linaje de células con características morfológicas y

funcionales semejantes a las células del túbulo colector distal de mamíferos (Perdigão, 2011), las cuales fueron tratadas con el veneno total de *B. ayerbeii* en diferentes concentraciones (200; 100; 50; 25; 12,5 y 6,25 $\mu\text{g}/\text{mL}$), mediante el método de MTT después de 6, 12 y 24 horas de incubación. Los resultados obtenidos muestran que el veneno presentó un efecto citotóxico, caracterizado por la reducción significativa de la viabilidad celular a las 6h (Figura18), 12h (Figura 19) y 24h (Figura 20), en todas las concentraciones estudiadas comparadas con el grupo control ($\text{IC}_{50} = 4,455 \mu\text{g}/\text{mL}$).

Asimismo la Figura 21, muestra una comparación de las concentraciones vs el tiempo y se observa un efecto citotóxico al disminuir la viabilidad celular, siendo mayor transcurridas las 24 horas,

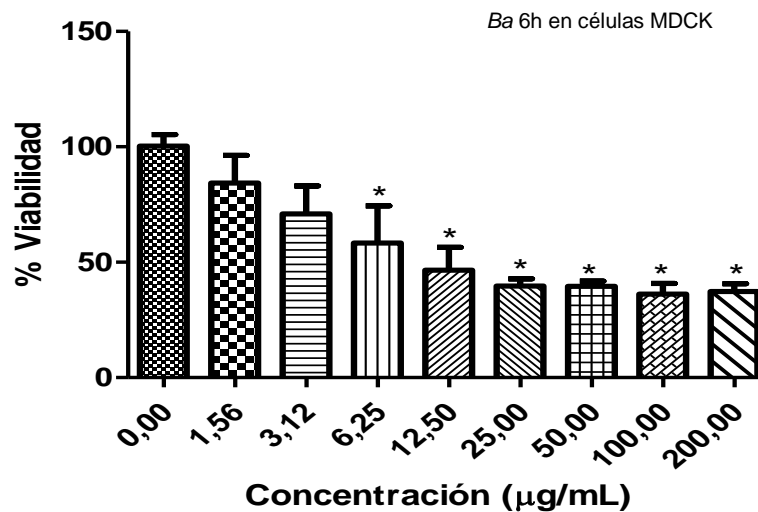


Figura 19. Efecto citotóxico del veneno total de *B. ayerbeii* (200; 100; 50; 25; 12,5; 6,25; 3,12 y 1,56 $\mu\text{g}/\text{mL}$) sobre células MDCK, por el método de MTT después de 6h. Datos expresados como media \pm SEM (n=3) analizado por ANOVA con test de Bonferroni y t de Student, *p<0,05.

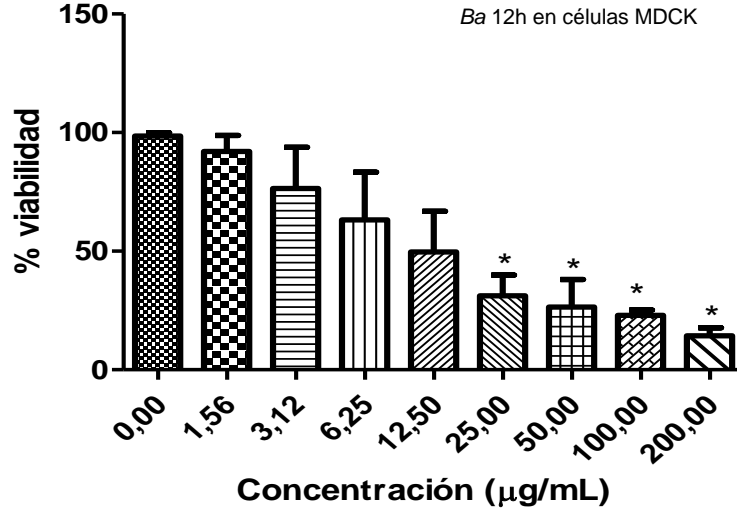


Figura 20. Efecto citotóxico del veneno total de *B. ayerbe* (200; 100; 50; 25; 12,5; 6,25; 3,12 y 1,56 µg/mL) sobre células MDCK, por el método de MTT después de 12h. Datos expresados como media ± SEM (n=3) analizado por ANOVA con test de Bonferroni y t de Student, *p<0,05.

