

**EVALUACION DEL EFECTO DEL VENENO DE *Bothrops asper* (Serpentes:
Viperidae) SOBRE FIBRINOGENO HUMANO Y LA NEUTRALIZACION
PRODUCIDA POR SUEROS ANTIOFIDICOS POLIVALENTES COLOMBIANOS**

RAFAEL ALEJANDRO CAMAYO CONCHA

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

POPAYÁN, 2010

**EVALUACION DEL EFECTO DEL VENENO DE *Bothrops asper* (Serpentes:
Viperidae) SOBRE FIBRINOGENO HUMANO Y LA NEUTRALIZACION
PRODUCIDA POR SUEROS ANTIOFIDICOS POLIVALENTES COLOMBIANOS**

RAFAEL ALEJANDRO CAMAYO CONCHA

DIRECTOR: M. Sc. JOSE BELTRAN VIDAL

PROFESOR DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA UNIVERSIDAD DEL CAUCA

CODIRECTOR: Ph. D. LUIS FERNANDO ARBELAEZ RAMIREZ

**DOCENTE INVESTIGADOR DE LA FACULTAD DE CIENCIAS BASICAS DE LA
UNIVERSIDAD DE PAMPLONA, NORTE DE SANTANDER. COLOMBIA**

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

POPAYÁN, 2010

Nota de aceptación

José Toribio Beltrán Vidal
Director

Julieta B. Montero C.
Jurado

Fabio A. Cabezas F.
Jurado

Fecha de sustentación: Popayán 7 de Septiembre de 2010

*Este trabajo es
dedicado a mi
Madre a mi Padre
a mi Hermana a
Milo y a Nano.*

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a mi Papá que me ha enseñado el valor de la honradez y la verdadera y bella convicción de ponerla en práctica toda la vida, gracias papá por sentirme orgulloso de ti, también gracias por enseñarme que la fuerza en los ideales se hace y los hacen realidad. A mi hermana por su gran responsabilidad y cariño, y por haber sido infaltable para auxiliarme en lo que a veces escaseaba. Agradezco a mi Mamá por todo su cariño, apoyo, amor y por la vida que me ha regalado diariamente sin condición alguna, verdaderamente no hay palabras suficientes para tan hermoso ser humano. A ellos los seres mas importantes de mi vida por haberme dado todos los medios para la realización de esta Investigación. Sin su presencia, no hubiera podido conseguir todo lo que he podido conseguir por mi mismo. Los amo.

Agradezco a que aun hay personas, como el Doc. Luis Fernando Arbeláez, dispuestos a colaborar a jóvenes investigadores en el camino del descubrimiento, a crear nuevas maneras de pensamiento acerca de todo lo que nos rodea, agradezco de que es un “paisa jodido” y un científico de admirar del cual hay mucho que aprender, y por supuesto por ser codirector de esta investigación. Agradezco a los verdaderos compañeros como el profesor José Toribio Beltrán, por ser mi director de Tesis y ser completamente amable y diligente en todo lo necesario para llevar esta investigación a buen fin.

Agradezco a Giselle Zambrano, Patricia Vélez y Diego Macías porque a pesar de no haber estado relacionados con esta investigación han sido ejemplos para mí por su apasionada manera de seguir su carrera de Docentes e Investigadores en la Biología, además de todos los buenos consejos que me han regalado en el transcurso de mi carrera universitaria. Un agradecimiento muy especial a William García por creer en los buenos proyectos y por ayudarme tenazmente en los trámites realizados para la consecución de mi viaje a Pamplona. Docentes realmente valiosos para el programa Unicaucano de Biología.

Gracias al Dr. Rafael Otero de la Universidad de Antioquia, al Dr. José María Gutiérrez del Instituto Clodomiro Picado de Costa Rica y a Claudia Carolina Gay de la Universidad Nacional del Nordeste de Argentina, con mucho aprecio les agradezco a ellos, investigadores tan importantes, tan reales y humildes que ni su título ni su posición en la ciencia les quita ni resta tiempo para contestar un correo electrónico y dar una asesoría vía internet. Verdaderos investigadores entregados al avance del conocimiento.

Agradezco a Pamplona, a la familia Lizcano por acogerme en su hogar como a un hijo, en especial a Tatiana por haberme apoyado, acompañado y enseñado que la vida prepara cosas buenas para nosotros siempre que nos levantamos luego de las derrotas. Agradezco inmensamente a Carolina Pabón por haber sido mi guía

en laboratorio y en la vida misma por compartir su experiencia conmigo, agradezco de igual manera a su familia encantadora que gran afecto me mostro. A Jenny Dimelza Gomez por estar atenta y dispuesta a colaborar en algunas prácticas de laboratorio. A ellas dos agradezco por ser un ejemplo a seguir. Agradezco a los amigos que este impenetrable pueblo me presento, a Roberto y a los muchachos, agradezco a las hermosas vivencias que Pamplona me regalo. Agradezco a doña Elizabeth Fernández por haberme hospedado y haber compartido parte de su tiempo y familia conmigo durante 4 meses. Agradezco a Nancy Mogollón y a sus hijos, tres preciosos ángeles.

Agradezco a los amigos de siempre, los que me dieron fuerza para continuar, a Moure a Ivón a Riky a Jake, agradezco a esos amigos como José Ignacio y como Jhon que con su apoyo y con su humanidad han vuelto mi mente y mi ciencia mas humana. Agradezco enormemente a Anny que me ha enseñado tanto de la investigación científica y de la vida, le agradezco por su cariño y amor condicionado a las impurezas del tiempo e ilimitado en el ir y venir de nuestra historia. Absolutamente le agradezco por que me enseñó que las ausencias no nos tienen que derrotar, pues tenemos que seguir luchando por nosotros mismos.

Gracias a los verdaderos científicos, investigadores y artistas de los cuales la gran mayoría no tienen título aun o no lo necesitan, sino que tienen los grandes momentos y recuerdos que la vida universitaria “academia” regala para que nuestra vida sea cada día mejor. Espero encontrarlos en el camino de nuevo.

Agradezco sinceramente a todos y a todo lo que me hizo y me hace dudar, sin ello no seguiría adelante.

Agradezco por ultimo a los inevitables sucesos que ocurren en el camino del descubrimiento, a las “personas” e “investigadores” que desafortunada pero al final afortunadamente conocemos, esos que evitan que se haga ciencia, a las instituciones que no se preocupan por contribuir y apoyar de manera básica a la investigación biológica, a los malos entendidos y a los que nunca apoyaron una causa como esta. Por que gracias a los tropiezos los verdaderos científicos se hacen, y se hacen con el carácter admirable que las personas nombradas en este aparte han conseguido.

Muchas gracias de nuevo.

Rafael

ÍNDICE.

Lista de acrónimos.	12
1.INTRODUCCION.....	13
2.PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	15
3.ANTECEDENTES	17
4. MARCO TEORICO.....	19
4.1. Las Serpientes.....	19
4.1.1. <i>Bothrops asper</i> (Garman 1884).....	19
4.2. Aspectos del envenenamiento botrópico	20
4.2.1. Veneno de <i>Bothrops asper</i>	21
4.3. Aspectos relacionados con el fibrinógeno.	22
4.3.1. Cascada actual de coagulación, Importancia del Fibrinógeno.....	23
4.4. Veneno y fibrinógeno.....	24
4.5. Seroterapia.....	26
5. OBJETIVOS	28
6. METODOLOGIA.....	29
6.1 Obtención del fibrinógeno.	29
6.2 Obtención del veneno y cuantificación.....	29
6.3 Sueros Antiofídicos.....	30
6.4 Geles de electroforesis SDS PAGE 12,5%	30
6.5 Reacciones.....	31
6.6 Equipos.....	31
7. RESULTADOS	32
7.1 Electroforesis unidimensional del veneno de <i>Bothrops asper</i> gel No 1	32
7.2 Caracterización de la destrucción del fibrinógeno por el veneno de <i>Bothrops asper</i> por medio de electroforesis unidimensional.....	33
7.2.1 Gel Fibrinógeno y diluciones de veneno de <i>Bothrops asper</i> . Gel No 2.....	33
7.2.2 Reacción de Fibrinógeno: veneno con las diluciones 1:100 y 1:1400 a 5 y 15 minutos. Gel No 3.....	35
7.2.3 Reacciones fibrinógeno veneno en una relación 1:400 con tiempo controlado. Gel No 4	36

7.3 Experimentos con sueros antiofídicos	37
7.3.1 Gel de neutralización con el suero antiofídico del Instituto Nacional de Salud. Gel No 5.....	38
7.3.2 Gel de neutralización con el suero antiofídico de Laboratorios Probiol. Gel No 6	38
8. ANÁLISIS DE RESULTADOS Y DISCUSIÓN	40
8.1.1 Electroforesis unidimensional del veneno de <i>Bothrops asper</i> gel No 1	40
8.1.2 Caracterización de la destrucción del fibrinógeno por el veneno de <i>Bothrops asper</i> por medio de electroforesis unidimensional.....	41
8.1.2.1 Gel de Fibrinógeno y diluciones de veneno de <i>Bothrops asper</i> . Gel No 2.....	41
8.1.2.2 Gel de reacción de Fibrinógeno: veneno con las diluciones 1:100 y 1:1400 a 5 y 15 minutos. Gel No 3.....	42
8.1.2.3 Reacciones fibrinógeno veneno en una relación 1:400 con tiempo controlado. Gel No 4 ..	42
8.1.2.4 Gel de electroforesis de reacción de neutralización del suero antiofídico del Instituto Nacional de Salud. Gel No 5	42
8.1.2.5 Gel de electroforesis de reacción de neutralización del suero antiofídico de Laboratorios Probiol. Gel No 6	42
8.2 DISCUSIÓN.....	43
8.2.1 Caracterización del veneno de <i>B. asper</i>	43
8.2.2 Caracterización de la destrucción del fibrinógeno por el veneno de <i>B. asper</i>	44
8.2.3 Neutralización del efecto destructor del veneno sobre el fibrinógeno humano.....	47
9. CONCLUSIONES	49
10.LITERATURA CITADA.....	68

Índice de Figuras

Figura 1.....	22
Figura 2:.....	24
Figura 3:.....	32
Figura 4:.....	33
Figura 5:.....	34
Figura 6:.....	36
Figura 7:.....	37
Figura 8:.....	38
Figura 9:.....	39
Figura 10:.....	40

Figura 11:.....	41
Figura 12:.....	43
Figura 13:.....	47
Figura 14:.....	64
Figura 15:.....	65
Figura 16:.....	66
Figura 17:.....	67

Índice de Tablas

Tabla 1:.....	33
Tabla 2:.....	35
Tabla 3:.....	36
Tabla 4:.....	40
Tabla 5:.....	51
Tabla 6:.....	52
Tabla 7:.....	52
Tabla 8:.....	53
Tabla 9:.....	53
Tabla 10:.....	54
Tabla 11:.....	54
Tabla 12:.....	55
Tabla 13:.....	55
Tabla 14:.....	56
Tabla 15:.....	57
Tabla 16:.....	58
Tabla 17.....	59
Tabla 18.....	59
Tabla 19.....	60
Tabla 20:.....	61
Tabla 21:.....	61
Tabla 22:.....	62
Tabla 23:.....	62

Indice de gráficas.

Gráfica 1: 62
Gráfica 2: 63
Gráfica 3: 63

Lista de acrónimos.

Fab:	Fragmento de unión con el antígeno (fragment antigen binding) digerido con papaína
F(ab)2:	Fragmento de unión con el antígeno (fragment antigen binding) digerido con pepsina
IgG:	Inmunoglobulinas G
INS:	Instituto Nacional de Salud
SDS PAGE:	Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis
SIVIGILA:	Sistema de Vigilancia Epidemiológica
OMS:	Organización Mundial de la Salud
PBS:	Phosphate buffered saline
PDF:	Productos de la Degradación del Fibrinógeno

1. INTRODUCCION

En Colombia los casos de ofidismo constituyen un problema de salud pública, que a pesar del subregistro que resulta de los pacientes tratados por la medicina tradicional, en la década de 1990 a 1999 se informaron en promedio cada año 2.675 mordeduras por serpientes (Registro SIS-12, Ministerio de Salud de Colombia, 1990-1998). El 90-95% son producidas por serpientes de los géneros *Bothrops*, *Porthidium*, *Bothriopsis*, *Bothriechis* y *Bothrocophias*, principalmente en Antioquia, Chocó y Amazonas, donde se registran anualmente cerca de 800 casos (120 de ellos en Amazonas), con una mortalidad del 3-8,9% y secuelas en el 6-9,9%, según estudios recientes (Otero R, 2007). En Colombia el accidente ofídico no era un evento de notificación obligatoria hasta octubre de 2004, fecha a partir de la cual se estableció como evento de interés en salud pública. Durante el año 2005 se notificaron a través del Sistema de Vigilancia Epidemiológica SIVIGILA 2161 casos de accidentes ofídicos confirmados clínicamente, siendo la especie *Bothrops asper* causante de la mayoría de los accidentes ofídicos en Centroamérica y Norte de Suramérica (Bolaños, 1982; Gutiérrez, 1995; Fan HW y Cardoso JL., 1995)

Dada la variedad topográfica y flora colombianas es frecuente encontrar serpientes hasta los 2.500 msnm. Las regiones más afectadas por accidente ofídico son: Orinoquía con 759 casos (35.1%), seguida por Costa Atlántica con 490 casos (22.6%), Centro Oriente con 411 casos (19%), Occidente con 319 casos (14.7%), y Amazonia con 182 casos (8.4%), siendo los departamentos más afectados Arauca, Meta, Cesar, Norte de Santander, Casanare, Guaviare, Cauca, Córdoba, Putumayo y Huila. (SIVIGILA. 2007).

Para la región suroccidental del país los mayores índices de ofidismo son causados por especies del género *Bothrops* (Ayerbe S. 2002). Habiendo manifestaciones clínicas locales y sistémicas, ocurriendo a su vez efectos paraclínicos dentro de los cuales, para este estudio, es de principal interés la disminución de los niveles de fibrinógeno ([FI]) por fibrinogenólisis y fibrinólisis y, ligados estrechamente a estos efectos y a este proyecto, el estudio de la paracoagulación por efecto de enzimas similares a la trombina con síndrome de coagulación intravascular diseminada (CID.); trombocitopenia, prolongación del tiempo de coagulación (TC), del tiempo de protrombina (TP), del tiempo de sangría (TS), del tiempo de trombina (TT) y del tiempo parcial de tromboplastina (TPT), aumento de los productos de degradación del fibrinógeno (PDF). (Ayerbe S. 2002).

En este estudio se caracteriza, por medio de electroforesis unidimensional, el efecto que tiene el veneno de *Bothrops asper* sobre el fibrinógeno humano, demostrando la degradación que causa sobre la biomolécula de una manera cualitativa y cuantitativa gracias los análisis densitométricos en electroforesis. Se presentan los diferentes pesos moleculares de los productos de la degradación del

fibrinógeno, de la misma manera que se muestra como el tiempo y las diferentes concentraciones del veneno son causantes directas de la aparición o desaparición de estos productos de la degradación, El tratamiento utilizado clínicamente para neutralizar la acción del veneno, que consiste en la administración de suero antiofídico, es llevado a cabo a nivel experimental en este estudio y demostrado mediante electroforesis unidimensional para evaluar la eficacia de los sueros antiofídicos utilizados en Colombia (Suero antiofídico polivalente del Insitituto Nacional de Salud y Suero antiofídico polivalente de Laboratorios Probiol) ante la destrucción del fibrinógeno causada por el veneno de la serpiente *Bothrops asper*. Creando a partir de esta tesis el desarrollo de nuevas preguntas de investigación sobre la biología de *B. asper* en el suroccidente colombiano y sobre la toxinología de su veneno desde un punto de vista ontogénico y geográfico.

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Ya que la administración de sueros antiofídicos constituye el más eficaz y seguro tratamiento ante envenenamiento por serpientes (Bolaños, 1982; Sullivan, 1987; Warrell, 1993; citados por Gutiérrez J. M, 1995), la evaluación de la efectividad neutralizante de los sueros antiofídicos polivalentes disponibles en el mercado ante fibrinogénesis es una herramienta pertinente para evaluar su calidad.

Dada la gran variación interespecífica e intraespecífica en la composición química y en las actividades farmacológicas de los venenos (Jiménez-Porras, 1964; Tu, 1977; Gutiérrez *et al.*, 1980), es necesario evaluar la capacidad neutralizante de los antivenenos que se distribuyen en un determinado país contra los venenos de mayor relevancia médica en dicha nación (Gutierrez J. M, 1995).

El conocimiento de los efectos hemorrágicos de los venenos de las serpientes del suroccidente colombiano es actualmente un problema de investigación, pues estudios realizados anteriormente en Antioquia y Chocó son los únicos que muestran registro para nuestro país (Otero R., *et al.*, 1992-2002) , no se han realizado aun pruebas *in vitro*, como las realizadas en Costa Rica por Gene y colaboradores en 1989, con las serpientes de nuestra región geográfica, solo se han notado resultados en prácticas clínicas gracias a médicos entrenados que han hecho el seguimiento y su reporte en este tipo de eventos, mas no se han realizado a nivel molecular las comprobaciones necesarias de los venenos, más específicamente de la especie *Bothrops asper* a nivel de fibrinógeno humano, ya que esta especie es una de las más recurrentes en ofidismo para nuestra zona geográfica (Ayerbe S. 2002).

En Colombia es necesario llevar a cabo estudios donde se evalué la habilidad enzimática de los venenos, como también la comparación de la neutralización de diferentes sueros ante un determinado tipo de veneno de una región geográfica determinada y la comparación de la neutralización de sueros para venenos correspondientes a especies de regiones geográficas diferentes. Entre los accidentes ofídicos en Colombia, del 90% al 95% son bothrópicos, el 2% lachésicos, el 1% crotálicos, el 1% elapídicos y los restantes por serpientes no venenosas. (Otero R, 1992; citado por Otero R 2007). La diversidad de serpientes en el territorio nacional hace elevado el índice de accidentes ofídicos lo cual genera por lo tanto una heterogeneidad en el tratamiento de los casos.

Por su gran biodiversidad, nuestro país posee abundante fauna ponzoñosa (reptiles y artrópodos). Lamentablemente, existe un gran subregistro de este tipo de accidentes. En consecuencia, Colombia produce principalmente sueros antiofídicos antiviperinos y polivalentes (INS y Probiol), (Otero R., *et al.*, 1992-2002). A pesar de sus pruebas y controles de calidad, en algunas regiones y casos son ineficientes, ya que las serpientes, los venenos, el almacenamiento de

muestras, el estrés ejercido sobre los animales en los serpentarios, entre otros factores variantes, son los causantes de las múltiples respuestas en el tratamiento de un paciente, repercutiendo esto en su futura mejoría.

La organización mundial de la salud ha recomendado que, adicionalmente a las pruebas de neutralización letal en modelos animales, la habilidad de los antivenenos para neutralizar otros efectos farmacológicos y enzimáticos de los venenos debieran ser evaluados (WHO, 1981; citado por Otero R, 1995)

El fibrinógeno, siendo este precursor de la fibrina, es una de las moléculas afectadas por las toxinas de serpientes del género *Bothrops*, su destrucción desencadena una serie de reacciones generando tipos de fibrina inestables que destruirán progresivamente componentes importantes de la sangre. Por eso la importancia de caracterizar la destrucción del fibrinógeno frente a una toxina de serpiente.

Se escogió para este trabajo una serpiente perteneciente al género *Bothrops* ya que son estas las causantes de mayor número accidentes ofídicos en Colombia, *Bothrops asper* fue la serpiente con la que se realizaron las pruebas puesto que posee una toxina que se ha venido investigando por la comunidad científica desde hace ya algunos años además de ser uno de los animales más recurrentes en el serpentario de la Universidad del Cauca.

Con la evaluación por medio de electroforesis SDS PAGE la degradación de fibrinógeno se podrá evidenciar, realizando así una caracterización de la toxina de *B. asper* bajo parámetros concernientes a la degradación de las cadenas α o β del fibrinógeno.

La progresiva neutralización del veneno sobre el fibrinógeno, gracias a los sueros antiofídicos polivalentes, será también evidenciada por medio del mismo método electroforético observándose la recuperación de las cadenas afectadas del fibrinógeno. Respaldándose en estudios previos realizados en Argentina por la Dra. Silvana L. Mañurak en 2066 y 2004. Al mismo tiempo por medio de este procedimiento se comprobará la eficacia de un suero frente al otro.

De esta manera se plantea la pregunta para desarrollar en este estudio de cómo el veneno de la serpiente *Bothrops asper* del suroccidente colombiano (Tambo, Cauca) afecta al fibrinógeno humano y en que manera se producen y cuales son los pesos moleculares de los productos de la degradación del fibrinógeno PDF, que son unos de los principales causantes de la alteración de la coagulación en un ofidismo. Junto a este planteamiento también se formula la pregunta sobre si los sueros antiofídicos comercializados en Colombia son efectivos ante el ataque del veneno directamente sobre el fibrinógeno o si este actúa de alguna manera reteniendo los productos ya formados evitando su acción sobre la hemostasia.

3. ANTECEDENTES

En el estado del arte relacionado con la investigación científica sobre el veneno de *Bothrops asper* del departamento del Cauca y sobre todo trabajos tan pertinentes realizados en la Universidad del Cauca, cabe destacar el trabajo de Nancy Patricia Mosquera titulado Efecto antiinflamatorio del extracto de la raíz de la planta *Polygala panicula* en ratones inoculados con dosis subletal de *Bothrops asper* (*Serpentes: Viperidae*) en 2008. Y el trabajo realizado por Andrea Coronel titulado Determinación del efecto citotóxico del veneno de *Bothrops asper* (*Serpentes: Viperidae*) en linfocitos humanos y células mononucleares de sangre periférica in vitro, mediante los ensayos de índice mitótico, viabilidad celular y apoptosis en 2008.

En varios ensayos clínico-terapéuticos aleatorizados realizados en humanos a través del mundo, se ha demostrado la eficacia de los antivenenos de IgG, F (ab')₂ y Fab para el tratamiento de las mordeduras de serpientes, permitiendo a su vez establecer su dosificación (Theakston RDG., *et al*, 1992; Ho M., Warrell DA., Looareesuwan S., *et al*, 1986; Malasit P., Warrell DA., Chantavanich P., *et al*, 1986; Smith DC., *et al*, 1992; Cardoso JLC., Fan HW., Franca FOS., *et al*. 1993; Jorge MT., Cardoso JLC., Castro SCB., *et al*. 1995; Dart RC., MacNally J., 2001).

En Argentina se utilizan tres tipos de sueros antiofídicos frente a la mordedura de crotálicos, el Anticrotálico Monovalente, contra el veneno de *Crotalus durissus terrificus* ("víbora de cascabel"), el Botrópico Bivalente y el Botrópico Tetravalente ("Misiones") contra los venenos de las diferentes especies de *Bothrops* que se encuentran en la Argentina (las diferentes "yarára"). Además, existe un suero Botrópico-Crotálico (Trivalente) el cual cubriría el mismo espectro que el Bivalente más el Anticrotálico. Se ha estudiado la reactividad inmunoquímica de los sueros antibotrópicos Bivalente y Tetravalente, del Botrópico Crotálico (Trivalente) y del Anticrotálico Monovalente con el veneno de *Bothrops jararacussu* ("yaráracuzú", "tapete dourado"). Además, de la capacidad neutralizante de estos antivenenos sobre la potencia letal, y las actividades hemorrágica, necrotizante, procoagulante y hemolítica indirecta del veneno de *B. jararacussu* (Adolfo R. 1999). Para argentina también se cuentan estudios realizados acerca del consumo de fibrinógeno plasmático en ratones por acción de enzima con actividad trombínica presente en el veneno de cascabel del nordeste argentino, elaborado por Silvana L. Maruñak en el 2004.

En Costa Rica se han realizado pruebas por Gene y colaboradores en 1989, sobre las actividades coagulante, defibrinante, fibrinogenolítica, fibrinolítica de venenos

de córalos y su neutralización por un suero antiofídico polivalente costarricense. También se ha evaluado la capacidad de cuatro antivenenos comerciales para neutralizar el veneno de la serpiente *bothrops asper* (terciopelo) de Costa Rica, llevado a cabo por el Instituto Clodomiro Picado, la Facultad de Microbiología y Universidad de Costa Rica, en San José de Costa Rica por Jose Maria Gutierrez y colaboradores en 1995. Se suman a este tipo de estudios investigaciones como: la Evaluación de antivenenos en la neutralización de hiperalgesia y edema inducido por los venenos de las serpientes *Bothrops jararacá* y *Bothrops asper*. realizado en colaboración del Instituto Butantan y el Instituto Clodomiro Picado de San Jose de Costa Rica por Y. Cury y colaboradores en el 2002. La habilidad de seis antivenenos latinoamericanos para neutralizar el veneno de mapaná equis (*Bothrops atrox*) de Antioquia y Choco (Colombia). y la capacidad neutralizante de un Nuevo antiveneno monovalente anti *Bothrops atrox*: comparación con dos antivenenos comerciales. Y trabajos realizados por Rafael Otero y Colaboradores por la Universidad de Antioquia en conjunto con el Instituto Clodomiro Picado en 1995 y 1997 respectivamente.

Los estudios más recientes prueban la eficacia de los faboterapicos ante los sueros de inmunoglobulinas G completas como: Accidente bothrópico en Colombia: estudio multicéntrico de la eficacia y seguridad de Antivipmyn-Tri®, un antiveneno polivalente producido en México. Trabajo realizado por el conjunto de diferentes hospitales de Antioquia, Choco, Amazonas y la Universidad de Antioquia. (Otero R. 2007).

4. MARCO TEORICO

4.1. Las Serpientes

Las serpientes son animales vertebrados, de forma alargada, con cabeza, cuerpo y cola; carecen de extremidades y están cubiertos de escamas. Pertenecientes al phylum Cordata, clase Reptilia (Laurenti, 1768), orden Squamata, (Oppel, 1887) suborden Serpentes (Linnaeus 1758). Se calculan entre dos mil quinientas a tres mil el número total de especies subtropicales donde encuentran condiciones más adecuadas para su desarrollo y multiplicación (Angel R, 1987)

La mayoría de las serpientes son terrestres, algunas arborícolas, y casi todas se desplazan con gran facilidad en el agua. Existe además un grupo bien diferenciado: el de las serpientes marinas, que son de vida estrictamente acuática. De las serpientes terrestres se estima que la mayoría son inofensivas y solo el 10 a 15% son verdaderamente venenosas y peligrosas para el hombre. En Colombia, país de variada topografía y formaciones vegetales, son abundantes y se encuentran desde las aguas del océano pacífico y el nivel del mar, hasta alturas de 3000 metros aproximadamente. (Angel R, 1987)

4.1.1. *Bothrops asper* (Garman 1884).

Serpiente venenosa perteneciente a la familia Viperidae a la subfamilia Crotalinae, también llamada terciopelo, distribuida en Centro América y Suramérica, desde el noreste de México hasta la vertiente pacífica y tierras bajas de la costa del Ecuador y noroccidente del Perú (Peters y Orejas-Miranda 1986; Solórzano y Cerdas 1989; Campbell & Lamar 1989, 2004; citados por Cisneros D. y Touzet J., 2004). El color de fondo es pardo claro o pardo rojizo, gris o rosáceo. Presenta un patrón dorsal de 18 a 25 manchas en forma de diamante bordeadas por líneas de escamas blancas y un centro más claro. Los ápices de los diamantes apuntan hacia la línea media del cuerpo y sus bases hacia el vientre dando un patrón en forma de "X" o de zigzag. La barbilla, el vientre y la cola son blanco amarillentos o crema. Tiene un cuerpo grueso. Terrestre y nocturno, es abundante en zonas de vegetación secundaria y acahuales, los cuales recorre en busca de roedores asociados al hombre. Es extremadamente venenoso. Generalmente no es agresivo, pese a ser la especie que más accidentes causa en México por las circunstancias en que ocurren sus mordeduras (Hardy, 1994). Prefiere hábitat en áreas húmedas hasta los mil ciento cincuenta metros sobre el nivel del mar. Es común en la selva tropical perennifolia o zona de pastizal natural o inducido.

Se le puede hallar en las horas del día enrollada entre la hojarasca de la selva o entre los troncos caídos. Se alimenta de vertebrados, principalmente de roedores. Los juveniles predan sobre lagartijas, sapos y ranas, insectos y otros invertebrados, pero cambian sus hábitos alimenticios a mamíferos conforme maduran (Lee, 2000). Es de reproducción ovovivípara. Llega a tener hasta

noventa crías. Datos para Costa Rica indican que esta especie puede tener de cinco a ochenta y seis crías (Lee, 1996).¹

4.2. Aspectos del envenenamiento botrópico

De modo didáctico se describen tres actividades fisiopatológicas en el envenenamiento botrópico: Proteolítica, definida también como una acción inflamatoria aguda, coagulante y hemorrágica (Sivigila, 2007). La actividad inflamatoria aguda (proteolítica) es causada por fracciones bioquímicamente heterogéneas y con especificidades diversas, responsables de los efectos locales generando gran edema y actuando directamente sobre las proteínas presentes en el medio o en las células, destruyéndolas de forma casi inmediata, dependiendo del lugar donde sea inyectado el veneno y siendo responsables de los efectos locales generando: dolor intenso en la zona afectada, hemorragia, formación de edema, dermonecrosis, mionecrosis y gangrena, descenso de la presión arterial, aparición del síndrome de coagulación intravascular diseminada con la consecuente hipoxia, agravando el edema y la necrosis residual, hemólisis, desfibrinación, trombocitopenia, hemorragias en otros órganos, nefrotoxicidad y síndrome compartimental entre otros (Yarleque A, 2003; Otero R, 2007; Ayerbe S, 2002; Sivigilia 2007). Es necesario resaltar que en el proceso inflamatorio local agudo participa la actividad coagulante desencadenando la formación de trombos microvasculares con la consecuente hipoxia, agravando el edema y la necrosis residual. La actividad coagulante hace referencia a la capacidad del veneno bothrópico para activar factores de coagulación sanguínea, ocasionando consumo de fibrinógeno y formación de fibrina intravascular, induciendo con frecuencia incoagulabilidad sanguínea. La actividad hemorrágica debida a componentes específicos denominados hemorraginas que afectan la integridad del endotelio vascular, degradan componentes de la matriz extracelular como el colágeno e inhiben la agregación plaquetaria.

Entre los hallazgos paraclínicos encontrados frente a un envenenamiento botrópico están: elevación de los indicadores de fase aguda (proteína C reactiva), leucocitosis con desviación a la izquierda, anemia hemolítica microangiopática, disminución de los niveles de fibrinógeno ([FI]) por fibrinogenólisis, fibrinólisis; paracoagulación por efecto de enzimas similares a la trombina con síndrome de coagulación intravascular diseminada (CID.); trombocitopenia, prolongación del tiempo de coagulación (TC), del tiempo de protrombina (TP), del tiempo de sangría (TS), del tiempo de trombina (TT) y del tiempo parcial de tromboplastina (TPT), aumento de los productos de degradación del fibrinógeno (PDF). También puede haber hematuria micro a macroscópica, hiperbilirrubinemia indirecta, elevación de aspartato aminotransferasa (AST), aspartato alaninotransferasa (ALT), creatino-fosfoquinasa (CPK) y lacto-deshidrogenasa (LDH); elevación de la creatinina sérica y del nitrógeno ureico sanguíneo (BUN), elevación de los niveles

¹ Tomado de Enciclopedia virtual de las serpientes http://www.serpientes-snakes.com.ar/superfamilias/bothrops_asper.htm

de potasio ([K⁺]) sérico y acidosis metabólica si coincide con insuficiencia renal aguda. (Ayerbe S, 2002)

Los venenos de serpientes de la familia Crotalinae pueden inducir a una variedad de alteraciones sobre la coagulación sanguínea. La actividad coagulante hace referencia a la capacidad del veneno bothrópico para activar factores de coagulación, ocasionando consumo de fibrinógeno y formación de fibrina intravascular, induciendo con frecuencia incoagulabilidad sanguínea, por contener componentes procoagulantes y anticoagulantes. Algunos venenos promueven la coagulación sanguínea por sus proteinasas tipo trombina, otros poseen activador de factor X y/o activadores de protrombina. Por otro lado, los venenos de serpientes del género *Bothrops* poseen actividades específicas tales como fibrinolítica y fibrinogenolítica. Con frecuencia los envenenamientos afectan la hemostasia e inducen a un síndrome de defibrinación, que constituye una característica importante, entre los efectos sistémicos, causados por estos venenos (Siviglia, 2007; Ruiz de Torrent R. M, 2006)

La actividad hemorrágica debida a componentes específicos denominados hemorraginas que afectan la integridad del endotelio vascular, degradan componentes de la matriz extracelular como el colágeno e inhiben la agregación plaquetaria, sangrado por superficies mucosas y luego se presentan a cualquier nivel; shock mixto, microtrombosis masiva capilar pulmonar y/o mesentérica. Debido a las importantes funciones que realiza la sangre, la hemorragia es uno de los síntomas más severos que se presenta durante un cuadro de ofidismo, siendo tan grave que por sólo esta causa una persona puede fallecer, puesto que la falta de metabolitos y especialmente la carencia de oxígeno produce daños irreversibles en órganos vitales (Siviglia, 2007; Ayerbe S, 2002; Yarleque A, 2003).

4.2.1. Veneno de *Bothrops asper*

Los venenos de los vipéridos inducen desfibrinogenación como consecuencia de la acción procoagulante de los componentes del veneno en el sistema de coagulación *in vivo*, desde que causan microtrombina en la circulación con el concomitante consumo de fibrinógeno y la activación del sistema fibrinolítico, el cual resulta con la aparición de los productos de degradación del fibrinógeno (White J., 2005). Estos efectos son resultados de pruebas de laboratorio llevadas a cabo sobre las serinproteinasas de *B. asper*, así también como todos los tiempos de coagulación, tiempo de protrombina tiempo parcial de tromboplastina activada (Barrantes A, Solis V, Bolaños R., 1985; Rucavado A, Soto M, Escalante T, Loría GD, Arni R, Gutiérrez JM., 2005; Gutiérrez JM, Rucavado A, Escalante T, Díaz C. 2005; White J., 2005).

4.3. Aspectos relacionados con el fibrinógeno.

El Fibrinógeno es una glicoproteína de gran tamaño (340 KDa) formada por tres pares de cadenas polipeptídicas diferentes (A α , B β y γ) unidas por puentes disulfuro. La molécula de estructura alargada (45 nm de longitud y 9 nm de diámetro) está dividida en tres secciones: el nódulo central, llamado dominio E, está formado por los 6 extremos aminoterminal de las cadenas proteicas, unidos por puentes disulfuro, mientras los dos nódulos externos D están formados por los extremos carboxi-terminal. Los segmentos centrales de las tres cadenas polipeptídicas se enrollan formando una triple α -hélice, conocida como hélice enrollada (región *coiled-coil*) que proporcionan flexibilidad y estabilidad mecánica a la molécula. El extremo carboxi-terminal de la cadena A α , llamado dominio α C, es un brazo flexible que puede variar su posición y conectarse con otras moléculas de Fibrinógeno. (Lauricela AM, 2007) Figura 1.

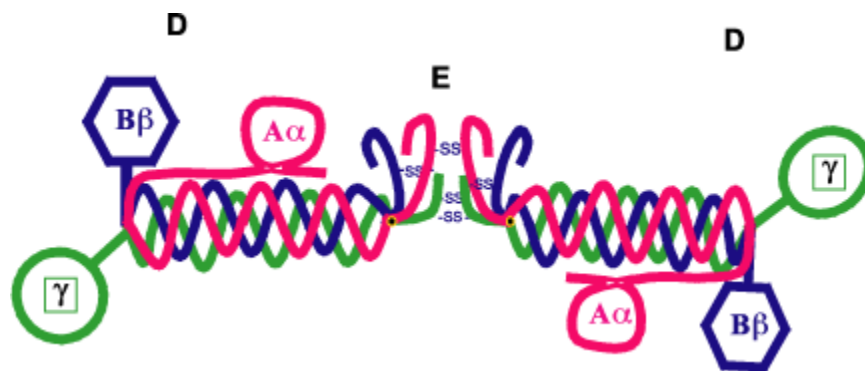


Figura 1: Esquema de la molécula de Fibrinógeno. Cada color representa una cadena polipeptídica. Tomado de Ana María Lauricella 2007

Se convierte a fibrina por acción de la trombina que hidroliza los fibrinopéptidos A y B en la secuencia Arg¹⁶-Gly¹⁷ de la cadena α y Arg¹⁴-Gly¹⁵ de la cadena β . La cadena α contiene 610 residuos de aminoácidos (a.a.) y un peso molecular de 66 kDa, mientras que la β 461 a.a. y un peso molecular de 52 kDa y la cadena γ 411 a.a. y un peso molecular de 46 kDa, lo que le da a la molécula de Fibrinógeno un total de 2964 residuos de a.a., esto en conjunto con la contribución de los carbohidratos da un peso molecular de 340 kDa (Doolittle RF, 1981). Tiene una concentración plasmática de 3 mg/ml y diferentes funciones biológicas especialmente involucradas en las últimas reacciones de la cascada de la coagulación y en el taponamiento definitivo de las lesiones vasculares que se forman constantemente en el endotelio, convirtiéndose a su vez en los cimientos sobre los cuales se desarrolla el Sistema Fibrinolítico (Arbeláez Ramírez L. F., 2007).

4.3.1. Cascada actual de coagulación, Importancia del Fibrinógeno

Las aportaciones a la cascada clásica son las siguientes:

1. El complejo formado por el factor tisular y el factor VII participa en la activación del factor IX, por lo que las dos vías de la coagulación, intrínseca y extrínseca, van unidas casi desde el inicio del proceso.
2. El proceso completo no se realiza de forma continua, sino que son precisas tres fases consecutivas; inicial, de amplificación y de propagación. En las dos últimas participan activamente la plaqueta y la trombina. Ver Figura 2.

Fase inicial

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

Fase de amplificación

La trombina así formada, junto con el calcio de la sangre y los fosfolípidos ácidos, que provienen de la plaqueta, participa activamente en un proceso de retroalimentación para la activación de los factores XI, IX, VIII y V y, de forma especial, para acelerar la activación de la plaqueta. Simultáneamente, por mecanismos quimiotácticos, los factores mencionados son atraídos a la superficie de las plaquetas donde tienen lugar de forma muy rápida importantes procesos de activación y multiplicación.

Fase de propagación

La amplificación del proceso por mecanismos de retroalimentación entre trombina y plaqueta y la activación de todos estos factores permiten activar grandes cantidades del factor X y formar el complejo protrombinasa para convertir la protrombina en trombina y, a expensas de ésta, el fibrinógeno en fibrina. El proceso final, siempre en la superficie de la plaqueta, se acelera para generar de forma explosiva grandes cantidades de trombina y fibrina. (Schafer A.I. *et al*, 1994; Monroe D. M. *et al*, 1994; Caterina R. D. *et al*, 2007)

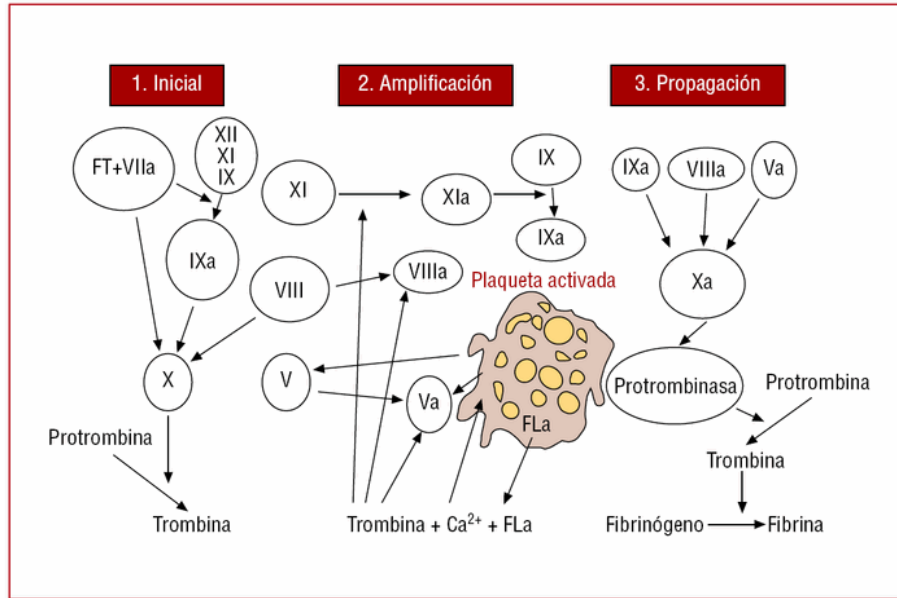


Figura 2: Fases de la coagulación según la nueva cascada. a: activado (los números romanos representan los factores de la coagulación); Ca^{2+} : calcio. FLa: fosfolípidos ácidos; FT: factor tisular. Tomado de Pérez F, 2007

4.4. Veneno y fibrinógeno

Los venenos de serpientes son secreciones de naturaleza seromucosa que de forma muy general y atendiendo criterios fármaco-cinéticos, se pueden clasificar en toxinas o enzimas (Chippaux y Goyffon, 1998; Pérez y Sánchez, 1999).