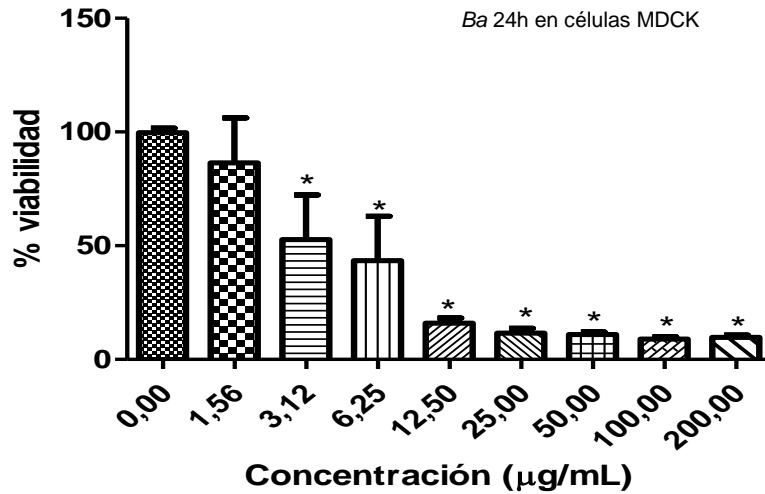


Figura 21. Efecto citotóxico del veneno total de *B. ayerbe* (200; 100; 50; 25; 12,5; 6,25; 3,12 y 1,56 µg/mL) sobre células MDCK, por el método de MTT después de 24h. Datos expresados como media ± SEM (n=3) analizado por ANOVA con test de Bonferroni y t de Student, *p<0,05.

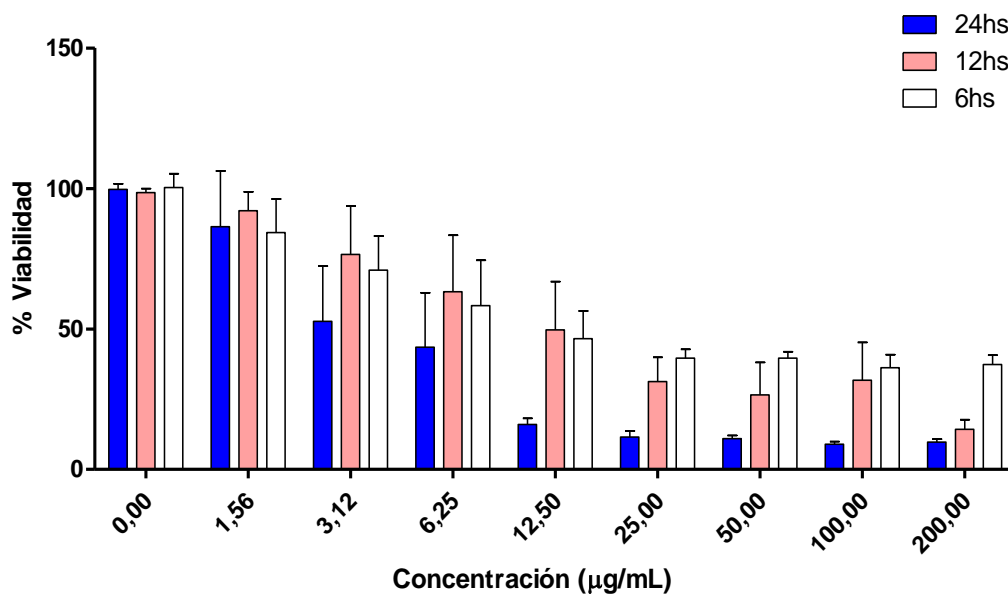


Figura 22. Comparación del efecto citotóxico del veneno total de *B. ayerbei* (200; 100; 50; 25; 12,5; 6,25; 3,12 y 1,56 µg/mL) sobre células MDCK, por el método de MTT después de 6, 12 y 24 horas. Datos expresados como media \pm SEM (n=3) analizado por ANOVA con test de Bonferroni y t de Student $p < 0,05$.