Toxinas: Son proteínas de peso molecular variable, generalmente menos de 30kDa, que tienen como blancos, a receptores específicos de membranas celulares. Su especificidad puede ser neurológica, cardiovascular, muscular o no diferenciada de acuerdo a la distribución de sus receptores diana. Su efecto farmacológico es proporcional a la cantidad de toxina introducida, es decir son dependientes de la dosis. Los venenos de elápidos son ricos en toxinas (Chippaux y Goyffon, 1998).

Enzimas: Son abundantes en vipéridos, también son proteínas pero sus pesos moleculares son generalmente mayores a los de las toxinas. Sus propiedades catalíticas (lo cual las diferencia de las toxinas) tienen dos efectos principales. Primero, su producto de degradación, así sea tóxico, no tiene, en principio, propiedades inmunogénicas para el organismo envenenado. Segundo, sus efectos farmacológicos dependen más del tiempo que de la dosis (Chippaux y Goyffon, 1998).

La función primaria de los venenos de serpiente es una rápida inmovilización de la presa; una función secundaria es de mecanismo de defensa, los venenos de los vipéridos principalmente causan hemorragias y desórdenes en la coagulación así como también son una fuente rica de proteínas farmacológicamente activas y péptidos para el estudio de la cascada de coagulación como para receptores glicoproteicos plaquetarios (Wijeyewickrema LC, Berndt MC y Andrews RK, 2005)

En una clasificación menos general las sustancias presentes en los venenos de serpientes se pueden dividir en:

Neuro- y/o Mio-Toxinas: Las más importantes son las neurotoxinas presinápticas con actividad fosfolipásica y las neuro-toxinas post-sinápticas parecidas al curare.

Toxinas: que se acoplan de receptores membranales induciendo citólisis.

Hemorraginas (SVMPs): Causan daño a endotelios vasculares.

Factores: que influyen la coagulación sanguínea: Son numerosos pero la mayoría son enzimas que convierten el fibrinógeno en fibrinopéptidos.

Enzimas: Tienen estructura y actividad variadas pero generalmente muestran menos toxicidad que las neuro-toxinas. (Chippaux & Goyffon, 1998)

Entre los componentes importantes del veneno de las serpientes que afectan el fibrinógeno se encuentran las hemorraginas (SVMP, Snake venom metalloproteinases) o metaloproteinasas y las serinmetaloproteinasas (R. Manjunatha Kini, 2006).

Las Metaloproteinasas (SVMP) son enzimas endoproteicas, su actividad catalítica es dependiente de iones Zn^{+2} (Bjarnason, J. B. y Fox, J. W., 1995; Fox, J. W. and Serrano, S. M. T., 2005). Algunas metaloproteinasas inhiben la coagulación sanguínea. Muchas metaloproteinasas son fibrinogenasas y liberan péptidos de la parte C-terminal del fibrinógeno. Son clasificadas dentro α - y β - fibrinogenasas en base a su especificidad por las cadenas $A\alpha$ o $B\beta$ del fibrinógeno (Ouyang, C. and Teng, C. M., 1976).

Las serinmetaloproteinasas en adición a su contribución de la digestión de la presa, afecta varias funciones fisiológicas. Afectan la agregación plaquetaria, la coagulación sanguínea, fibrinólisis, el sistema del complemento, presión sanguínea y sistema nervioso (Markland, F. S., 1998; Meier, J. y Stocker, K., 1991; Braud, S., Bon, C. y Wisner, A., 2000; Kini, R. M., 2004; Kornalik, F., 1991; Kini, R. M., Rao, V. S. y Joseph, J. S., 2002; Kini, R. M., Joseph, J. S. y Rao, V. S., 2002; Joseph, J. S. y Kini, R. M., 2004; Kini, R. M., 2005). Un grupo de serinproteinasas,

llamadas TLEs (Trombin like enzymes) agotan el fibrinógeno y hacen el plasma incoagulable. Son ampliamente distribuidas dentro de muchos géneros de los víperidos (*Agkistrodon*, *Bothrops*, *Crotalus*, *Lachesis* and *Trimeresurus*) (Pirkle, H. y Stocker, K., 1991; Bell, Jr, W. R., 1997; Pirkle, H. y Theodor, I., 1998).

4.5. Seroterapia

La administración parenteral de antivenenos de origen equino constituye el recurso más aceptado a nivel mundial para el tratamiento de los envenenamientos por mordeduras de serpiente (Bolaños, 1982; Sullivan, 1987; Warrell, 1993). Dada la gran variación interespecífica e intraespecífica en la composición química y en las actividades farmacológicas de los venenos (Jiménez-Porras, 1964; Tu, 1977; Gutierrez *et al.*, 1980), es necesario evaluar la capacidad neutralizante de los antivenenos que se distribuyen en una determinada nación contra los venenos de mayor relevancia médica en dicho país. Por recomendación de la Organización Mundial de la Salud (OMS), los antivenenos utilizados en un país deben ser evaluados en su capacidad neutralizante no solo del efecto letal sino también de otras actividades farmacológicas y enzimáticas de los venenos de serpientes contra los cuales se va a utilizar el antiveneno (World Health Organization, 1982).

El suero antiofídico puede ser:

POLIVALENTE: Se utiliza para tratamiento provocados por accidentes Bothrópico (mapaná), Crotálico (cascabel) y en algunos sueros por reacción cruzada el Lachésico (verrugosa).

MONOVALENTE: Usados exclusivamente para la mordedura de un solo tipo de serpientes y pueden ser:

- **ANTIBOTRHOPICO:** Contra la mordedura de mapaná, taya x, cuatro narices.
- **ANTICROTALICO:** Contra mordedura de cascabel
- **ANTILACHESICO:** Contra mordeduras de verrugosa, surucucú
- **ANTICORAL:** Contra mordedura de corales

En el país se producen y comercializan sueros polivalentes y monovalentes antibothrópicos, no así el anticrotálico ni el antilachésico; por tanto frente a un accidente ofídico ocasionado por estos géneros se usará el polivalente (SIVIGILIA, 2007)

El antiveneno es una preparación estéril que contiene Inmunoglobulinas obtenidas del suero inmunizado de animales por purificación. Los antivenenos polivalentes son desarrollados al administrar al animal inmune un conjunto de venenos de varias especies diferentes, la elección de cada tipo depende de muchos factores; además el suero polivalente puede dar mejor protección, porque un conjunto de venenos puede actuar en algunos casos para inducir un sinergismo de la respuesta inmune optima; en contraste, los sueros monovalente pueden producir menos reacciones (Ministerio De Salud Dirección General De Medicamentos Insumos Y Drogas del Perú, 2007)

El proceso de purificación se realiza a través de precipitaciones sucesivas con sulfato de amonio, todos los materias primas, el producto en proceso, el granel y el producto final se le realiza controles de calidad, siguiendo los lineamientos dados por el protocolo de la OMS y por la farmacopea americana, muestras de todos los lotes son enviadas a los laboratorios de control de calidad de la autoridad regulatoria INUMA (Organización Panamericana de la Salud, 2007).

La búsqueda de antivenenos con menores reacciones adversas ha sido intensa en la última década. Así de los antivenenos a base de Inmunoglobulina G total, se ha pasado a la producción de gammaglobulina digerida enzimáticamente: obteniendo fracciones altamente purificadas Fab y más recientemente la Fab2 dando lugar a una nueva denominación, los Faboterapicos.

La modificación proteolítica, además, reduce el tamaño de las inmunoglobulinas y sus propiedades inmunogénicas y antigénicas. Las inmunoglobulinas purificadas y digeridas con pepsina, es decir, como fragmentos F(ab')₂, constituyen el estado del arte en la seroterapia de tercera generación o faboterapia. El uso de faboterápicos prácticamente ha eliminado las reacciones de hipersensibilidad de tipo inmediato (anafilaxia) y de tipo tardío (enfermedad del suero) (Alagón Cano A, 2001)

5. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Realizar la evaluación del efecto destructor de la toxina de *Bothrops asper* sobre el fibrinógeno y su neutralización con suero antiofídico polivalente del Instituto Nacional de Salud y Laboratorios Probiol.

Objetivos específicos

Caracterizar el veneno de *Bothrops asper* del suroccidente colombiano como destructor de la cadena α , β o γ del fibrinógeno humano.

Caracterizar la neutralización del veneno de *Bothrops asper*, hecha por los sueros antiofídicos polivalentes utilizados en este trabajo.

Proponer uno de los sueros antiofídicos polivalentes a tratar como más eficaz ante la destrucción de fibrinógeno, afectado por la toxina de *Bothrops asper*.

6. METODOLOGIA

6.1 Obtención del fibrinógeno.

Para esta investigación el fibrinógeno utilizado ya se encontraba aislado y purificado con anterioridad. El protocolo de purificación de fibrinógeno es el propuesto por Deusth, Mertz (Deutsch y Mertz, 1970), y con una purificación al 99% con el protocolo de Blombäck B, and Blombäck M. (Blombäck B, and Blombäck M, 1957) con algunas modificaciones (no publicadas). (Cristancho Pabón , R. E, J. Ramón Camargo, L. F. Arbeláez Ramírez 2007). Se resuspende en PBS y se determina su concentración por espectrofotometría UV, utilizando como blanco 0.3 M de NaCl con adición de 6.66 M de urea alcalina y como coeficiente de extinción molar 0.150 (Blombäck B, and Blombäck M, 1957).

El fibrinógeno usado pertenece al lote número 07090504, y tiene una concentración de 1,8 mg/ml.

6.2 Obtención del veneno y cuantificación.

El veneno fue obtenido manualmente de un espécimen adulto de *Bothrops asper* ubicado en el terrario número 20 en el CIBUC (Centro de Investigaciones Biomédicas de la Universidad del Cauca). Este veneno fue liofilizado y cuantificado por el método de biuret, por Jimmy Guerrero y colaboradores 2008.

Limpieza del veneno: Todas las muestras fueron vorteadas y centrifugadas a 15000 rpm durante 15 minutos a 8° C, con el fin de separar los componentes inactivos del veneno y obtener la concentración de proteínas a partir del sobrenadante, el pellet fue desechado.

Para la cuantificación de proteínas se utilizó el método de Biuret, con algunas modificaciones, para trabajar con un volumen de 3ml, la calibración de la curva se realizó en un rango desde 0 a 4500µg de BSA. Una vez obtenida la curva de calibración, se procedió a dar lectura espectrofotométrica (580 nm) (Espectrofotómetro marca Genesys 10 UV) a la muestra de veneno por triplicado. El promedio de la absorbancia fue reemplazado en la ecuación $Y = mx + b$; donde $Y = a$ la absorbancia de la muestra, m la pendiente = $8E-5$, $X =$ la concentración de proteínas de la alícuota 100µl; y b el punto de intersección = 0,00061; $R^2 = 0,999$; teniendo en cuenta la lectura espectrofotométrica de la muestra la concentración de proteínas para 100µl fue de 3173,75µg ó 3,1737 mg. Con base en la concentración de proteínas se dispuso de 5000µg de proteína en un tubo eppendorf y fue liofilizado en un liofilizador marca *Labconco*, con el fin de facilitar la realización de las pruebas posteriores.

Para comenzar a realizar las pruebas electroforéticas el veneno fue reconstituido con 1ml de PBS pH 7,2 0,15M NaCl y 0,03M Na₂ HPO₄. Se tomó luego la absorbancia del blanco que fue el PBS pH 7,2, el dato fue tomado y guardado automáticamente por el equipo (espectrofotometro Genesys 10uv). Las lecturas fueron realizadas a 280nm. Se tomó la absorbancia del veneno reconstituido y como resultado dio 3 unidades de absorbancia, luego se realizó una dilución 1:10 (100ul de veneno reconstituido: 900ul de PBS pH7,2), la absorbancia registrada fue de 0,585. Una dilución 1:20 se realizó, la absorbancia registrada fue de 0,303. Una última dilución 1:40 en la que la absorbancia 0,134. Los valores de absorbancia se utilizaron para hallar la concentración de la solución usando $\epsilon = 1$ en la fórmula:

$$C=A/\epsilon*L*d$$

L= longitud de la celda 1cm

d= Factor de dilución

Se aplicó la fórmula para las absorbancias obtenidas con las diluciones 1:10; 1:20; 1:40, los resultados obtenidos fueron 5.85mg/ml, 6,0mg/ml, 5,36mg/ml. Se promediaron los valores obteniendo como resultado 5,73mg/ml que es la concentración final tomada para la solución madre.

6.3 Sueros Antiofídicos

Se utilizaron: Suero antiofídico polivalente liofilizado de laboratorios Probiol, que una vez reconstituido con 10 ml de solución salina 0,9%, neutraliza 25 mg de veneno de *B. asper*, 25 mg de veneno de *B. atrox*, 10 mg de veneno de *C. durissus* y 10 mg de veneno de *L. muta*. Suero antiofídico polivalente del INS que neutraliza 70 mg de veneno de *Bothrops* spp. y 10 mg de veneno de *C. d. cumanensis* por frasco de 10 ml (Ayerbe S, 2002).

6.4 Geles de electroforesis SDS PAGE 12,5%

La preparación de los geles de electroforesis se realizó siguiendo el protocolo estandarizado del laboratorio de BIOMOLECULAS de la Universidad de Pamplona. Las cantidades y los reactivos son los siguientes:

Gel de separación 12,5% 4ml

Acril 30% Bisacril 0,8%	1680µl
Agua tipo III	1280 µl
1,5M TRIS HCl	1000 µl
SDS 10%	40 µl
Persulfato de Amonio	20 µl
Temed	4 µl

Los reactivos se adicionan en orden homogenizando constantemente. La solución se adiciona al casete de electroforesis armado adecuadamente y se deja polimerizar por 45 minutos.

Gel de Concentración.

Acril 30% Bisacril 0,8%	260 μ l
Agua tipo III	1220 μ l
0,5M TRIS HCl	500 μ l
SDS 10%	20 μ l
Persulfato de Amonio	10 μ l
Temed	4 μ l

Los reactivos se combinan homogenizando constantemente, la solución se adiciona en el casete de electroforesis, inmediatamente se coloca el peine para formar los pozos de las muestras, se deja polimerizar por 1 hora 45 minutos.

Se corre la electroforesis a 0,02 mA y el gel se coloca en azul de coomasie para la tinción de las proteínas.

6.5 Reacciones

Todas las reacciones realizadas para observar la degradación del fibrinógeno humano se llevaron a cabo siguiendo las indicaciones del Doctor Luis Fernando Arbeláez Ramírez. Incubando previamente el fibrinógeno Humano a 37 °C en baño maría y aplicando las cantidades de veneno específicas para cada prueba dejando el tiempo determinado de reacción y deteniendo la misma con Sample Buffer en una relación 1:1. Las muestras se cocinan a 95°C y se depositan en los pozos de electroforesis.

La reacción de neutralización de los sueros antiofídicos se realizó según indicaciones del Doctor José María Gutiérrez. Incubando la dosis fija del veneno que degrada el fibrinógeno con la dilución del antiveneno. Incluyendo un control de solo veneno: fibrinógeno sin antiveneno, para ver el 100% de actividad. La mezcla veneno-antiveneno se incubaba a 37 °C por 30 minutos. Luego, a la mezcla se le agrega la solución de fibrinógeno y se deja por 5 minutos deteniendo la reacción con Sample Buffer en una relación 1:1 y siguiendo con el proceso de cocinado a 95°C para ser corrido en electroforesis.

6.6 Equipos

Espectrofotómetro marca Genesys 10uv, Centrifuga marca *Labnet*, un liofilizador marca *Labconco*. Las imágenes fueron obtenidas con el densitómetro marca ImageScanner, las fotografías obtenidas fueron con la cámara Sony Cybershot DSC-w80, el equipo de electroforesis usado en este proyecto fue Miniprotean 3

Cell (Biorad®). El software para usado para los análisis densitométricos fue ImageQuant TL v 2005.

7. RESULTADOS

7.1 Electroforesis unidimensional del veneno de *Bothrops asper* gel No 1

Se realiza la primera electroforesis unidimensional donde se caracteriza las bandas del veneno de *Bothrops asper* y se hace su respectivo análisis densitométrico.

En la figura 3 se muestra el gel de electroforesis realizado para el veneno de *Bothrops asper*.

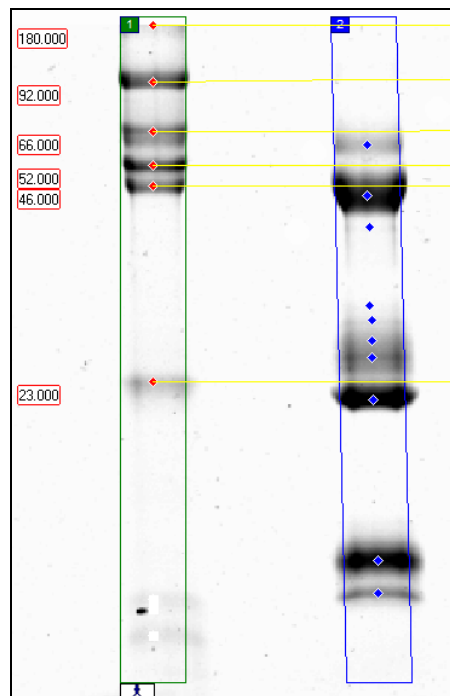


Figura 3: Gel de electroforesis del veneno de *Bothrops asper*. De izquierda a derecha: Carril 1, Marcador de peso molecular BIOMOLECULAS; Carril 2, 5 µl de veneno de *Bothrops asper* de concentración 5,73 mg/ml

En la figura 4 se muestra el análisis densitométrico del carril del veneno, mostrando los respectivos pesos moleculares para cada banda. La grafica muestra la intensidad de color en el eje Y por cada banda en el carril electroforético en el eje X.

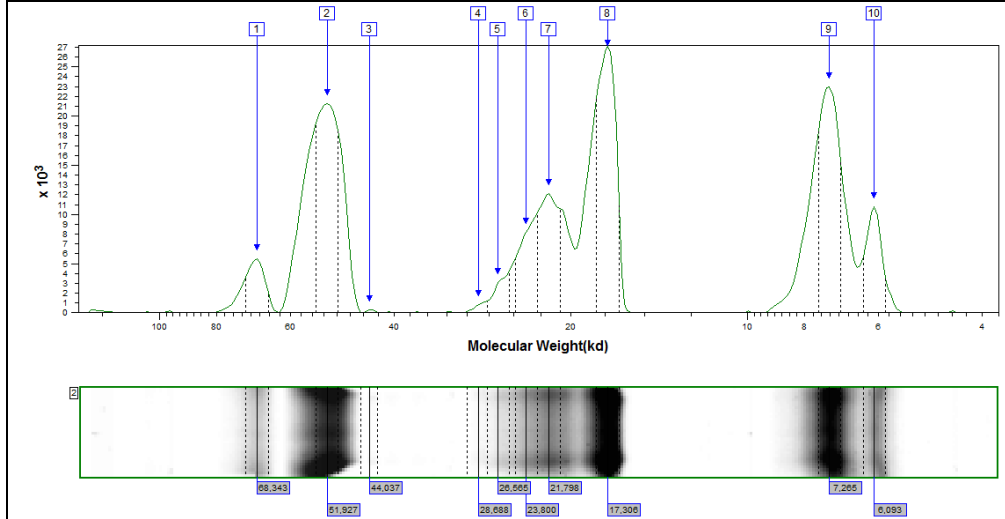


Figura 4: Análisis densitométrico del veneno de *Bothrops asper* en Electroforesis SDS PAGE 12,5%

7.2 Caracterización de la destrucción del fibrinógeno por el veneno de *Bothrops asper* por medio de electroforesis unidimensional.

7.2.1 Gel Fibrinógeno y diluciones de veneno de *Bothrops asper*. Gel No 2

Mediante electroforesis unidimensional se realizó la evaluación del efecto destructor del fibrinógeno mediante la reacción controlada fibrinógeno: veneno con diluciones realizadas de este último a partir de una solución madre de 5,73 mg/ml cuantificada por el método de Biuret, las diluciones realizadas a partir de esta solución madre fueron: 1:100; 1:200; 1:400; 1:800; 1:1600. Estas diluciones tienen como objetivo evidenciar el cambio de la degradación del fibrinógeno en un mismo tiempo controlado para todas las reacciones, que fue de 5 minutos. La cantidad de fibrinógeno usado para todas las reacciones fue de 7 μ g contenidos en un volumen de 3,88 μ l

La concentración de proteínas para cada dilución de veneno se muestra en la tabla 1.

Tabla 1: Concentración de proteína por cada dilución de Veneno de *Bothrops asper*.

Dilución	Concentración de proteína mg/ml
1:100	57,3
1:200	28,65
1:400	14,325
1:800	7,1625
1:1600	3,5812

La figura 5 muestra el gel de electroforesis unidimensional con las reacciones fibrinógeno: veneno.

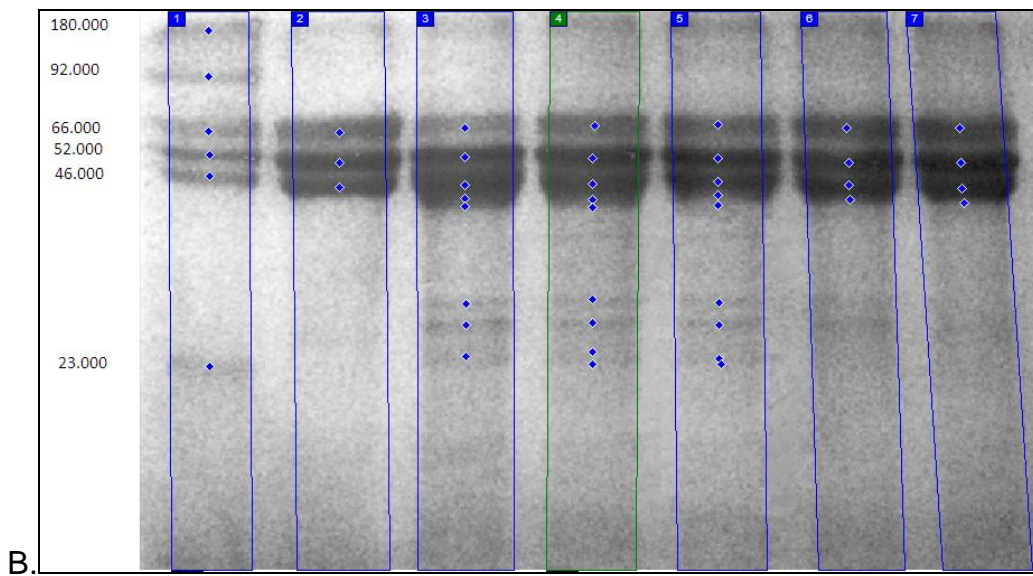
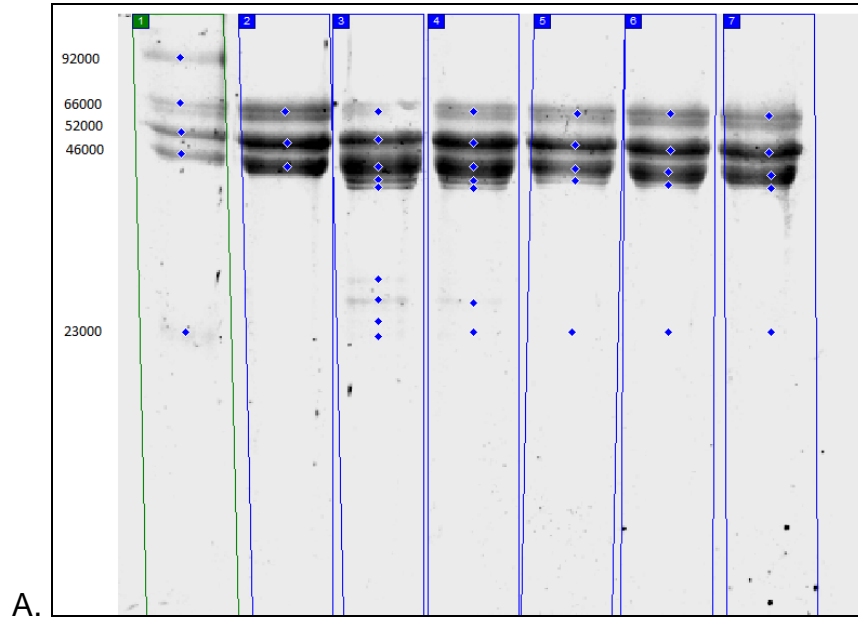


Figura 5: A, Gel escaneado Image Scanner. B, Gel Fotografiado Sony Cybershot DSC-w80. Carril 1, marcador de peso molecular; Carril 2, fibrinógeno estándar; Carril 3 reacción fibrinógeno: veneno

realizada con la dilución 1:100 de veneno; Carril 4, reacción fibrinógeno: veneno con la dilución 1:200 de veneno; Carril 5 reacción fibrinógeno: veneno con la dilución 1:400 de veneno; Carril 6 reacción fibrinógeno: veneno con la dilución 1:800 de veneno; Carril 7 reacción fibrinógeno: veneno con la dilución 1:1600 de veneno.

Las reacciones del fibrinógeno con cada dilución de veneno corresponden a una relación entre contenido de proteínas de cada reactivo: la reacción número 1 de fibrinógeno veneno con la dilución 1:100 de veneno corresponde a una relación veneno: fibrinógeno 1:100 ya que la cantidad de proteína en el volumen usado de veneno es de 0,07ug y la cantidad de proteína usada de fibrinógeno es de 7ug.

De esta manera se muestra en la tabla 2 cada carril con la reacción fibrinógeno: veneno por medio de relaciones de masa de proteínas.

Tabla 2: Relaciones y pesos de la reacción fibrinógeno: veneno en el gel de la figura 4.

Carril	Relación veneno: fibrinógeno	Pesos veneno: fibrinógeno
3	1:100	0,07ug/7ug
4	1:200	0,035ug/7ug
5	1:400	0,0175ug/7ug
6	1:800	0,00875ug/7ug
7	1:1600	0,00437ug/7ug

7.2.2 Reacción de Fibrinógeno: veneno con las diluciones 1:100 y 1:1400 a 5 y 15 minutos. Gel No 3

En la evaluación de la degradación del fibrinógeno humano se toma como referencia la cantidad de veneno que afecta de manera notoria al fibrinógeno (dilución 1:100) y también se toma la dilución 1:400 ya que esta es la dilución mínima con la que se nota un daño evidente, originando productos de degradación del fibrinógeno.

La realización de este experimento se llevó a cabo teniendo en cuenta el tiempo de exposición de fibrinógeno a las diferentes diluciones del veneno.

Para evidenciar que los cambios en el estado del fibrinógeno son debidos al tiempo de exposición y a la concentración del veneno, se utilizó como tiempo 5 minutos y 15 minutos. Las relaciones fibrinógeno: veneno se realizaron con los dos tiempos en cada una.

Este experimento también sirvió como base para descartar experimentos de neutralización a través del tiempo debido a la limitante de reactivos. Entonces la evidencia de la neutralización a los 5 minutos será base para observar la eficacia

de un suero antiofídico frente a otro. Pues en la práctica clínica se tiene en cuenta la eficacia del suero inicialmente según el tiempo de neutralización del veneno, además de tener en cuenta los efectos secundarios que este pueda causar.

En la tabla 3 muestra la correspondencia de cantidad de volumen y de proteína empleada en cada carril con su respectivo tiempo de reacción. Y en la figura 6 se muestra el gel correspondiente a estas reacciones.

Tabla 3: Carriles del gel de electroforesis de reacciones fibrinógeno: veneno con su respectiva relación, concentración, cantidad de los reactivos y tiempo de la reacción.

Carril	relación veneno: fibrinógeno	Concentración veneno ug/ml	Volumen de veneno ul	Masa Veneno ug	Volumen Fibrinógeno ul	Masa Fibrinógeno ug	Tiempo de reacción
3	1:100	57,3	1,22	0,07	3,88	7	5
4	1:400	14,325	1,22	0,0175	3,88	7	5
5	1:400	14,325	1,22	0,0175	3,88	7	15
6	1:100	57,3	1,22	0,07	3,88	7	15

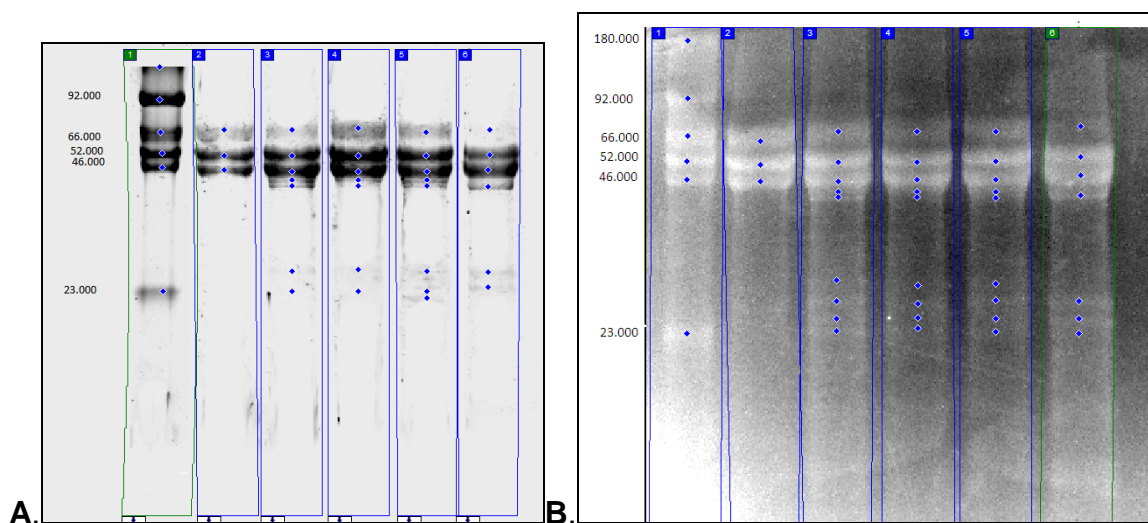


Figura 6: Gel de electroforesis de la reacción fibrinógeno veneno en distintas relaciones y tiempos. A. Gel escaneado con ImageScan. B. Fotografía en inversión de colores. La disposición de los carriles de izquierda a derecha es: carril 1, marcador de peso molecular BIOMOLECULAS; carril 2, estándar de Fibrinógeno (sin veneno); carril 3 relación 1:100 veneno fibrinógeno 5 minutos; carril 4, relación 1:400 veneno: fibrinógeno 5 minutos; carril 5 relación 1:400 veneno: fibrinógeno 15 minutos; carril 6, relación 1:100 veneno: fibrinógeno 15 minutos

7.2.3 Reacciones fibrinógeno veneno en una relación 1:400 con tiempo controlado. Gel No 4

Para este experimento se tomó la relación 1:400 veneno: fibrinógeno para observar de una mejor manera la degradación del fibrinógeno humano a través del

tiempo. No se usó la relación más pequeña, ya que la destrucción sería masiva y precipitada y se quiere evaluar el tiempo de la reacción hasta una hora y media, algo que si nos brinda la relación 1:400. Figura 7.

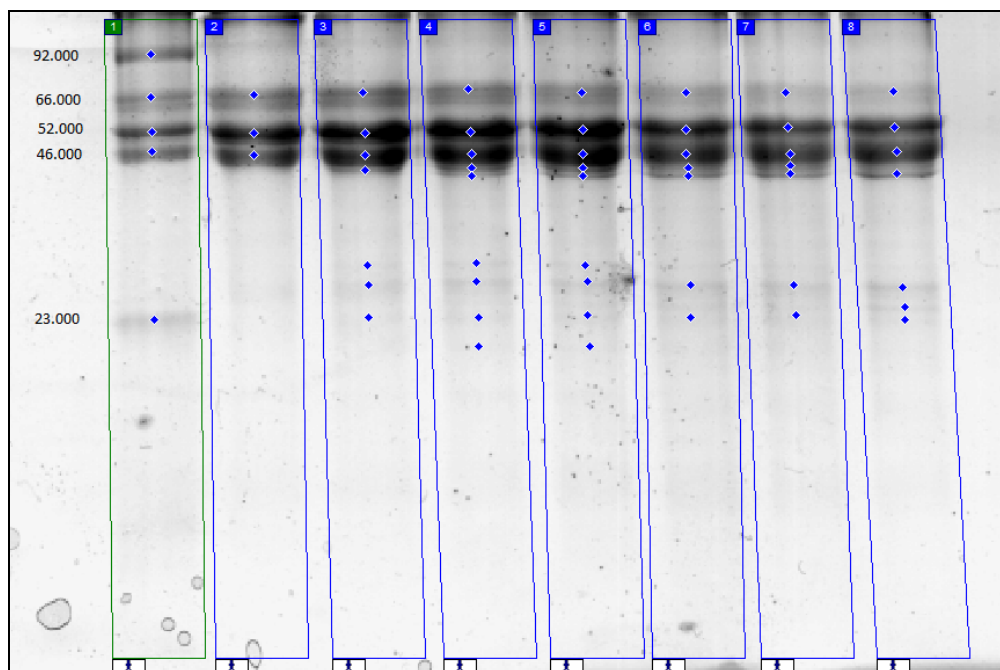


Figura 7: gel de la electroforesis con la disposición de los carriles y las muestras: carril 1, marcador de peso molecular BIOMOLECULAS; carril 2, Fibrinógeno estándar; carril 3, reacción Veneno: Fibrinógeno 15 minutos; carril 4, reacción Veneno: Fibrinógeno 30 minutos; carril 5, reacción Veneno: Fibrinógeno 45 minutos; carril 6, reacción Veneno: Fibrinógeno 60 minutos; carril 7, reacción Veneno: Fibrinógeno 75 minutos; carril 8, reacción Veneno: Fibrinógeno 90 minutos.

7.3 Experimentos con sueros antiofídicos

Para manejar volúmenes adecuado en los pozos de electroforesis, se realizaron los cálculos de correspondencia de la titulación de los sueros antiofídicos para neutralizar la cantidad de veneno con la que se está trabajando en una relación veneno:fibrinógeno 1:100; o sea 0,07 μ g de veneno a 7 μ g de fibrinógeno humano.

Entonces los cálculos realizados para el suero antiofídico del instituto nacional de salud dieron como resultado que 0,01 μ l de suero antiofídico neutralizan 0,07 μ g de veneno de serpientes de género *Bothrops* ya que 10 ml de suero del Instituto Nacional de Salud neutralizan 70 miligramos de veneno de las serpientes del género *Bothrops*.

Los cálculos realizados para el suero antiofídico de Laboratorios Probiol dieron como resultado que 0,028 μ l del suero antiofídico neutralizan 0,07 μ g de veneno de *Bothrops asper* ya que 10 ml de suero antiofídico neutralizan 25 mg de veneno de la especie *Bothrops asper*.

El experimento se realizó según indicaciones y protocolo de Gutierrez J. M. con algunas modificaciones realizadas por Ramirez L y Camayo R.

7.3.1 Gel de neutralización con el suero antiofídico del Instituto Nacional de Salud. Gel No 5

La figura 8 muestra el gel con las reacciones de neutralización del suero antiofídico del Instituto nacional de salud.

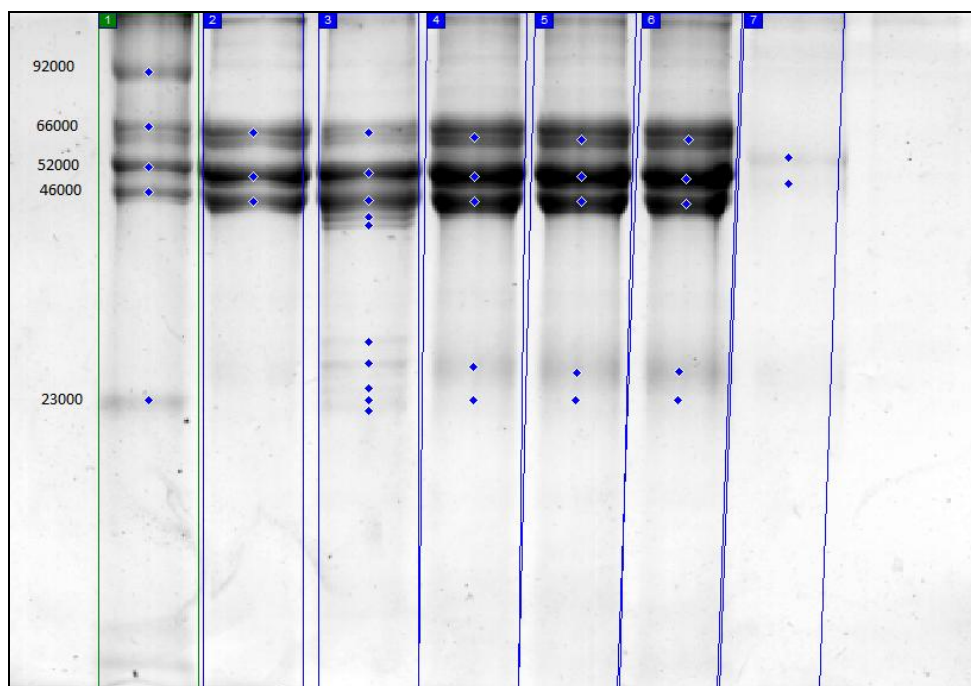


Figura 8: Gel de electroforesis de reacción de neutralización del suero antiofídico del Instituto Nacional de Salud. De izquierda a derecha, Carril 1, marcador de peso Molecular BIOMOLECULAS; Carril 2, Fibrinógeno estándar 7µg; Carril 3, Reacción veneno: Fibrinógeno en una relación 1:100; Carril 4, 5, 6, reacción de neutralización con el suero antiofídico del instituto nacional de salud 0,07 µg de veneno de *Bothrops asper*, 0,01µl de Suero antiofídico del INS, 7µg de Fibrinógeno; Carril 7, 0,01µl de Suero antiofídico INS.

7.3.2 Gel de neutralización con el suero antiofídico de Laboratorios Probiol. Gel No 6

La figura 9 muestra el gel de electroforesis donde se muestra la reacción de neutralización del suero antiofídico de laboratorios Probiol.

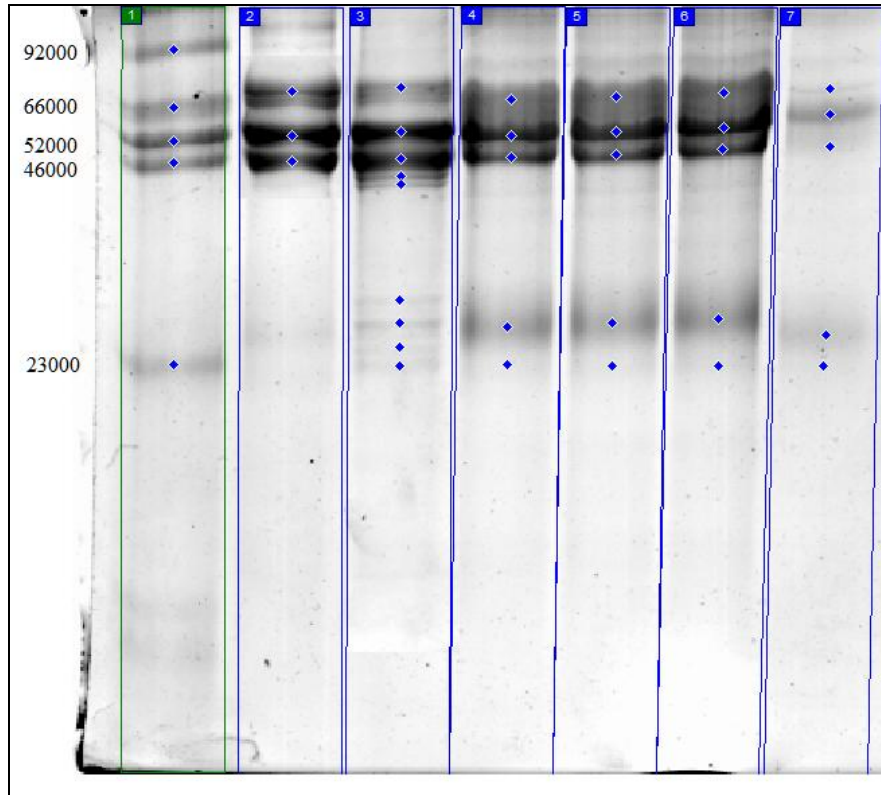


Figura 9: Gel de electroforesis de reacción de neutralización del suero antiofídico Laboratorios Probiol. De izquierda a derecha, Carril 1, marcador de peso Molecular BIOMOLECULAS; Carril 2, Fibrinógeno estándar 7ug; Carril 3, Reacción veneno: Fibrinógeno en una relación 1:100; Carril 4, 5, 6, reacción de neutralización con el suero antiofídico del instituto nacional de salud 0,07ug de veneno de *Bothrops asper*, 0,028ul de Suero antiofídico de Laboratorios Probiol, 7 ug de Fibrinógeno; Carril 7, 0,028ul de Suero antiofídico de Laboratorios Probiol.

8. ANÁLISIS DE RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los análisis de las imágenes se realizaron con el software ImageQuant TL. v2005

8.1.1 Electroforesis unidimensional del veneno de *Bothrops asper* gel No 1

En el análisis de los pesos moleculares del veneno de la serpiente *B. asper* realizados en una electroforesis SDS PAGE 12,5% llevado a cabo en este estudio, se encuentran bandas con los pesos moleculares que muestra la figura 10.