En la Tabla 6 se muestran los valores estadísticos de las diferentes concentraciones utilizadas y el efecto que tuvo sobre la viabilidad de las células MDCK.

Tabla 6. Efecto del veneno total de *B. ayerbei* sobre la viabilidad de las células tubulares renales en diferentes concentraciones a las 6, 12 y 24h. Los datos se expresan como media \pm SEM (n=3) analizado por ANOVA con test de Bonferroni y t de Student, * $p < 0,05$.

Concentración			
($\mu\text{g/mL}$)	VT <i>B. ayerbei</i> 6h	VT <i>B. ayerbei</i> 12h	VT <i>B. ayerbei</i> 24h
Control	100,3 \pm 5,001	98,53 \pm 1,375	99,70 \pm 1,998
1,56	84,28 \pm 12,01	92,10 \pm 6,678	86,38 \pm 19,84*
3,12	70,89 \pm 12,22	76,49 \pm 17,32	52,71 \pm 19,62**
6,25	58,34 \pm 16,07*	63,19 \pm 20,18	43,48 \pm 19,42***
12,5	46,52 \pm 9,859***	49,67 \pm 17,20*	15,95 \pm 2,245***
25	39,63 \pm 3,128***	31,23 \pm 8,686**	11,55 \pm 2,168***
50	39,62 \pm 2,254***	26,48 \pm 11,57***	10,95 \pm 1,129***
100	36,22 \pm 4,579***	22,92 \pm 2,241***	8,921 \pm 1,037***
200	37,35 \pm 3,329***	14,28 \pm 3,394***	9,724 \pm 1,003***

Esta tabla nos indica la citotoxicidad que indujo el veneno de la serpiente *B. ayerbei*, aplicando diferentes concentraciones y ser evaluadas en diferentes tiempos en las células MDCK, Se sabe que los venenos de las serpientes tienen actividad proteolítica que puede ejercer un efecto a través de la proteólisis de la matriz extracelular, la interrupción de la adhesión célula-matriz e induciendo la apoptosis en linaje de células endoteliales, (Lopes *et al.*, 2012).

Varios estudios se han llevado a cabo en diferentes linajes celulares para conocer cuáles son los procesos por los cuales se produce una disminución en la viabilidad celular, se ha propuesto que la toxicidad celular podría ser dada por procesos de anoikis, por lo que Brenes *et al.*, 2010 evaluó la toxicidad en células adherentes BAEC y no adherentes HeLa con el veneno de *B. asper*, obteniendo como resultado una toxicidad mayor en células adherentes, pero se presentó una toxicidad del 50% en células no adherentes, lo que lleva a creer que los mecanismos por los cuales se da esta toxicidad, podrían tener otros mecanismos,

independientemente del desprendimiento en el anclaje celular, en este mismo trabajo se evaluó la vía de muerte por la que se da la reducción en la viabilidad celular, obteniendo como resultado el proceso de apoptosis como principal vía de muerte. Asimismo Perdigão 2011 evalúa el mecanismo de muerte celular en células MDCK producidas por el veneno de *B. insularis* por medio de citometría de flujo, y observa que el mecanismo predominante es de apoptosis, (Simon *et al.*, 2000) sugiere que un aumento en los niveles de especies reactivas de oxígeno (ROS), llevan a una oxidación de lípidos, proteínas y ácidos nucleicos, generando un daño oxidativo, y que una respuesta a tal daño es una vía importante de inicio de apoptosis.

8. CONCLUSIONES

El veneno de la serpiente *B. ayerbei*, aplicado a un sistema de perfusión renal en cantidad de 10µg/mL, en riñón aislado de rata, ocasiona: Insuficiencia renal aguda, que se manifiesta en la disminución del transporte de Na⁺ y la Resistencia Vascular Renal, la caída de la Presión de Perfusión y el aumento del Flujo Urinario y el Ritmo de Filtración Glomerular.

A nivel histológico el veneno de *B. ayerbei* ocasiono en el riñón perfundido, cambios histológicos en el glomérulo, consistentes en la dilatación del espacio de Bowman y necrosis tubular, el primero debido a una lesión en el túbulo proximal, o túbulo colector y el segundo relacionado con la adhesión celular en respuesta de procesos proinflamatorios.