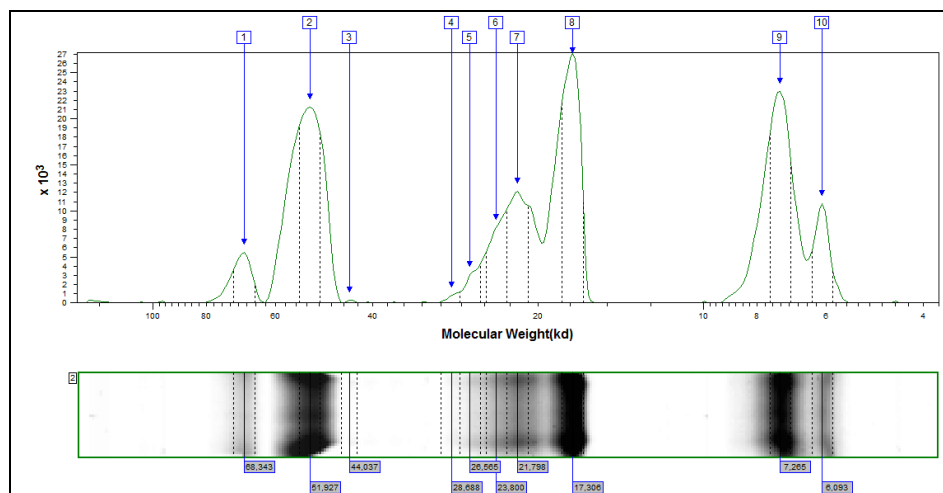


Figura 10: Análisis densitométrico del carril correspondiente al veneno de *B. asper* del suroccidente colombiano.

Los pesos moleculares de las proteínas del veneno obtenidas por electroforesis en condiciones reductoras se muestran en la tabla 1. Con su respectiva movilidad electroforética.

Tabla 4: Pesos moleculares de proteínas desnaturalizadas del Veneno de *Bothrops asper* y movilidad electroforética.

Banda	Peso Molecular (kd)	Movilidad electroforética Rf
1	68,34	0,19
2	51,93	0,27
3	44,04	0,32
4	28,69	0,44
5	26,56	0,46
6	23,8	0,49
7	21,8	0,51
8	17,31	0,58
9	7,26	0,82
10	6,09	0,87

Los pesos moleculares de las proteínas del veneno se midieron teniendo en cuenta el marcador de peso Molecular BIOMOLECULAS el cual muestra la curva de calibración en la figura 11 donde se observa un coeficiente de regresión de 0,91.

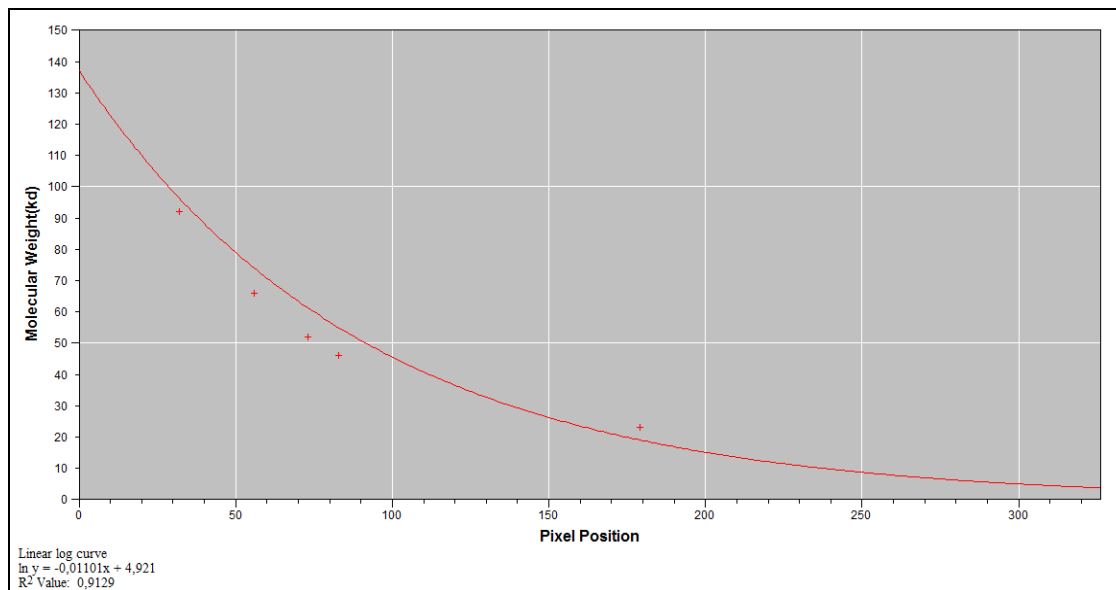


Figura 11: Curva de calibración del Marcador de Peso Molecular BIOMOLECULAS y ecuación de la curva

8.1.2 Caracterización de la destrucción del fibrinógeno por el veneno de *Bothrops asper* por medio de electroforesis unidimensional

Para caracterizar la destrucción de la biomolécula. Las tablas 17, 18 y 19 en las paginas 58 y 59 muestran las bandas resultantes en todas las reacciones fibrinógeno: veneno realizadas en este trabajo.

8.1.2.1 Gel de Fibrinógeno y diluciones de veneno de *Bothrops asper*. Gel No 2

La tabla 5 en la página 50 muestra el análisis densitométrico del gel donde también se muestra el peso molecular de las nuevas bandas resultantes luego de cada reacción.

La grafica 1 en la página 61 muestra como se degradan las cadenas de fibrinógeno según las distintas diluciones realizadas en cada reacción.

8.1.2.2 Gel de reacción de Fibrinógeno: veneno con las diluciones 1:100 y 1:1400 a 5 y 15 minutos. Gel No 3

La tabla 6 página 49 muestra los valores de los pesos moleculares de las bandas resultantes. Y la tabla 7 en la página 49 muestra el análisis densitométrico realizado para este gel.

La grafica 2 en la página 60 muestra la destrucción del fibrinógeno en las reacciones con las dos diluciones en los tiempos determinados.

8.1.2.3 Reacciones fibrinógeno veneno en una relación 1:400 con tiempo controlado. Gel No 4

La tabla 10 en la página 51 muestra los pesos moleculares de las bandas generadas por cada una de las reacciones.

La tabla 12 en la página 52 muestra el análisis densitométrico de las bandas del gel.

La grafica 3 en la página 60 muestra la destrucción de las cadenas de fibrinógeno a través del tiempo de exposición al veneno en una dilución 1:400

8.1.2.4 Gel de electroforesis de reacción de neutralización del suero antiofídico del Instituto Nacional de Salud. Gel No 5

La tabla 13 en la página 52 muestra los pesos moleculares de las bandas resultantes de después de la reacción fibrinógeno: veneno y de la neutralización fibrinógeno: veneno: suero antiofídico.

La tabla 14 página 53 muestra el análisis densitométrico del gel No 5.

La figura 14 en la página 61 muestra como el fibrinógeno se reconstituye gracias al suero antiofídico del INS.

8.1.2.5 Gel de electroforesis de reacción de neutralización del suero antiofídico de Laboratorios Probiol. Gel No 6

La tabla 15 página 54 muestra los pesos moleculares de las bandas resultantes de después de la reacción fibrinógeno: veneno y de la neutralización fibrinógeno: veneno: suero antiofídico.

La tabla 16 página 55 muestra el análisis densitométrico del gel No 6.

La figura 15 en la página 62 muestra como el fibrinógeno se reconstituye gracias al suero antiofídico de Laboratorios Probiol.

En la tabla 21 en la página 58 se muestran el peso molecular promedio para cada banda que representa PDF con su respectiva desviación estándar.

8.2 DISCUSIÓN.

8.2.1 Caracterización del veneno de *B. asper*

Gracias a la curva de calibración del carril de los marcadores de peso molecular en cada gel podemos dar una buena confiabilidad de que los pesos moleculares de los demás carriles son correctos.

La Figura 16 en la página 65 muestra las curvas de calibración de los marcadores de peso molecular de cada gel con su respectiva ecuación y su grado de confiabilidad.

En la electroforesis en gel de poliacrilamida SDS PAGE 12,5% el veneno de *Bothrops asper* del suroccidente colombiano, muestra bandas visibles desde los 68,34KDa hasta los 6,09KDa mostrando sus bandas mas representativas a los 51,93KDa, 17,31KDa y 7,26KDa.

En estas mismas condiciones el veneno de *B. asper* de México presenta bandas fuertemente teñidas entre los 16.5 y 25 KDa (Adolfo R, 2004). Las diferencias halladas en los pesos moleculares de proteínas de venenos de la misma especie son notables en la comparación de venenos de la misma especie cuando se encuentran en una región geográfica distinta. En Costa Rica el veneno de un espécimen adulto de *Bothrops asper* en electroforesis SDS PAGE 15% muestra las bandas más representativas a los 23KDa y los 17 KDa para adultos. Figura 12

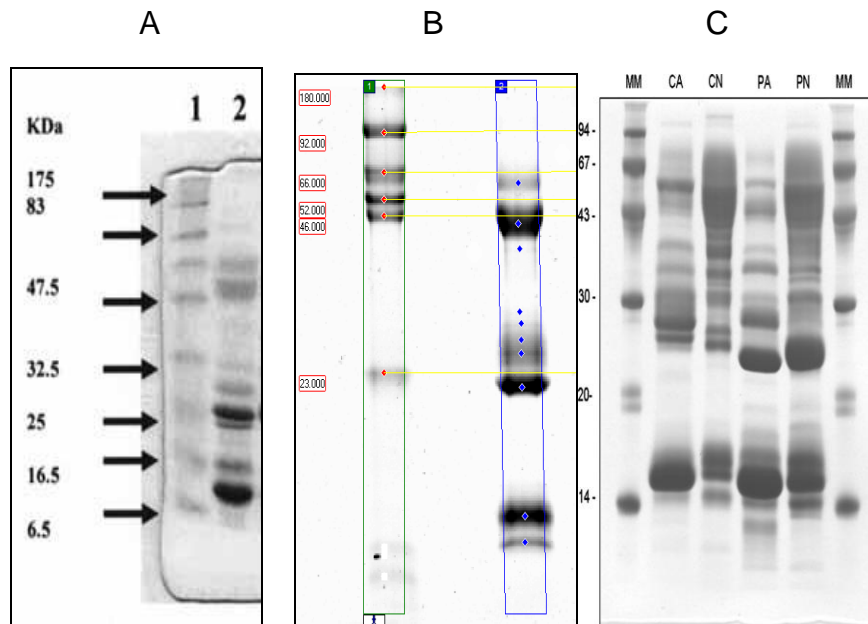


Figura 12: A. Gel de electroforesis en poliacrilamida 12,5% en condiciones reductoras (Adolfo R, 2004) Carril 1, Marcador de Peso molecular. Carril 2, 25ug de proteína de veneno de *B asper*. México B. Gel de electroforesis en poliacrilamida 12,5% en condiciones reductoras Carril 1, Marcador de peso molecular. Carril 2, 28,65ug de veneno de *B. asper* Suroccidente Colombiano. C. Electroforesis SDS-PAGE 15% de proteínas de veneno de *B. asper* del Caribe y Pacifico

8.2.2 Caracterización de la destrucción del fibrinógeno por el veneno de *B. asper*.

En la caracterización de la destrucción del fibrinógeno debido al veneno de la serpiente *B. asper* se nota, como primera medida, un grupo de aminoácidos que forman 2 bandas entre el rango de los 45,86 KDa y los 43,36KDa en la mayoría de las reacciones fibrinógeno : veneno. A un tiempo de exposición de 90 minutos y con la concentración de veneno de 14,325mg/ml (dilución 1:400 de veneno) (Tabla 10,11,18) solo se forma una sola banda a los 43,36KDa esta banda también se identifica con la exposición al veneno de 15 minutos con la concentración 57,3mg/ml (dilución 1:100) (Tabla 6, 8, 17), a pesar de que la banda en este carril muestre un peso molecular de 44,15 KDa esta es la banda más liviana en el rango mencionado, pues en el mismo gel la reacción a los 5 minutos con la dilución 1:100 muestra las dos bandas características de la reacción inmediata (Tabla 5, 6, 8, 17). Esto demuestra, como la concentración de venenos puede afectar según el tiempo de exposición, para este caso, 15 minutos del veneno a una concentración de 57,3mg/ml sobre fibrinógeno humano, puede actuar de la misma manera que la concentración 14,325mg/ml a 90 minutos.

La banda que se forma en las reacciones con las concentraciones 7,16mg/ml y 3,58mg/ml, diluciones 1:800 y 1:1600 respectivamente, en un tiempo de 5 minutos (Tabla 5) no son iguales a la banda formada de la reacción con la dilución 1:100 a 15 minutos ya que su peso se encuentra entre los 45,16KDa y 44,79KDa, mostrando así que es la primera de las dos bandas que normalmente aparecen a estos pesos moleculares. Para que se cree una segunda banda más liviana para estas concentraciones, que son las menores, el tiempo de exposición al veneno tiene que extenderse y para que solo se forme la banda más liviana en el rango mencionado, el tiempo debe ser mucho mayor a 90 minutos. A partir de estos resultados se puede discutir sobre el carácter fibrinogenolítico del veneno de especies que tienen enzimas más concentradas o del veneno de individuos de la misma especie que se encuentran en regiones geográficamente diferentes como también la variación ontogénica entre individuos de la misma especie.

Uno de los efectos paraclínicos que hacen parte del envenenamiento botrópico, es la disminución de los niveles de fibrinógeno y el aumento de los productos de degradación del fibrinógeno PDF. El aumento de los PDF y la disminución del fibrinógeno son evidentemente representados en este estudio. Variando según el tiempo de exposición y la concentración del veneno. Los PDF se muestran representados en número y en volumen medido gracias al análisis densitométrico realizado. A una concentración mayor (57,3 mg/ml) los PDF van a ser mayores en número, mostrándose en una gama de pesos moleculares que va desde los 45,86KDa a los 21,92KDa, la cantidad de bandas permanece entre 9 y 10. Mientras la concentración disminuye las bandas que representan los PDF

disminuyen de manera notable. Tabla 5, Tabla 17. La Grafica 1 representa la disminución de los niveles de fibrinógeno humano frente a las distintas diluciones de veneno. A partir de esta gráfica se puede generar la discusión acerca de que si el veneno de *B. asper* crea algún producto de la degradación del fibrinógeno que se encuentre al mismo peso de la cadena gama, ya que a través de los tiempos de exposición al veneno y a través de las concentraciones esta cadena no se ve afectada y su volumen aumenta progresivamente mientras las otras dos cadenas se ven degradadas. De esta manera los cambios en las cantidades de las cadenas beta y gama pueden ser debidos a residuos de aminoácidos que resultan de la cadena alfa.

Comparando tiempos de reacción diferentes, 5 minutos y 15 minutos, en dos concentraciones diferentes de veneno, 57,3mg/ml y 14,325mg/ml, para observar el comportamiento de la degradación del fibrinógeno humano y sobre todo para observar el comportamiento de los PDF, se encuentran similitudes entre las bandas resultantes que representan los PDF, Tabla 6 y Tabla 17. Se forman bandas entre los pesos de 45,86KDa y 23KDa para todas las reacciones. Las bandas formadas para los carriles que contienen las reacciones con la dilución 1:100 5 minutos, 1:400 5 minutos y 1:400 15 minutos tienen las mismas bandas formadas, desde la banda numero 4 hasta la 9, todas comparten similitud en el peso molecular. En el carril de la reacción 1:100 15 minutos, desaparece algunas bandas características de las reacciones anteriores. Tabla 8. Entra entonces en la discusión la manera en la que el veneno actúa sobre los PDF a través del tiempo, aparte de degradar la biomolécula en lugares específicos, resultando un mismo producto de degradación sin importar la concentración o el tiempo de exposición, a su vez actúa sobre ciertos PDF generando un mayor volumen en las bandas que se mantienen a través del tiempo y produciendo mayor cantidad de PDF de un mismo peso molecular. Tabla 7 Tabla 9 Grafica 2.

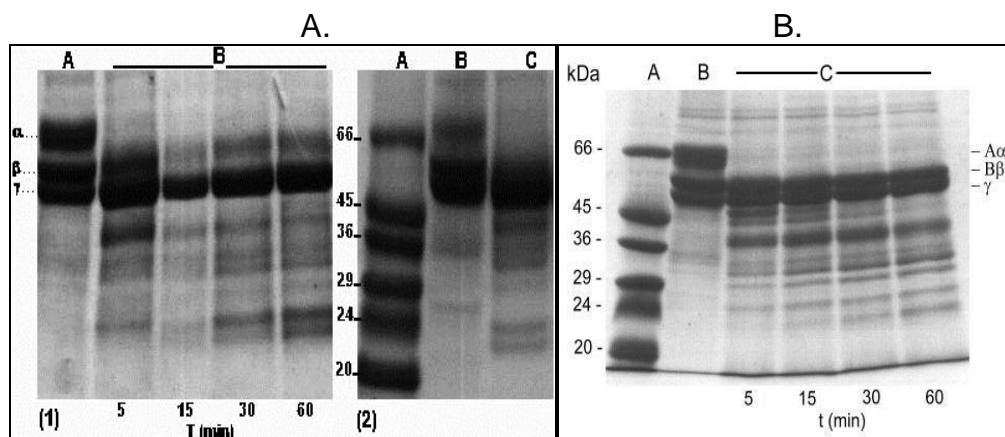
La reacción veneno: fibrinógeno en una relación 1:400 (gel No. 4) se realizó con el fin de hacer el seguimiento a través del tiempo de exposición del fibrinógeno al veneno y notar su degradación, sin causarle una destrucción de manera precipitada como se haría con la reacción 1:100. En la Tabla 13, 11 y 18 se aprecian las bandas formadas con su respectivo peso molecular, la tabla 11 es la comparación de bandas, en esta tabla resultan 10 bandas que hace referencia a 10 grupos de bandas en los diferentes pesos moleculares. Cabe recalcar que aunque dentro de un mismo grupo de bandas, todas tengan un peso molecular distinto, esto no quiere decir que sean bandas en distintos pesos moleculares. Ya que debido al software utilizado (Image Quant TL v 2005) se mide desde el pico más alto en el histograma de luz de cada banda produciendo una variación de peso de pico a pico.

En el gel No 4 se puede notar como progresivamente se van formando los PDF según el tiempo de exposición al veneno. Cronológicamente, desde el inicio de las reacciones, se originan las bandas representadas en el carril 3 (15 minutos). En los carriles 4 y 5 (30 minutos y 45 minutos) de este gel se diferencia una banda de

peso molecular entre los 20KDa y los 19,74KDa que no se había notado hasta el momento, se considera que a pesar de que la dilución de veneno es una solución homogénea, en la práctica, puede ocurrir que en la obtención de cualquier muestra del veneno en dilución se pueda tomar dentro de la misma muestra una mayor cantidad de cierta enzima más que otros compuestos del veneno y que tenga algún efecto específico sobre las cadenas de fibrinógeno o sobre los distintos PDF generados. La concentración de veneno usada en los experimentos muestra que los PDF serán generados a diferentes pesos moleculares según esta varíe. La diferencia de las bandas producto de la degradación del fibrinógeno entre las reacciones con la dilución 1:100 y con la dilución 1:400 radica en que la dilución 1:100 desde el comienzo muestra más bandas en los variados pesos moleculares. La relación 1:400 presenta solo ciertas bandas que con los diferentes tiempos varían sus pesos moleculares, se esperaría que en algún momento presentase toda la variedad de bandas en un solo carril. Este es uno de los puntos más interesantes a desarrollar ya que debido a la concentración del veneno, los productos de degradación del fibrinógeno van a afectar de manera distinta fisiológicamente la hemostasia. Una vez más, el tiempo de exposición demuestra que el veneno actúa de manera específica sobre ciertos productos de degradación del fibrinógeno, degradando algunos grupos de aminoácidos y formando otros nuevos en distintos pesos moleculares. Tabla 11 página 51. Se aprecia que los volúmenes de los PDF se ven aumentados según el tiempo. Tabla 12 página 52.

Las experiencias realizadas en Argentina por la Doctora Silvana Mruñak y colaboradores donde muestran la acción del veneno de *Bothrops jararacusu*, la acción de una hemorragina de *Bothrops alternatus* y la de una enzima tipo trombina de *Crotalus durissus terrificus* sobre el fibrinógeno. En estos se caracteriza la destrucción de manera cualitativa y se observan los productos de la degradación del fibrinógeno (Maruñak S.L, 2006, 2004: Gay Claudia C, 2004). Los PDF aparecen a pesos moleculares diferentes para cada especie, demostrando que el veneno actúa sobre diferentes lugares y de diferente manera sobre el fibrinógeno.

En la figura 13 se aprecian las experiencias en electroforesis de dichos estudios



C.

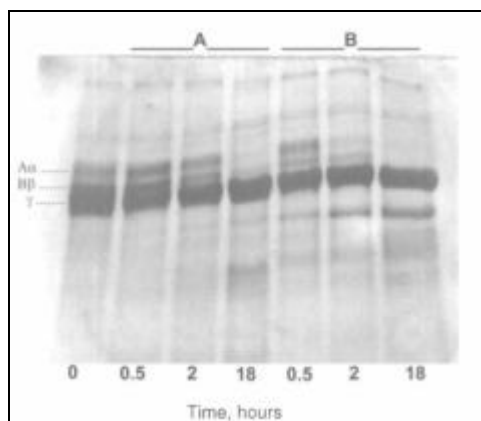


Figura 13: A. Electroforesis SDS-PAGE 12% del clivaje específico de fibrinógeno humano producido por la hemorragina de *Bothrops alternatus* (1) Carril A: fibrinógeno. Carril B: degradación de fibrinógeno en presencia de hemorragina aislada. (2) Carril A: marcadores de peso molecular (kDa). Carril B: fibrinógeno. Carril C: degradación de fibrinógeno en presencia de hemorragina estudiada de *Bothrops alternatus*. (Gay Claudia C, 2004). B. Electroforesis SDS-PAGE 12% del clivaje específico de fibrinógeno humano producido por el veneno de *Bothrops jararacussu*. Carril A: marcadores de peso molecular. Carril B: fibrinógeno humano control, incubado a 37 °C durante 1 h sin veneno. Carril C: muestras de fibrinógeno incubadas a 37 °C con veneno de *B. jararacussu* durante 5, 15, 30 y 60 min respectivamente. (Maruñak S.L, 2006)C. Electroforesis SDS-PAGE 12% del clivaje específico del fibrinógeno de ratón producido por una enzima tipo trombina de *Crotalus durissus terrificus*. Carriles A: fibrinógeno incubado con veneno de *C. d. terrificus*. Carriles B: fibrinógeno incubado con la enzima tipo trombina de *C. d. terrificus*. (Maruñak S.L, 2004).

La tabla 21 página 58 muestra entonces el peso promedio de los productos de degradación del fibrinógeno en cada gel con su respectiva desviación estándar.

Hay una correlación muy fuerte entre la degradación y la concentración como también el tiempo y la degradación. El coeficiente de Spearman que se muestra en la tabla 22 y 23 página 59, tiene un valor negativo cercano a -1 lo que muestra una fuerte correlación negativa.

8.2.3 Neutralización del efecto destructor del veneno sobre el fibrinógeno humano.

En la neutralización del efecto destructor del veneno sobre el fibrinógeno humano realizada por los sueros antiofídicos polivalentes evaluados en este estudio, solo se realizó una prueba en la que se utilizó como estándar la reacción veneno: fibrinógeno en una relación 1:100 por 5 minutos. Esta es una de las reacciones que arroja mas PDF, lo cual puede causar un daño importante en la cascada de coagulación y de esta manera generar una hemorragia severa a nivel sistémico. Los sueros suministrados en la manera que lo indica la titulación para cada uno demuestra ser efectiva en los primeros 5 minutos de reacción veneno: fibrinógeno: suero antiofídico. En los geles realizados para cada neutralización no se observan PDF en los carriles que contienen el suero antiofídico, tablas 13 y 15 páginas 52 y

54 correspondientemente. Las figuras 14 y 15 en la página 61 y 62 respectivamente muestran el análisis densitométrico de la neutralización realizada por cada suero. Se nota en la gráfica de cada carril la curva bajo los picos correspondientes a las 3 cadenas de fibrinógeno. En el carril B de cada figura se ve la disminución de la cadena alfa y los PDF con sus pesos moleculares. En los carriles C, D, E se observa como actúa el suero antiofídico sobre reconstituyendo la cantidad de la cadena alfa y eliminando los PDF. La banda que se observa en el lugar donde se encontraban los PDF pertenece a una banda característica de cada suero antiofídico. Lo que es comprobado en el carril F. En los resultados observados, el suero antiofídico de Laboratorios Probiol deja una banda de considerable densidad en el peso molecular 26,81KDa y 25,25KDa en las reacciones de neutralización. Posiblemente siendo parte de los PDF que no se han detenido de producir totalmente.

Una de las complicaciones que pueden tener los pacientes en casos de ofidismo y tratados con un suero antiofídico determinado es su respuesta inmune al suero antiofídico. Lo que indica que sueros antiofídicos con compuestos evidentes y en mayor cantidad, que seguramente son agregados de proteínas que la literatura no nombra, como se ejemplifica en la figura 17 en la página 64, pueden generar complicaciones en un paciente. La figura 17 muestra la comparación entre los dos sueros antiofídicos utilizados en este trabajo el del INS y el de Laboratorios Probiol. La tabla 20 en la página 58, muestra los pesos moleculares de los dos sueros los cuales se encuentran casi entre los mismos rangos de peso, a pesar de que tienen bandas similares, en el suero de laboratorios Probiol se nota gracias al histograma de luz, una mayor densidad en la banda de peso molecular 56,32KDa esto indicando que hay algunos agregados que podrían actuar en contra del organismo del paciente así se haya suministrado el volumen titulado para la ocasión. La cantidad de suero antiofídico utilizado para las pruebas es muy pequeña lo cual dificulta la identificación de bandas notables como las que tienen que estar en el rango de los 150KDa que corresponde a la IgG y el de la albumina que esta se encontraría a los 70KDa (Otero R. *et al.* 2002).

9. CONCLUSIONES

La realización de este estudio, confirma que el veneno de *B. asper* del suroccidente colombiano actúa sobre el fibrinógeno humano como biomolécula aislada, generando productos de la degradación del fibrinógeno que presentan una gama de pesos moleculares entre los 45,86KDa y los 21,92KDa.

La variación entre concentraciones del veneno y el tiempo de exposición al mismo determinan el daño generado a la biomolécula, a su vez manifestando que extrapolando a la realidad, los individuos juveniles de esta misma especie pueden causar un daño mayor en los niveles de fibrinógeno y por consiguiente desencadenar una hemorragia mayor que un individuo adulto de *B. asper*.

La neutralización del veneno sobre el fibrinógeno gracias a los sueros antiofídicos utilizados en Colombia, suero antiofídico polivalente del Instituto Nacional de Salud y el suero antiofídico polivalente de Laboratorios Probiol, es efectiva cuando se hace una incubación veneno suero de 5 minutos. Los dos sueros muestran que no hay PDF en las reacciones realizadas. De esta manera se puede llegar a deducir que los sueros antiofídicos colombianos podrían ser efectivos para inhibir la acción hemorrágica del veneno de *B. asper*. Aclarando que hacen falta aún más pruebas con venenos que varíen geográfica y ontogénicamente.

El veneno de *B. asper* del suroccidente colombiano se afirma como α -fibrinogenolítico y β -fibrinogenolítico. Se puede señalar la degradación notable de la cadena alfa del fibrinógeno ya que desde los 5 minutos de reacción con cualquier dilución de veneno utilizada en la reacción fibrinógeno: veneno, el nivel cuantitativo medido para esta cadena desciende notablemente, actuando mayormente sobre la cadena α . La concentración y el tiempo de exposición al veneno hacen que la destrucción sea correspondiente a estas variables. Aunque es imprescindible la realización de estudios de evaluación de la destrucción sobre cada cadena aislada. Teniendo en cuenta que la cadena γ no se ve afectada en este trabajo, también debe ser estudiada ya que el tiempo de exposición al veneno y la concentración del mismo forma PDF de distintos pesos moleculares que son el producto de la acción del veneno sobre ciertos lugares específicos en las cadenas del fibrinógeno.

Para proponer uno de los sueros antiofídicos me remito a la densidad de los agregados de proteínas visibles en la electroforesis de los sueros. El suero antiofídico del INS muestra una densidad menor de estos agregados. De esta manera es menos probable que se genere una respuesta inmune del organismo ante este suero, ya que la carga de proteínas administradas no sería tanta para generarla. No obstante el suero de Laboratorios Probiol en este trabajo demuestra una eficacia igual que el suero del INS. Más pruebas con los sueros antiofídicos tienen que ser realizadas para obtener un mayor número de resultados frente a su efectividad.

Las diferencias entre venenos de distintas regiones geográficas muestran una clara distribución de proteínas en distintos pesos moleculares para la misma especie, lo que indica la necesidad de realizar sueros antiofídicos con venenos de especies colectadas en las regiones de distribución del suero.

Dentro de las recomendaciones para el desarrollo de estudios futuros y de técnicas en la elaboración de los sueros antiofídicos son la necesidad de realizar sueros antiofídicos con venenos de especies colectadas en las regiones de distribución del suero. La realización de estudios de evaluación de la destrucción sobre cada cadena aislada. Más pruebas con los sueros antiofídicos tienen que ser realizadas para obtener un mayor número de resultados frente a su efectividad. Más pruebas con venenos que varíen geográfica y ontogénicamente.

Tabla 5: Análisis densitométrico del gel de electroforesis de las reacciones de fibrinógeno con diluciones de veneno de *Bothrops asper*. PM: peso molecular; Norm Vol: volumen normalizado. Gel No 2

Carril 2	Carril 2	Carril 2	Carril 3	Carril 3	Carril 3	Carril 4	Carril 4	Carril 4	Carril 5	Carril 5	Carril 5	Carril 6	Carril 6	Carril 6	Carril 7	Carril 7	Carril 7
Banda	PM (kd)	Norm Vol(ug)	Banda	PM (kd)	Norm Vol(ug)	Banda	PM (kd)	Norm Vol(ug)	Banda	PM (kd)	Norm Vol(ug)	Banda	PM (kd)	Norm Vol(ug)	Banda	PM (kd)	Norm Vol(ug)
1	66	2	1	66	0,4	1	66	1,07	1	66	1,3	1	66	1,65	1	66	1,63
2	52	2,62	2	52	2,23	2	52	2,7	2	52	2,83	2	52	3,08	2	52	2,65
3	46	2,38	3	46	3,14	3	46	2,39	3	46	2,37	3	46	2,51	3	46	2,26
			4	45,46	0,41	4	45,13	0,6	4	45,43	0,49	4	45,16	0,8	4	44,79	0,47
			5	44,01	0,62	5	43,65	0,19	5	44,41	#####	5	29,1				
			6	29,1	0,03	6	29,1	#####	6	29,1	#####	6	26,61				
			7	26,61	0,14	7	25,85	0,04	7	26,61	#####	7	24,14				
			8	24,14	0,01	8	24,14	#####	8	24,14	#####						
			9	23	0,02												

Tabla 6: Pesos moleculares de bandas resultantes de las reacciones veneno: fibrinógeno. Gel No 3

Carril 1	Carril 1	Carril 2	Carril 2	Carril 3	Carril 3	Carril 4	Carril 4	Carril 5	Carril 5	Carril 6	Carril 6
Banda	PM (kd)	Banda	PM(kd)	Banda	PM (kd)	Banda	PM(kd)	Banda	PM (kd)	Banda	PM (kd)
1	180	1	66	1	66	1	66	1	66	1	66
2	92	2	52	2	52	2	52	2	52	2	52
3	66	3	46	3	46	3	46	3	46	3	46
4	52			4	45,86	4	45,65	4	45,75	4	44,15
5	46			5	44,63	5	44,41	5	44,24	5	26,42
6	23			6	29,29	6	28,2	6	28,79	6	24,28
				7	26,27	7	25,6	7	26,56	7	23
				8	24,05	8	23,9	8	24,18		
				9	23	9	23	9	23		

Tabla 7: Análisis densitométrico del gel No 3

Carril 2	Carril 2	Carril 3	Carril 3	Carril 4	Carril 4	Carril 5	Carril 5	Carril 6	Carril 6
Banda	Norm Vol(ug)	Banda	Norm Vol(ug)	Banda	Norm Vol(ug)	Banda	Norm Vol(ug)	Banda	Norm Vol(ug)
1	2,8	1	1,07	1	1,01	1	1,14	1	0,3
2	2,45	2	1,72	2	2,24	2	2,12	2	2,41
3	1,75	3	1,71	3	2,46	3	2,01	3	2,37
		4	0,72	4	0,43	4	0,73	4	1,04
		5	0,26	5	0,2	5	0,42	5	0,45
		6	0,12	6	0,13	6	0,15	6	0,29
		7	0,22	7	0,22	7	0,26	7	0,14
		8	0,09	8	0,2	8	0,03		
		9	0,18	9	0,11	9	0,14		

Tabla 8: Comparación de pesos moleculares de bandas entre carriles del gel No. 3

Bandas	Carril 3	Carril 4	Carril 5	Carril 6
1	66	66	66	66
2	52	52	52	52
3	46	46	46	46
4	45,86	45,65	45,75	
5	44,63	44,41	44,24	44,15
6	29,29	28,2	28,79	
7	26,27	25,6	26,56	26,42
8	24,05	23,9	24,18	24,28
9	23	23	23	23

Tabla 9: Comparación del volumen normalizado de los productos de la degradación del Fibrinógeno (PDF).Gel No 3

	Carril 2	Carril 3	Carril 4	Carril 5	Carril 6
Banda	Norm Vol(ug)	Norm Vol(ug)	Norm Vol(ug)	Norm Vol(ug)	Norm Vol(ug)
1	2,8	1,07	1,01	1,14	0,3
2	2,45	1,72	2,24	2,12	2,41
3	1,75	1,71	2,46	2,01	2,37
4		0,72	0,43	0,73	
5		0,26	0,2	0,42	1,04
6		0,12	0,13	0,15	
7		0,22	0,22	0,26	0,45
8		0,09	0,2	0,03	0,29
9		0,18	0,11	0,14	0,14

Tabla 10: Pesos moleculares gel de reacciones veneno: fibrinógeno en una relación 1:400 a través del tiempo. Gel No 4

Carril 1	Carril 1	Carril 2	Carril 2	Carril 3	Carril 3	Carril 4	Carril 4	Carril 5	Carril 5	Carril 6	Carril 6	Carril 7	Carril 7	Carril 8	Carril 8
Band	MW (kd)	Band	MW (kd)	Band	MW (kd)	Band	MW (kd)	Band	MW (kd)	Band	MW (kd)	Band	MW (kd)	Band	MW (kd)
1	92	1	66	1	66	1	66	1	66	1	66	1	66	1	66
2	66	2	52	2	52	2	52	2	52	2	52	2	52	2	52
3	52	3	46	3	46	3	46	3	46	3	46	3	46	3	46
4	46			4	44,68	4	44,66	4	44,68	4	44,77	4	44,98	4	43,36
5	23			5	28,9	5	43,06	5	43,05	5	43,15	5	43,35	5	26,18
				6	26,34	6	29,08	6	28,61	6	26,27	6	26,06	6	23,92
				7	23	7	26,78	7	26,56	7	23	7	23	7	23
						8	23	8	23						
						9	20	9	19,74						

Tabla 11:
Comparación entre
bandas que
representan los PDF.
Gel No. 4

Carril 2	Carril 2	Carril 3 15 mins	Carril 4 30 mins	Carril 5 45 mins	Carril 6 60 mins	Carril 7 75 mins	Carril 8 90mins
Band	MW (kd)	MW (kd)	MW (kd)	MW (kd)	MW (kd)	MW (kd)	MW (kd)
1	66	66	66	66	66	66	66
2	52	52	52	52	52	52	52
3	46	46	46	46	46	46	46
4		44,68	44,66	44,68	44,77	44,98	
5			43,06	43,05	43,15	43,35	43,36
6		28,9	29,08	28,61			
7		26,34	26,78	26,56	26,27	26,06	26,18
8							23,92
9		23	23	23	23	23	23
10			20	19,74			

Tabla 12: Análisis densitométrico de las bandas del gel No 4

Carril 2	Carril 2	Carril 3	Carril 3	Carril 4	Carril 4	Carril 5	Carril 5	Carril 6	Carril 6	Carril 7	Carril 7	Carril 8	Carril 8
Banda	Norm Vol(ug)	Banda	Norm Vol(ug)	Banda	Norm Vol(ug)	Banda	Norm Vol(ug)	Banda	Norm Vol(ug)	Banda	Norm Vol(ug)	Banda	Norm Vol(ug)
1	1,9	1	1,62	1	1,38	1	1,17	1	1,15	1	0,99	1	1,02
2	3,03	2	2,7	2	2,23	2	2,15	2	2,08	2	1,9	2	2,16
3	2,07	3	1,91	3	1,89	3	2,01	3	2,17	3	2,41	3	2,56
		4	0,22	4	0,46	4	0,46	4	0,51	4	0,54	4	0,53
		5	0,16	5	0,23	5	0,18	5	0,33	5	0,35	5	0,34
		6	0,25	6	0,19	6	0,23	6	0,3	6	0,31	6	0,14
		7	0,14	7	0,32	7	0,43	7	0,46	7	0,48	7	0,25
				8	0,16	8	0,22						
				9	0,14	9	0,14						

Tabla 13: Pesos moleculares gel No 5.

Carril 1	Carril 1	Carril 2	Carril 2	Carril 3	Carril 3	Carril 4	Carril 4	Carril 5	Carril 5	Carril 6	Carril 6	Carril 7	Carril 7
Banda	PM (kd)	Banda	PM (kd)	Banda	PM (kd)	Banda	PM (kd)	Banda	PM (kd)	Banda	PM (kd)	Banda	PM (kd)
1	180	1	66	1	66	1	66	1	66	1	66	1	57,35
2	92	2	52	2	52	2	52	2	52	2	52	2	52,9
3	66	3	46	3	46	3	46	3	46	3	46	3	50,8
4	52			4	45,24	4	25,72	4	25,72	4	25,34	4	25,54
5	46			5	43,83							5	22,63
6	23			6	28,29								
				7	25,91								
				8	23,37								
				10	21,92								

Tabla 14: análisis densitométrico del gel No 5

Carril 2	Carril 2	Carril 3	Carril 3	Carril 4	Carril 4	Carril 5	Carril 5	Carril 6	Carril 6
Banda	Norm Vol(ug)	Banda	Norm Vol(ug)	Banda	Norm Vol(ug)	Banda	Norm Vol(ug)	Banda	Norm Vol(ug)
1	1,79	1	0,96	1	2,16	1	2,19	1	2,35
2	2,88	2	2,37	2	2,61	2	2,62	2	2,58
3	2,33	3	2,51	3	2,23	3	2,19	3	2,07
4		4	0,44	4	0,46	4	0,62	4	0,69
		5	0,27						
		6	0,08						
		7	0,17						
		8	0,06						
		10	0,03						

Tabla 15: Pesos moleculares gel No 6.

Lane 1	Lane 1	Lane 2	Lane 2	Lane 3	Lane 3	Lane 4	Lane 4	Lane 5	Lane 5	Lane 6	Lane 6	Lane 7	Lane 7
Band	MW (kd)	Band	MW (kd)	Band	MW (kd)	Band	MW (kd)	Band	MW (kd)	Band	MW (kd)	Band	MW (kd)
1	92	1	66	1	66	1	66	1	66	1	66	1	61,63
2	66	2	52	2	52	2	52	2	52	2	52	2	56,32
3	52	3	46	3	46	3	46	3	46	3	46	3	49,96
4	46			4	45,33	4	25,99	4	26,51	4	26,82	4	25,26
5	23			5	43,98							5	22,57
				6	28,83								
				7	26,54								
				8	24,24								
				9	23								

Tabla 16: Análisis Densitométrico del gel No 6

Lane 2	Lane 2	Lane 3	Lane 3	Lane 4	Lane 4	Lane 5	Lane 5	Lane 6	Lane 6
Band	Norm Vol(ug)	Band	Norm Vol(ug)	Band	Norm Vol(ug)	Band	Norm Vol(ug)	Band	Norm Vol(ug)
1	2,52	1	1,34	1	2,53	1	2,26	1	2,04
2	2,5	2	2,44	2	1,98	2	1,91	2	1,85
3	1,98	3	2,22	3	1,52	3	1,44	3	1,36
		4	0,29	4	0,73	4	0,69	4	0,64
		5	0,26	5	0,12	5	0,1	5	0,01
		6	0,08						
		7	0,18						
		8	0,09						
		9	0,11						

Tablas 17 18 19:
Pesos moleculares de las bandas resultantes de cada reacción Fibrinógeno: Veneno realizadas en este trabajo

Tabla 17.

Gel Fibrinógeno relaciones de veneno										Fibrinógeno veneno Tiempos 5 y 15 min							
5 min										5 min				15 min			
Carril 3 1:100		Carril 4 1:200		Carril 5 1:400		Carril 6 1:800		Carril 7 1:1600		Carril 3 1:100		Carril 4 1:400		Carril 5 1:400		Carril 6 1:100	
Banda	PM (kd)	Banda	PM (kd)	Band	MW (kd)	Band	MW (kd)	Band	MW (kd)	Band	MW (kd)	Band	MW (kd)	Band	MW (kd)	Band	MW (kd)
4	45,46	4	45,13	4	45,43	4	45,16	4	44,79	4	45,86	4	45,65	4	45,75	4	44,15
5	44,01	5	43,65	5	44,41	5	29,1			5	44,63	5	44,41	5	44,24	5	26,42
6	29,1	6	29,1	6	29,1	6	26,61			6	29,29	6	28,2	6	28,79	6	24,28
7	26,61	7	25,85	7	26,61	7	24,14			7	26,27	7	25,6	7	26,56	7	23
8	24,14	8	24,14	8	24,14					8	24,05	8	23,9	8	24,18		
9	23									9	23	9	23	9	23		

Tabla 18.