El veneno de *B. ayerbei*, aplicado en dosis del 75% de la DI₅₀, produjo aumento en el aclaramiento de creatina, síntoma de daño en el glomérulo.

A nivel celular los resultados mostraron un elevado efecto citotóxico del veneno de *B. ayerbei*, caracterizado por la reducción significativa de la viabilidad celular en todas las concentraciones estudiadas, cuando se compara con el grupo control.

El veneno total de *B. ayerbei*, fue capaz de alterar todos los métodos propuestos en este trabajo, por lo que se concluye que el veneno tiene una acción nefrotóxica en: riñón aislado de rata, en ratones y en la viabilidad de las células MDCK.

9. RECOMENDACIONES

Teniendo en cuenta que los venenos de las serpientes son secreciones constituidas por una gran cantidad de moléculas, se recomienda llevar a cabo estos mismos análisis con diferentes fracciones del veneno, para determinar cuál podría ser el compuesto que pueda llegar a producir nefrotoxicidad.

Para el trabajo con jaulas metabólicas se recomienda aumentar el número de animales (ratones) con el fin de obtener una mayor cantidad de muestras, y así poder ampliar los análisis de iones y creatinina en orina.

Para poder entender los procesos por los cuales se produce citotoxicidad en células MDCK, se recomienda realizar un ensayo de citometría de flujo para saber por cual vía se podría estar generando la reducción de la viabilidad celular, y así elucidar los posibles mecanismos ya sean apoptóticos o necróticos por los cuales se produce esta muerte.

9. BIBLIOGRAFÍA

- ANGULO, Y AND LOMONTE, B. 2009. Biochemistry and toxicology of toxins purified from the venom of the snake *Bothrops asper*. *Toxicon* 54(7): 949–57 Available at <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19111755> (verified 22 July 2012).
- AYERBE, S. 1998. Aspectos clínicos y epidemiológicos del accidente ofídico en el Departamento del Cauca. Memorias del primer Simposio Colombiano de Toxinología. Medellín, Antioquia. 276.
- AYERBE, S. 2000. Ofidismo en el Departamento del Cauca, Colombia. Epidemiología, Etiología, Clínica y Complicaciones. *Revista de la Facultad de Ciencias de La Salud Universidad del Cauca* 2(4): 21-31.
- AYERBE, S. 2007. Ofidismo en Colombia. Enfoque, diagnóstico y tratamiento. En: Ordóñez, C.A; Ferrada, R y Buitrago, R (Editores): *Cuidado Intensivo y Trauma*. 2a. edición. Bogotá, D.C. Colombia: Editorial Distribuna. 1143 – 1167.
- AYERBE, S Y LATORRE, J. 2010. Manual para la prevención y mejoramiento en la atención del paciente con accidente ofídico. Secretaría Departamental de Salud del Cauca. 1-67 Available at <http://es.scribd.com/doc/63438188/Manual-Accidentes-Ofidicos> (verified 23 September 2012)
- BALHLMANN, J; GIEBISCH, G AND OCHWADT, B. 1967. Micropuncture study of isolated perfused rat kidney. *American Journal of Physiology* 212: 77-82 Available at <http://ajplegacy.physiology.org/content/212/1/77.extract> (verified 2 November 2012).

BARBOSA, P.S.F; HAVT, A; FACÓ, P.E.G; SOUSA, T.M; BEZERRA, I.S; FONTELES, M.C; TOYAMA, M.H; MARANGONI, S; NOVELLO, J.C AND MONTEIRO, H.S.A. 2002. Renal toxicity of *Bothrops moojeni* snake venom and its main myotoxins. *Toxicon* 40(10): 1427–35 Available at <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12368112> (verified 4 February 2013).

BARBOSA, P.S.F; MARTINS, A.M.C; HAVT, A; TOYAMA, D.O; EVANGELISTA, J.S; FERREIRA, D.P.P; JOAZEIRO, P.P; BERIAM, L.O.S; TOYAMA, M.H; FONTELES, M.C AND MONTEIRO, H.S.A. 2005. Renal and antibacterial effects induced by myotoxin I and II isolated from *Bothrops jararacussu* venom. *Toxicon* 46(4): 376–86 Available at <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16115661> (verified 11 May 2013).

BARRENO, P.G. 2008. Inflamación. *Rev.R.Acad.Cienc.Exact.Fís.Nat.* 102(1): 91-159

BARONE, J.M; FADONI, R; FREZZATTI, R; ZAMBOTTI-VILLELA, L AND FLÁVIO, P.S. 2011. Differential efficiency of simvastatin and lipoic acid treatments on *Bothrops jararaca* envenomation-induced acute kidney injury in mice *Toxicon* 57(1): 148–156. Available at <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0041010110004022> (verified 25 April 2013).

BOLAÑOS, R. 1982. Las serpientes venenosas de centroamérica y el problema del ofidismo. *Rev. Cost. Cienc. Méd* (26): 165–184.

BRAGA, M.D.M; MARTINS, A.M.C; ALVES, C.D; MENEZES, D.B; MARTINS, R.D; BARBOSA P.S.F; OLIVEIRA I.M.S; TOYAMA, M.H; TOYAMA, D.O; SANTOS, E.B; FAGUNDES, F.H.R; FONTELES, M.C AND MONTEIRO H.S.A. 2008. Purification and renal effects of phospholipase A₂ isolated

from *Bothrops insularis* venom. *Toxicon* 51(2): 181–90 Available at <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17953979> (verified 25 April 2013).

BRAGA, M.D.M; MARTINS, A.M.C; AMORA, D.N; MENEZES, D.B; TOYAMA, M.H; TOYAMA, D.O; MARANGONI, S; BARBOSAA, P.S.F; ALVES R.S; FONTELES, M.C AND MONTEIRO H.S.A. 2006a. Purification and biological effects of C-type lectin isolated from *Bothrops insularis* venom. *Toxicon* 47(8): 859–67 Available at <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16730365> (verified 27 September 2012).

BRAGA, M.D.M; MARTINS, A.M.C; MENEZES, D.B; BARBOSA, P.S.F; EVANGELISTA, J.S.A.M; TOYAMA, M.H; TOYAMA, D.O; FONTELES, M.C AND MONTEIRO, H.S.A. 2006b. Purification and biological activity of the thrombin-like substance isolated from *Bothrops insularis* venom. *Toxicon* 49(11): 329–338 Available at <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0041010106003874> (verified 25 April 2013).

BRENES, O; MUÑOZ, E; ROLDÁN-RODRÍGUEZ, R AND DÍAZ, C. 2010. Cell death induced by *Bothrops asper* snake venom metalloproteinase on endothelial and other cell lines. *Exp. Mol. Pathol.* 88(3): 424–32 Available at <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20219457> (verified 27 September 2012).

CASTRILLÓN-ESTRADA, D.F; VÉLEZ, J.G.A; HERNÁNDEZ-RUIZ, E.A Y PALACIO, L.M.A. 2007. Envenenamiento ofídico. *Salud Uninorte Barranquilla* 23(1): 96–111 Available at <http://www.scielo.org.co/pdf/sun/v23n1/v23n1a10> (verified 26 July 2012).