Gel Fibrinógeno: veneno 1:400 tiempos											
15 mins		30 mins		45 mins		60 mins		75 mins		90 mins	
Carril 3		Carril 4		Carril 5		Carril 6		Carril 7		Carril 8	
Band	MW (kd)	Band	MW (kd)	Band	MW (kd)	Band	MW (kd)	Band	MW (kd)	Band	MW (kd)
4	44,68	4	44,66	4	44,68	4	44,77	4	44,98	4	43,36
5	28,9	5	43,06	5	43,05	5	43,15	5	43,35	5	26,18
6	26,34	6	29,08	6	28,61	6	26,27	6	26,06	6	23,92
7	23	7	26,78	7	26,56	7	23	7	23	7	23
		8	23	8	23						
		9	20	9	19,74						

Tabla 19.

Gel de Neutralización Suero INS 1:100		Gel de Neutralización Suero Lab. Prob. 1:100	
5 mins		5 mins	
Carril 3		Carril 3	
Band	MW (kd)	Band	MW (kd)
4	45,24	4	45,33
5	43,83	5	43,98
6	28,29	6	28,83
7	25,91	7	26,54
8	23,37	8	24,24
9	23	9	23
10	21,92		

Tabla 20: Comparación de pesos moleculares de los Sueros antiofídicos utilizados.

INS		Laboratorios Probiol	
Band	MW (kd)	Band	MW (kd)
1	57,35	1	61,63
2	52,9	2	56,32
3	50,8	3	49,96
4	25,54	4	25,26

Tabla 21: Promedio de peso molecular por cada banda que representa producto de la degradación del fibrinógeno los geles donde se aprecian repeticiones de dichas bandas

	Banda	Promedio	Desviación std.
GEL No 2	4	45,1940	,27153
	5	44,0233	,38018
	6	29,1000	,00000
	7	26,4200	,38000
	8	24,1400	,00000
GEL No 3	4	45,7533	,10504
	5	44,3575	,21125
	6	28,7600	,54562
	7	26,2125	,42516
	8	24,1025	,16460
	9	23,0000	,00000
GEL No 4	4	44,7540	,13334
	5	43,1940	,15209
	6	20,8633	,23714
	7	26,3650	,26350
	9	23,9200	,00000
	8	23,0000	,00000
	10	19,8700	,18385

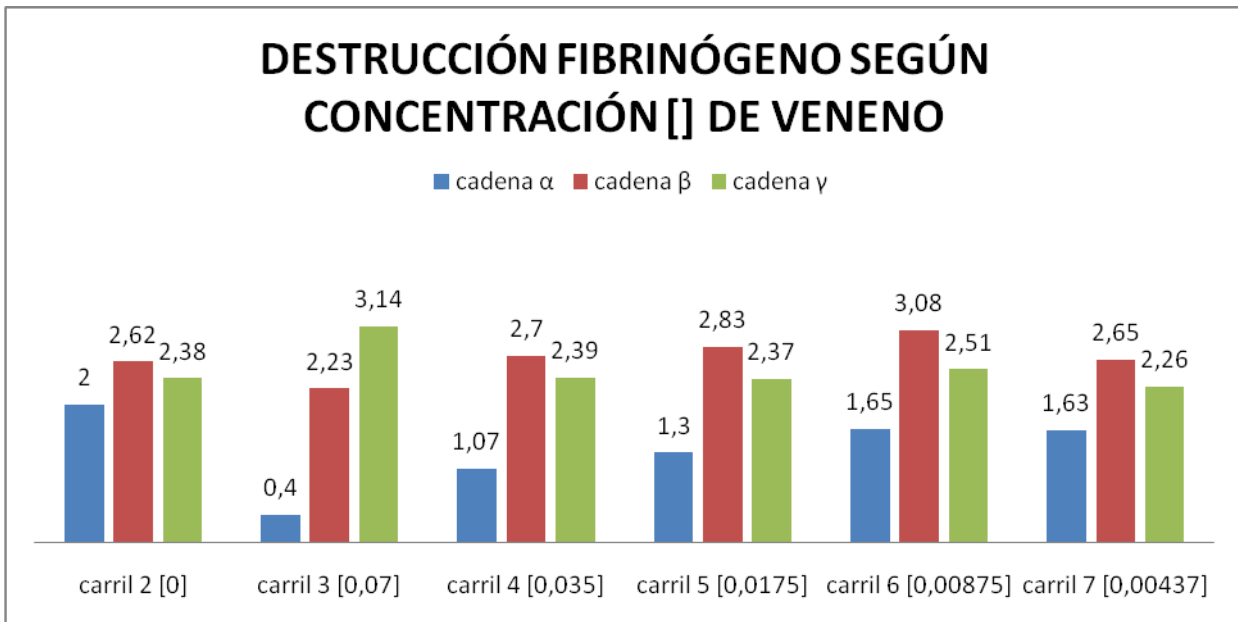
Tabla 22: Coeficiente de correlación de Spearman Degradación-Concentración

			Degradación	Concentración
Spearman's rho	Degradación	Coeficiente de Correlación	1,000	-,943**
	Concentración	Coeficiente de Correlación	-,943**	1,000

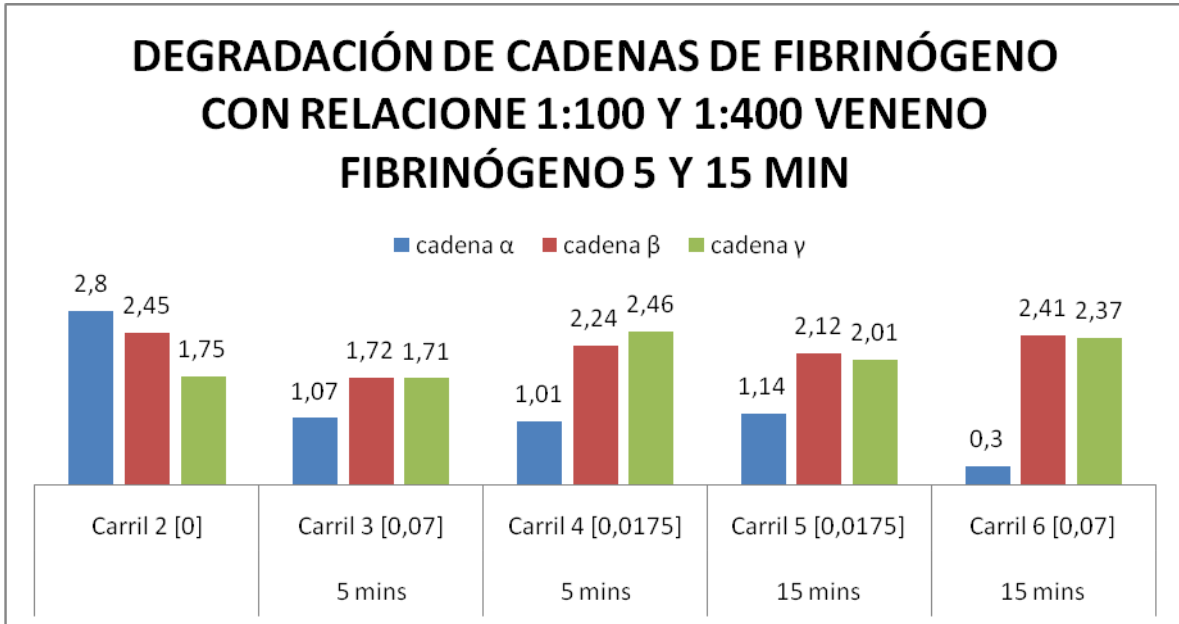
Tabla 23: Coeficiente de Correlación de Spearman Degradación-Tiempo

			Degradación	Tiempo
Spearman's rho	Degradación	Coeficiente de Correlación	1,000	-,964**
	Tiempo	Coeficiente de Correlación	-,964**	1,000

Gráfica 1: Destrucción de las cadenas de fibrinógeno según las diferentes diluciones de veneno.



Gráfica 2: Degradación de las cadenas alfa, beta y gama del fibrinógeno expuesto a las diluciones 1:100 y 1:400 de veneno de *B. asper*.



Gráfica 3: Degradación del fibrinógeno a través del tiempo de exposición al veneno de *B. asper* en la dilución 1:400.

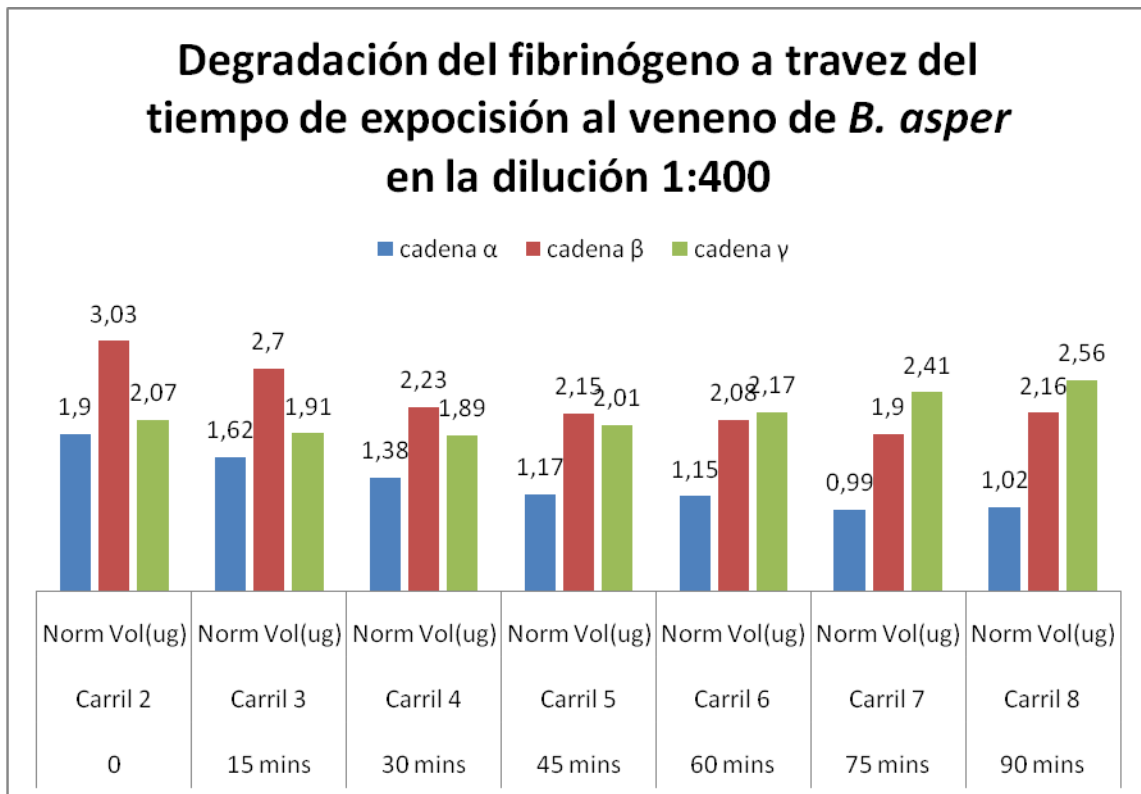


Figura 14: Análisis pixelar de la seroneutralización del efecto del veneno de *Bothrops asper* sobre fibrinógeno humano. A. Fibrinógeno estándar; B. Reacción Veneno: Fibrinógeno en una relación 1:100 durante 5 minutos. C. D. E. Repeticiones de la reacción Veneno: Fibrinógeno: Suero Antiofídico INS, 0,07ug de veneno de *B. asper*, 7ug de Fibrinógeno, 0,01ul de Suero antiofídico del INS; F. 0,01ul de Suero antiofídico del INS.

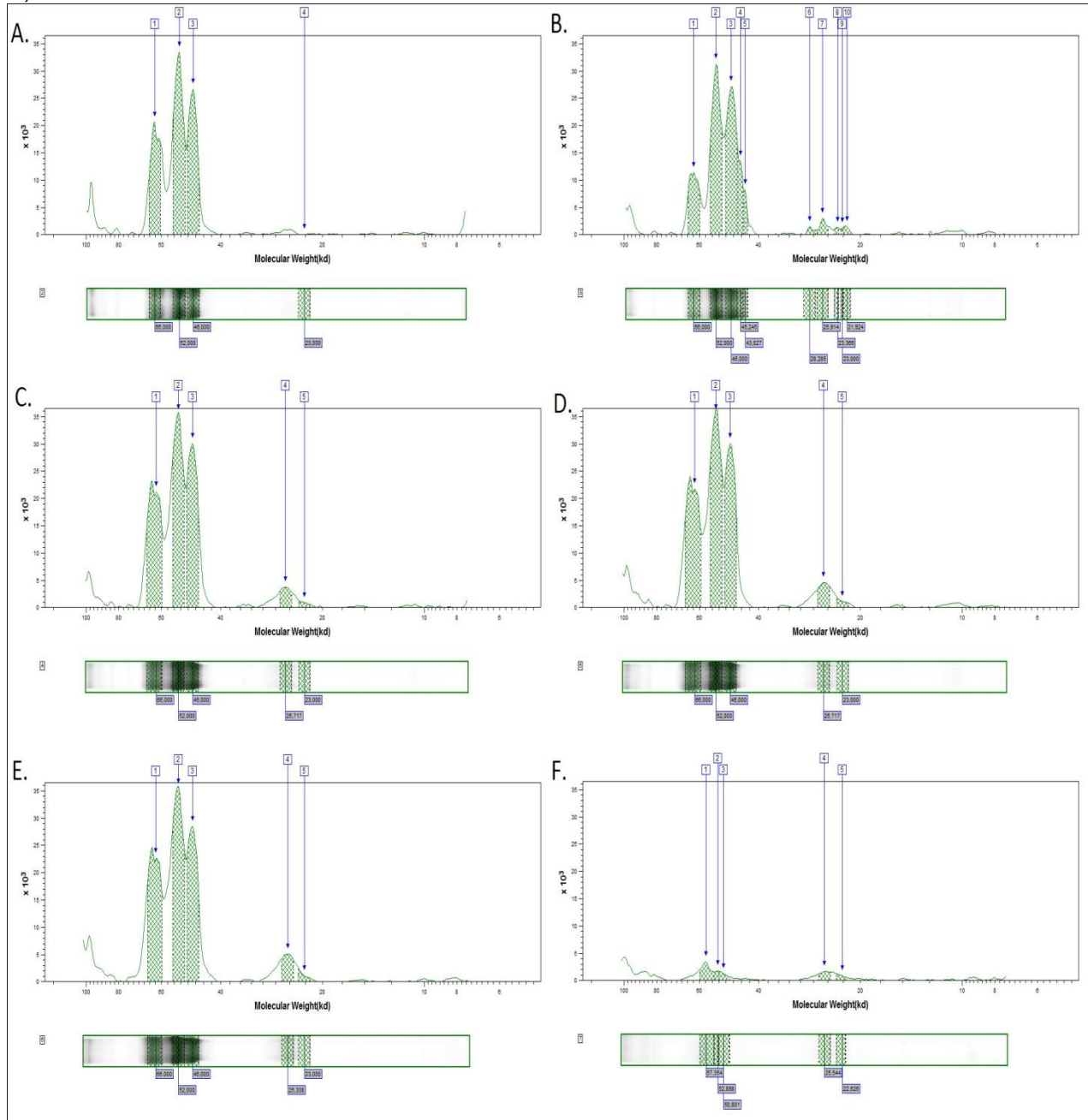


Figura 15: Análisis pixelar de la seroneutralización del efecto del veneno de *Bothrops asper* sobre fibrinógeno humano. A. Fibrinógeno estándar; B. Reacción Veneno: Fibrinógeno en una relación 1:100 durante 5 minutos. C. D. E. Repeticiones de la reacción Veneno: Fibrinógeno: Suero Antiofídico de Laboratorios Probiol, 0,07ug de veneno de *B. asper*: 7ug de Fibrinógeno: 0,028ul de Suero antiofídico de Laboratorios Probiol; F. 0,028ul de Suero antiofídico de Laboratorios Probiol

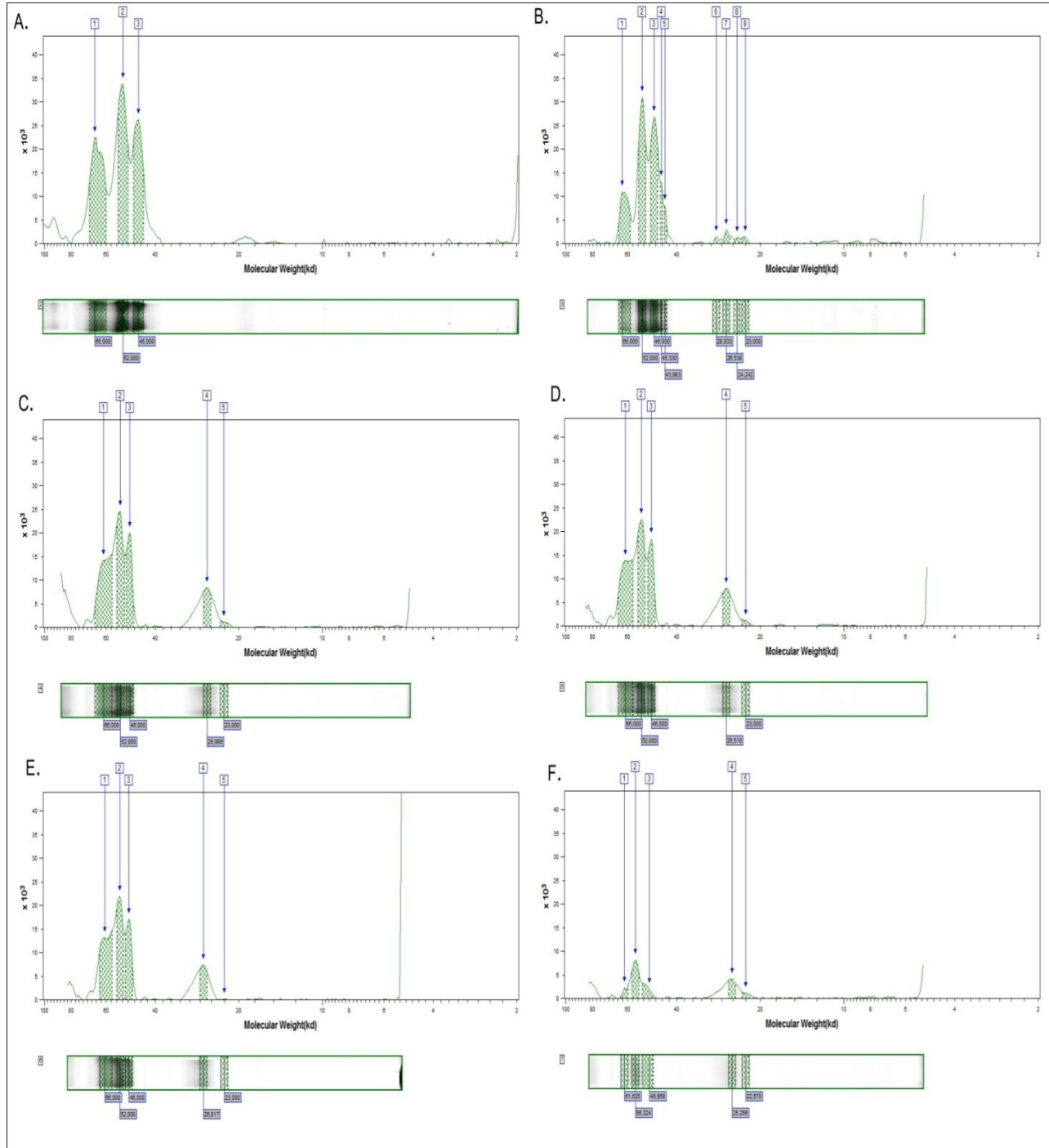


Figura 16: Curvas de calibración de marcadores de peso molecular. A. Marcador de Peso Molecular gel No 2. B. Marcador de peso molecular Gel No. 3. C. Marcador de peso molecular Gel No. 4. D. Marcador de peso Molecular Gel No. 5. E. Marcador de peso molecular Gel No. 6.