- CASTRO, I; BURDMANN, E; SEGURO, A.C AND YU, L. 2004. *Bothrops* venom induces direct renal tubular injury: role for lipid peroxidation and prevention by antivenom. *Toxicon* 43(7): 833–9 Available at <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15284018> (verified 22 July 2012).
- CHAIM, O. M. 2005. Estudo da atividade citotóxica da proteína dermonecrótica do veneno da aranha marrom (*Loxosceles intermedia*) com ênfase no efeito nefrotóxico. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular) Faculdade de Biologia Universidade Federal do Panamá, Curitiba. 109f.
- ENRÍQUEZ, J; AYERBE, S Y HURTADO, M.1993. Insuficiencia renal aguda por ofidismo, Hospital Universinario "San José", Popayán 1980-1992. Memorias del VIII Congreso Colombiano de Nefrología e Hipertensión Arterial, Bucaramanga, Santander. 4
- EVANGELISTA, I.L. 2009. Caracterização das atividades cardiorenal e neural de *Bothrops marajoensis* e suas frações. Dissertação (Doutor em Farmacologia) Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, Fortaleza. 0–116.
- EVANGELISTA, I.L; MARTINS, A.M.C; NASCIMENTO, N.R.F; HAVT, A; EVANGELISTA, J.S.A.M; NORÕES, T.B.S; TOYAMA, M.H; DIZ-FILHO, E.B; TOYAMA, D.O; FONTELES, M.C AND MONTEIRO, H.S.A. 2010. Renal and cardiovascular effects of *Bothrops marajoensis* venom and phospholipase A₂. *Toxicon* 55(6): 1061–70 Available at <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20036276> (verified 22 July 2012).
- FERREIRA, M.L; MOURA-SILVA, A.M; FRANÇA, F.O; CARDOSO, J.L AND MOTA, I. 1992.Toxic activities of venom from nine *Bothrops* species and their correlation with lethality and necrosis. *Toxicon*, 25(5): 574-577

Available at <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0014299997001532> (verified 25 July 2012).

FILHO, F.R E ZILBERSTEIN, B. 2000. Óxido nítrico: o simples mensageiro percorrendo a complexidade. Metabolismo, síntese e funções. Rev.Ass Med Bras. 46: 265–271.

FOLLECO-FERNÁNDEZ, A.J. 2010. Taxonomía del complejo *Bothrops asper* (Serpentes: Viperidæ) en el sudoeste de Colombia. Revalidación de la especie *Bothrops rhombeatus* (García, 1896) y descripción de una nueva especie. Rev. Noved. Colomb. 10(1): 33–70.

FONTELES, M.C; COHEN, J.J; BLACK, A.J AND WERTHEIM, S.J. 1983. Support of renal kidney function by long-chain fatty acids derived from renal tissue. American J. Physiol 244(3); 235-246 Available at ajprenal.physiology.org/content/244/3/F235 (verified 20 November 2012).

FOX, J.W AND SERRANO, S.M.T. 2005. Structural considerations of the snake venom metalloproteinases, key members of the M12 reprotolysin family of metalloproteinases. Toxicon, 45(8): 969–985 Available at <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0041010105000644> (verified 27 May 2013).

FRESHENEY, R.I. 2000. Culture of Animal Cells: a manual of basic techniques. Wiley-liss. 2^a ed. New York, 337-381.

GÓMEZ, E.G. 2006. Distribución tisular de transportadores de fármacos en tejidos normales y transformados: Papel en el sistema nervioso central. Tesis (Doctorado) Facultad de Biología, Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Universidad de Barcelona, Barcelona. 192 f.

- GUYTON, A Y J. HALL. 2006. Tratado de Fisiología Médica. Elsevier Saunders. 11^a ed. Barcelona, España. 307-348.
- HAVT, A; FONTELES, M.C AND MONTEIRO, H.S.A. 2001. The renal effects of *Bothrops jararacussu* venom and the role of PLA₂ and PAF blockers, *Toxicon*, 39(12): 1841-1846 Available at <http://sciencedirect.com/science/article/pii/S0041010101001465> (verified 22 July 2012)
- HAVT, A; BARBOSA, P.S.F; NOBRE, A.C.L; BEZERRA, G.P; MENEZES, D.B; FACO, P.E.G; FONTELES, M.C; LOPES-FERREIRA, M AND MONTEIRO, H.S.A. 2003. Effects of *Thalassophryne nattereri* fish venom in isolated perfused rat kidney. *Toxicon* 42(5): 509–514 Available at <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0041010103002290> (verified 6 May 2013).
- HAVT, A; TOYAMA, M.H; NASCIMENTO, N.R.F; TOYAMA, D.O; NOBRE, A.C.L; MARTINS, A.M.C; BORBOSA, P.S.F; NOVELLO, J.C; BOSCHERO, A.C; CARNEIRO, E.M; FONTELES, M.C AND MONTEIRO, H.S.A. 2005. A new C-type animal lectin isolated from *Bothrops pirajai* is responsible for the snake venom major effects in the isolated kidney. *The Inter Journal of Biochemistry & Cell Biology* 37: 130–141 Available at <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1357272504002389> (verified 20 November 2012).
- HEINRICH, E. L; WELTY, L.A.Y; BANNER, R.R AND OPPENHEIMER, S.B. 2005. Direct targeting of cancer cells: a multiparameter approach. *Acta Histochemica*, 107(5): 335-344.
- KLAUBER L. M. 1972. Rattlesnakes, their habits, life histories, and influence on mankind. Univ. of Calif. Press, Berkeley and Los Angeles, 1,2: 771- 821.

- LINARDI, A; ROCHA, T; MIYABARA, E.H; FRANCO-PENTEADO, C.F; CARDOSO, K.C; BOER, P.A; MORISCOT, A.S; GONTIJO, J. A R; JOAZEIRO, P.P; COLLARES-BUZATO, C.B AND HYSLOP, S. 2011. Histological and functional renal alterations caused by *Bothrops alternatus* snake venom: expression and activity of Na⁺ / K⁺ -ATPase. *Biochim. Biophys. Acta* 1810(9): 895–906 Available at <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21704674> (verified 22 July 2012).
- LOPES, D.S; FAQUIM-MAURO, E; MAGALHÃES, G.S; LIMA, I.C; BALDO, C; FOX, J.W; MOURA-DA-SILVA, A.M AND CLISSA, P.B. 2012. Gene expression of inflammatory mediators induced by jararhagin on endothelial cells. *Toxicon* 60(6): 1072–84 Available at <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22960448> (verified 26 September 2013).
- LOPÉZ, J.G Y VALERA, D.A. 2011. Informe epidemiológico nacional 2010 subdirección de vigilancia y control en salud pública. Instituto Nacional de Salud. 1-313.
- MALDONA, M.M; RODICIO, J.L Y ACOSTA J.H. 1993. Tratado de Nefrología. 2^a ed. Ediciones Norma S.L. Madrid 532-568.
- MANRIQUE, H. A. 2000. Ofidismo. Ministerio de Salud Lima. 1-57.
- MARTINEZ-MALDONATO, M; STAWROULAKI-TSAPARA, A; TSAPARA, N; SUKI, W.N AND EKNOYAN, G. 1978. Renal effects of lithium administration in rats: alterations in water and eletrolyte metabolism and the response to vasopressin and cyclic-adenosine monophosphate during prolonged administration. *Lab. Clin. Med.* 80(3): 445-461.
- MARCINKIEWICZ, C: LOBB, R.R: MARCINKIEWICZ, M.M: DANIEL, J.L: SMITH, J.B: AND DANGELMAIER, C. 2000. Isolation and characterization of EMS16, a C-

lectin type protein from *Echis multisquamatus* venom, a potent and selective inhibitor of the $\alpha\beta 1$ Integrin. *Toxicon* 47(859):867-867.

MARTINS, A.M.C; SOUSA, F.C.M; BARBOSA, P.S.F; TOYAMA, M.H; TOYAMA, D.O; APRÍGIO, C.C; QUEIROZ, M.G.R; GUARNIERI, M.C; HAVT, A; MENEZES, D.B; FONTELES, M.C AND MONTEIRO, H.S.A. 2005. Action of anti-bothropic factor isolated from *Didelphis marsupialis* on renal effects of *Bothrops erythromelas* venom. *Toxicon* 46(6): 595–9 Available at <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16168450> (verified 5 October 2012).

MORAIS, I.C.O; TORRES, A.F.C; PEREIRA, J.D.S; PEREIRA, T.P; MENEZES, B.R; MELLO, P; COELHO, A.R; BINDÁ, A.H; TOYAMA, M.H; MONTEIRO, H.S.A; SMAILI, S.S AND MARTINS, A.M.C. 2013. *Bothrops leucurus* venom induces nephrotoxicity in the isolated perfused kidney and cultured renal tubular epithelia. *Toxicon* 61: 38–46 Available at <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23127898> (verified 11 May 2013).

MOSMANN, T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Immunol. Methods*. 65(1/2): 55-63.

NISHIITSUTSUJI-UWO, J.M; ROSS, B.D Y KREBS, H.A. 1967. Actividades metabólicas del riñón aislado perfundido de rata. *Biochemical* 103(3): 852-862 Available at <http://www.biochemj.org/bj/103/bj1030852> (verified 27 November 2012).

NORÕES, T.B.S. 2009. Efeitos renais promovidos pelo veneno de serpente *Bothrops atrox* e a produção de óxido nítrico. Dissertação (Mestre em Farmacologia) Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, Fortaleza. 1–85.

OTERO, R; MESA, M.B; DUQUE, E; GUTIÉRREZ, J; ARANGO, J.L; GÓMEZ, F; TORO, A; CANO, F; RODRÍGUEZ, L.M; CARO, E; MARTÍNEZ, J; CORNEJO, W; GÓMEZ, L.M; URIBE, F.L; CÁRDENAS, S; NÚÑEZ, V AND DÍAZ, A. 2002. Complications of *Bothrops*, *Porthidium*, and *Bothriechis* snakebites in Colombia . A clinical and epidemiological study of 39 cases attended in a university hospital. *Toxicon* 40: 1107–1114 Available at <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0041010102001046> (verified 20 May 2013).

PALACIOS, J.M Y ZARTA, E.F. 2009. Estudio químico y de toxicidad del veneno de serpientes de la familia Viperidæ *Bothrops atrox* mantenidas en cautiverio en el serpentario de la Universidad de la Amazonía. Tesis (Biólogo con énfasis en Biorrecursos) Facultad De Ciencias Basicas Universidad De La Amazonía. Caquetá. 1-66.

PAREDES, A.E. 2012a. Informe del evento accidente ofídico final año 2012. Instituto Nacional de Salud. 1-22.

PAREDES, A.E. 2012b. Informe del evento accidente ofídico hasta el periodo epidemiológico 13 de 2011. Instituto Nacional de Salud. 1-24.

PATIÑO, C Y STELLA, B. 2002. Serpientes Venenosas. *Boletín GEAS* 212(1): 37–42.

PERDIGÃO, C. 2011. Estudo in vitro da nefrotoxicidade do veneno total e fração fosfolipase A_2 da serpente *Bothropoides insularis* (amaral, 1921). Dissertação (Mestre em Ciências Farmacêuticas) Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, da Universidade Federal do Ceará. Fortaleza. 1-101.

PINEDA, D; GHOTME, K; ALDECO, M.E Y MONTOYA, P. 2002. Accidentes ofídicos en Yopal y Leticia, Colombia , 1996-1997. *Biomedica*. 22: 14–21.

- RESTREPO, A.M Y PEÑA, A.M. 2007. Accidente ofídico. Actualización y manejo. Public Global of Medicine. 1–19.
- ROSS, B.D. 1978. The isolated perfused rat kidney. Clin. Sci. Mol. Med. 55: 13-21.
- SALINAS, E.M; RAMÍREZ, L.I.M; ORTUÑO, L.E.G; DÍAZ, L.A.C Y GONZÁLEZ, L.A.C. 2008. Enfermedad glomeruloquística en dos perros con insuficiencia renal. Vet méx. 39(5): 97–107
- SIMON, H.U; HAJ-YEHIA, A AND LEVI-SCHAFFER, F. 2000. Role of reactive oxygen species (ROS) in apoptosis induction. Apoptosis 5(5): 415-418 Available at [://dx.doi.org/10.1023/A%3A1009616228304](http://dx.doi.org/10.1023/A%3A1009616228304) (verified 24 May 2013).
- SOUSA, F.C. 2004. Efeito renal do veneno da *Bothrops erythromelas* e bloqueio induzido pelo fator antibotrópico do *Didelphis marsupialis*. Dissertação (Mestre em Farmacologia) Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Universidade Federal do Ceará. Fortaleza 1-128.
- VERA, L; TEIXEIRA, C.F.P; TAMBOURGI, D.V AND GUTIÉRREZ, J.M 2000. Increments in serum cytokine and nitric oxide levels in mice injected with *Bothrops asper* and *Bothrops jararaca* snake venoms, Toxicon, 38 (9), 1253-1266, Available at [http://dx.doi.org/10.1016/S0041-0101\(99\)00227-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0041-0101(99)00227-5) (verified 15 March 2013).