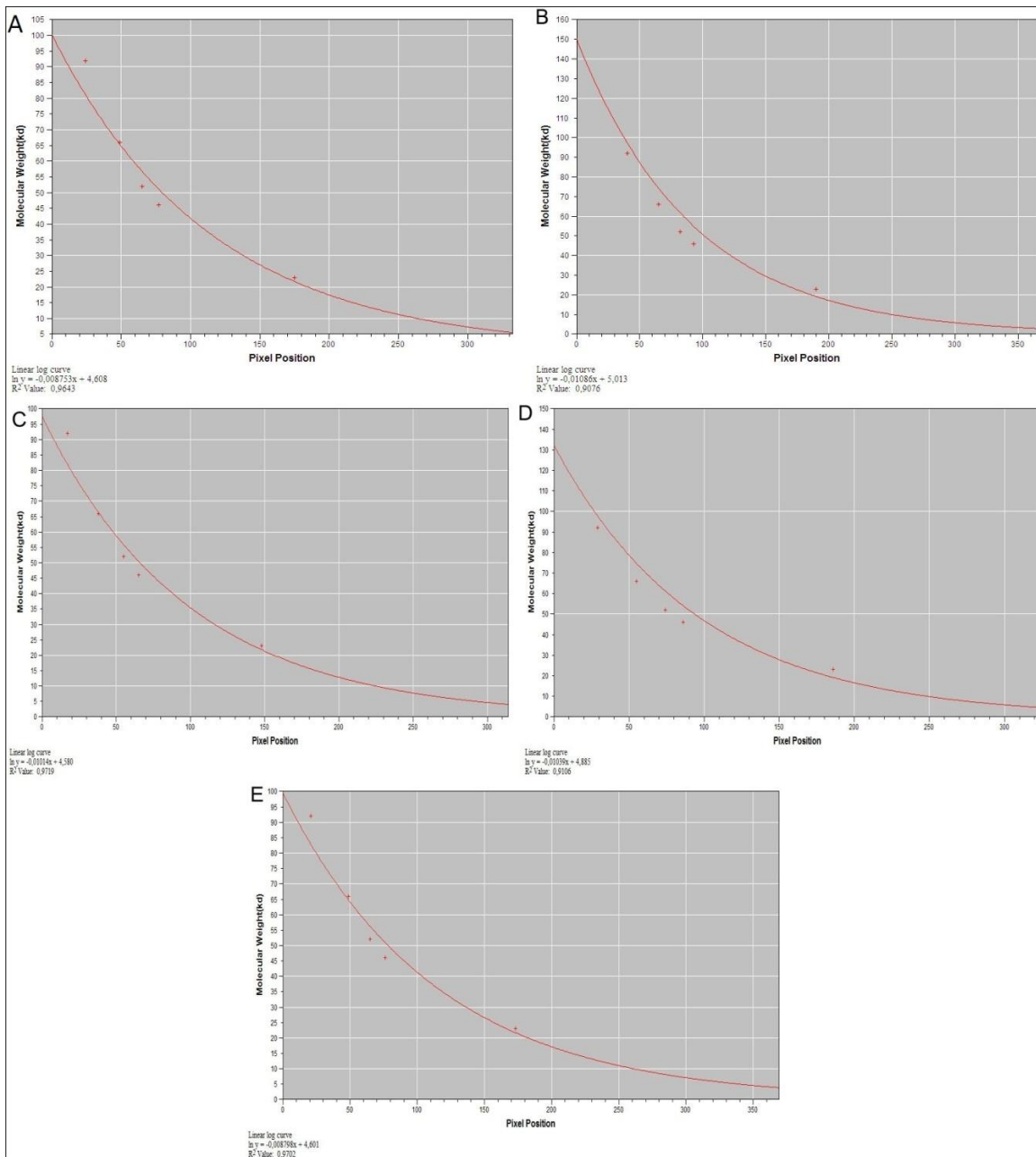
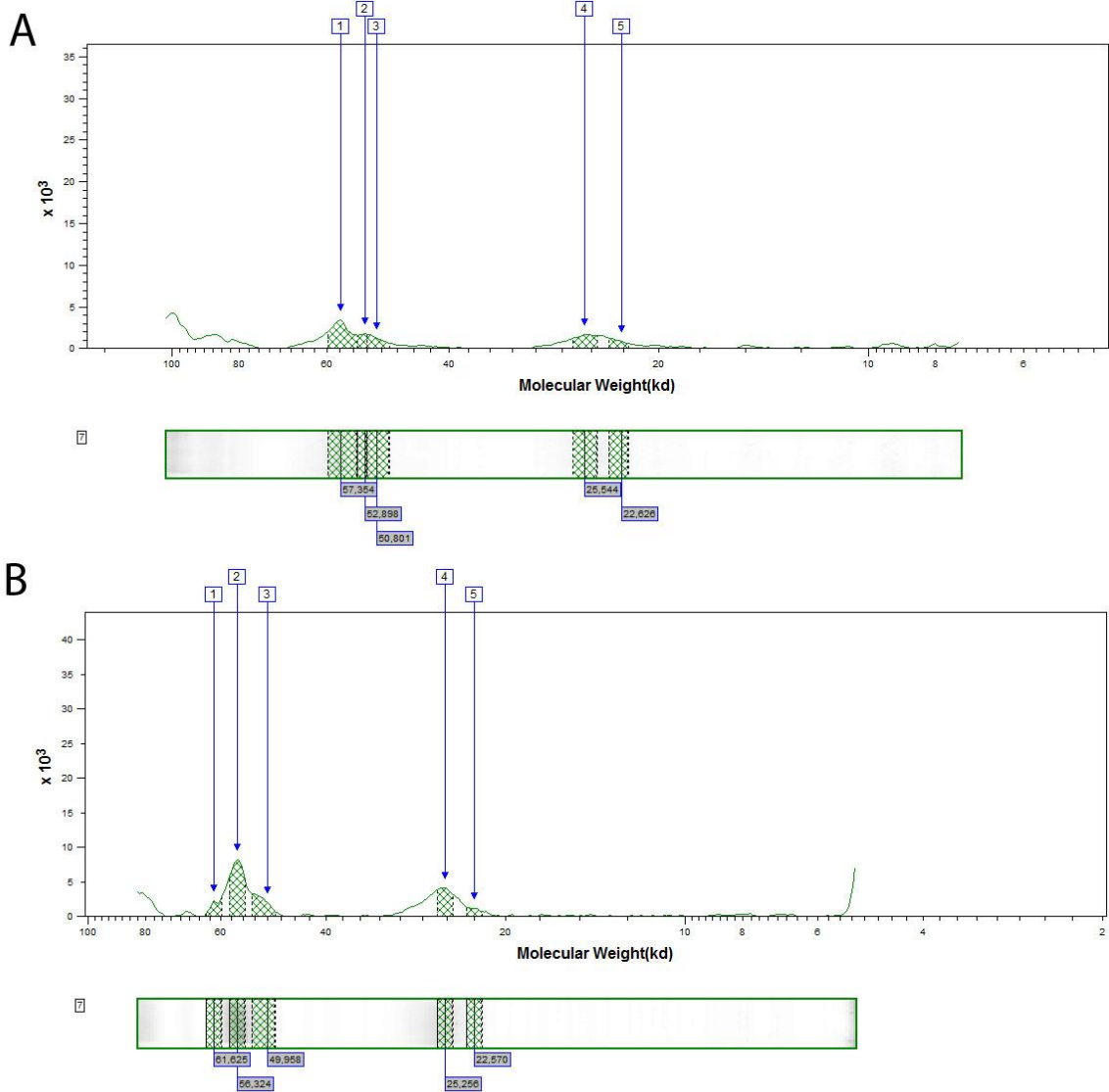


Figura 17: Comparación de carriles que contienen los sueros antiofídicos utilizados en este estudio. A. Instituto Nacional de Salud B. Laboratorios Probiol.



10. LITERATURA CITADA

- Alberto Alape-Girón, *et al.* 2009. Studies on the venom proteome of *Bothrops asper*: Perspectives and applications. *Toxicon* 54 938–948
- Adolfo R. de Roodt, *et al.* 1999. Neutralización cruzada de veneno de *Bothrops jararacussu* por sueros antiofídicos heterólogos. *MEDICINA (Buenos Aires)*. 59: 238-242
- Adolfo R. de Roodt, *et al.* 2004. Toxicidad de venenos de serpientes de importancia médica en México. *Gac Méd Méx* Vol.141 No. 1, 2005
- Alagon Cano A. 2001. Anticuerpos Terapéuticos: El Caso De Los Antivenenos. UNAM.
- ANGEL, Rodrigo. 1987. Serpientes de Colombia Su relación con el Hombre. Medellín. Secretaria de Educacion y Cultura de Antioquia (Fondo rotatorio de publicaciones). P 232
- Ayerbe S. 2002. Ofidismo en Colombia. Enfoque, Diagnóstico y Tratamiento. En: Ordóñez C A, Ferrada R y Buitrago R. 1ª ed. Cuidado Intensivo y Trauma. Bogotá, D.C. Ed. Distribuna Ltda; 766.
- Barrantes A, Solis V, Bolaños R. 1985. Alterations in the coagulation mechanisms of patients bitten by *Bothrops asper* (Terciopelo). *Toxicon*. 23: 399-407.
- Bell, Jr, W. R. 1997. Defibrinogenating enzymes. *Drugs* 54 (suppl. 3), 18–30
- Bjarnason, J. B. and Fox, J. W. 1995. Snake venom metalloproteinases: reprotolysins. *Methods Enzymol*. 248, 345–368
- Blombäck B, and Blombäck M.1957. Purification of human and bovine fibrinogen. *Ark. Kemi*. 10:415.
- Bolaños, R. 1982. Las serpientes venenosas de Centroamérica y el problema del ofidismo. Primera parte. Aspectos zoológicos, epidemiológicos y biomédicos. *Rev. Cost. Cienc. Med.* 3, 165 184.
- Braud, S., Bon, C. and Wisner, A. 2000. Snake venom proteins acting on hemostasis. *Biochimie* 82, 851–859
- Campbell, J. A. y Lamar, W. W. 1989. The venomous reptiles of Latin America. Ithaca, New York (Cornell Univ. Press), 425 pp
- Campbell, J. A. y Lamar, W. W.2004. The venomous reptiles of the western hemisphere; vols. 1, 2; Ithaca, New York (Cornell University Press), 870 pp.

Cardoso JLC., Fan HW., Franca FOS., *et al.* 1993. Randomized comparative trial of three antivenoms in the treatment of envenoming by lance-headed vipers (*Bothrops jararaca*) in Sao Paulo, Brazil. Q. J. Med. 56: 315-325.

Caterina RD, Husted S, Wallentin L, Agnelli G, Bachmann F, Baigent C, *et al.* 2007. For the Task Force of the European Society of Cardiology.. Eur Heart J. 28:880-913.

Chippaux J.P. & Goyfon M. 1998. Venoms, Antivenoms and Immunotherapy. Toxicon 36(6):823-846.

Cisneros D. F., Touzet J. M. 2004. Distribution and conservation status of *Bothrops asper* (GARMAN, 1884) in Ecuador (Squamata: Serpentes: Viperidae: Crotalinae) HERPETOZOA 17 (3/4): 135 – 141

Coronel T. A. 2008. Determinación del efecto citotóxico del veneno de *Bothrops asper* (Serpentes: Viperidae) en linfocitos humanos y células mononucleares de sangre periférica in vitro, mediante los ensayos de índice mitótico, viabilidad celular y apoptosis. Trabajo de Grado para Obtener por el Título de Biólogo. Universidad del Cauca.

Cristancho Pabón , R. E, J. Ramón Camargo, L. F. Arbeláez Ramírez. Proteínas plasmáticas como marcadores de peso molecular. *Bistua: Revista de la Facultad de Ciencias Básicas* [en línea] 2007, 5 (002):[fecha de consulta: 21 de octubre de 2008] Disponible en: ISSN 0120-4211

Dart RC., MacNally J. 2001. Efficacy, safety, and use of snake antivenoms in the United States. Annals of Emergency Medicine. 37: 181-188.

Deutsch DG, Mertz ET. 1970. Plasminogen: Purification from Human Plasma by Affinity Chromatography. Science 1095-1096.

Doolittle R.F. 1981. Fibrinogen and fibrin. Sci. Am. 92-101.

Duque Osorio, J.F., A. Sánchez, L. Fierro, S. Garzón & R.S. Castaño. 2007. Venenos de serpientes y moléculas antiveneno. Rev. Acad. Colomb. Cienc. 31 (118): 109-137. ISSN 0370-3908.

Enciclopedia virtual de las serpientes. Especie: *Bothrops asper* URL: http://www.serpientes-snakes.com.ar/superfamilias/bothrops_asper.htm consultado 3 de enero 2009.

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, 969–985

Gay, Claudia C., *et al.* 2004. Aislamiento y caracterización de una hemorragina ácida del veneno de *Bothrops alternatus*. Universidad Nacional del Nordeste Comunicaciones Científicas y Tecnológicas 2004. Resumen: E-014

Gene, J. A., Roy, A., Rojas, G., Gutierrez, J. M. and Cerdas, I. 1989. Comparative study on coagulant, defibrinating, fibrinolytic and fibrinogenolytic activities of Costa Rican crotaline snake venoms and their neutralization by a polyvalent antivenom. *Toxicon* 27, 841-848.

Gutierrez, J. M. 1995. Clinical toxicology of snakebite in Central America. In: *Clinical Toxicology of Animal Venoms and Poisons* (Meier, J. and White, J., Eds). Boca Raton, FL: CRC Press (in press).

Gutierrez J. M. 1995. Evaluación de la capacidad de cuatro antivenenos comerciales para neutralizar el veneno de la serpiente *Bothrops asper* (terciopelo) de Costa Rica. *Toxicon*; 33: 1242-1247.

Gutiérrez, J. M., Chaves, F. y Bolaños, R. 1980. Estudio comparativo de venenos de ejemplares recién nacidos y adultos de *Bothrops asper*. *Rev. Biol. Trop.* 28, 341-351.

Gutiérrez JM, Rucavado A, Escalante T, Díaz C. 2005. Hemorrhage induced by snake venom metalloproteinases: biochemical and biophysical mechanisms involved in microvessel damage. *Toxicon*. 45: 997-1011.

Gutiérrez, J. M., Chaves, F. y Bolaños, R. 1980. Estudio comparativo de venenos de ejemplares recién nacidos y adultos de *Bothrops asper*. *Rev. Biol. Trop.* 28, 341-351.

Hedges. 2002. Higher-Level Relationships of Snakes Inferred from Four Nuclear and Mitochondrial Genes. *C.R. Biologies* 325: 977–985.

Heise P.J., Maxson L.R., Dowling H.G. & S. B. Hedges. 1995. Higher-Level Snake Phylogeny Inferred from Mitochondrial DNA Sequences of 12s rRNA and 16s rRNA Genes. *Mol Biol Evol* 12(2): 259-265.

Henschen A, Lottspeich F, Kehl M, Southan C. Covalent structure of fibrinogen. *Ann N Y Acad Sci.* 1983;408: 28-43.

Ho M., Warrell DA., Looareesuwan S., *et al.* 1986. Clinical significance of venom antigen levels in patients envenomed by the Malayan pit viper (*Calloselasma rhodostoma*). *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 35: 579 –587.

Jimenez-Porras, J. M. 1964. Venom proteins of the fer-de-lance, *Bothrops atrox*, from Costa Rica. *Toxicon* 2,155-166.

- Jorge MT., Cardoso JLC., Castro SCB., *et al.* 2001. A randomized “blinded” comparison of two doses of antivenom in the treatment of *Bothrops* envenoming in São Paulo, Brazil. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 89: 111-114.
- Joseph, J. S. and Kini, R. M. 2004. Snake venom prothrombin activators similar to blood coagulation factor Xa. *Curr. Drug Targets Cardiovasc. Haematol. Disord.* 4, 397–416
- Kelly C.M.R., Barker N.P. & M.H. Villet. 2003. Phylogenetics of Advanced Snakes (Caenophidia) Based on Four Mitochondrial Genes. *Systematic Biology* 52(4):439-459.
- Kevin R. Siebenlist, *et al.* 2005. Studies on the basis for the properties of fibrin produced from fibrinogen-containing γ' chains. *Blood.* 106(8): 2730–2736.
- Kini R. M. 2006. Anticoagulant proteins from snake venoms: structure, function and mechanism. Review Article. *Biochem. J.* 397, 377–387
- Kini, R. M. (2004) Platelet aggregation and exogenous factors from animal sources. *Curr. Drug Targets Cardiovasc. Haematol. Disord.* 4, 301–325
- Kini, R. M., Rao, V. S. and Joseph, J. S. 2002. Procoagulant proteins from snake venoms. *Haemostasis* 31, 218–224
- Kini, R. M., Joseph, J. S. and Rao, V. S. 2002. Prothrombin activators from snake venoms. In *Perspectives in Molecular Toxinology* (Menez, A., ed.), pp. 341–355, John Wiley, Chichester
- Kini, R. M. 2005. Structure–function relationships and mechanism of anticoagulant phospholipase A2 enzymes from snake venoms. *Toxicon* 45, 1147–1161
- Kornalik, F. 1991. The influence of snake venom proteins on blood coagulation. In *Snake Toxins* (Harvey, A. L., ed.), Pergamon Press, New York 323–383
- Lauricella A.M. 2007. Variabilidad de las redes de fibrin. *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana.* 41 (1): 7-19.
- Lee M.S.Y. & J.D. Scanlon. 2002. Snake Phylogeny Based on Osteology, Soft Anatomy and Ecology. *Biol Rev Camb Philos Soc* 77: 333-401.
- Malasit P., Warrell DA., Chantavanich P., *et al.* 1986. Prediction, prevention and mechanism of early (anaphylactic) antivenom reactions in victims of snake bites. *Br. Med. J.* 292: 17-20.

Maruñak S. L., *et al.* 2004. Mice plasma fibrinogen consumption by thrombin-like enzyme present in rattlesnake venom from the north-east region of Argentina. *Medicina* (Buenos Aires). 64: 509-517

Maruñak S. L., *et al.* 2006. Acción del veneno de *Bothrops jararacussu* de Argentina sobre la coagulación sanguínea. *In Vet.* 8,1

Markland, F. S. 1998. Snake venoms and the hemostatic system. *Toxicon* 36, 1749–1800

Mattison C. 1995. *The Encyclopedia of Snakes*. Facts on Life, Inc. New York. 256 pp.

Mosquera N. P. 2008. Efecto antiinflamatorio del extracto de la raíz de la planta *Polygala panicula* en ratones inoculados con dosis subletal de *Bothrops asper* (*Serpentes: Viperidae*). Trabajo de grado para optar por el título de Biólogo. Universidad del Cauca.

Meier, J. and Stocker, K. (1991) Effects of snake venoms on hemostasis. *Crit. Rev. Toxicol.* 21, 171–182

Ministerio De Salud Dirección General De Medicamentos Insumos Y Drogas del Perú. 2007. INFORME TECNICO N° 12 – 2007.

Organización Panamericana de la Salud. 2007. Informe Final de la Consulta Técnica sobre Accidentes con Animales Ponzosñosos en Latino América São Paulo, São Paulo, Brasil, PANAFTOSA.55p.

Otero R., *et al.* 2007. Accidente bothrópico en Colombia: estudio multicéntrico de la eficacia y seguridad de Antivipmyn-Tri®, un antiveneno polivalente producido en México. *IATREIA*; 20: 244-262.

Otero R., *et al.* 2002. Características bioquímicas y capacidad neutralizante de cuatro antivenenos polivalentes frente a los efectos farmacológicos y enzimáticos del veneno de *Bothrops asper* y *Porthidium nasutum* de Antioquia y Chocó. *IATREIA*; 15: 5-15.

Otero R., Mesa MB. , 2001. Mordeduras graves por serpientes. En: Quevedo A., Martínez Y., Duque JI., Mejía JA. (Eds). *El Niño en Estado Crítico*. Primera edición. Medellín. CIB. pp. 571-578.

Otero R., Tobón GS., Gómez LF., *et al.* 1992. Accidente ofídico en Antioquia y Chocó. Aspectos clínicos y epidemiológicos (Marzo de 1989-Febrero de 1990). *Acta Méd. Colomb.*; 17: 229-249.

Otero-Patiño R., Cardoso JLC., Higashi HG., *et al.* 1998. A randomized blinded comparative trial of one pepsin digested and two whole IgG antivenoms in *Bothrops* snake bites in Urabá, Colombia. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*; 58: 183 – 189.

Otero R., Núñez V., Gutiérrez JM., *et al.* 1997. Neutralizing capacity of a new monovalent anti – *Bothrops atrox* antivenom: comparison with two commercial antivenoms. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*; 30: 375-379.

Otero R., Núñez V., Barona J., Díaz A., Saldarriaga M. 2002. Características bioquímicas y capacidad neutralizante de cuatro antivenenos polivalentes frente a los efectos farmacológicos y enzimáticos del veneno de *Bothrops asper* y *Porthidium nasutum* de Antioquia y Chocó. *Iatreia*; 15 (en prensa).

Otero R., Callejas ME., Gutiérrez J., *et al.* 2001. Necesidades reales de antivenenos en Colombia. Características de los productos y del mercado. *Revista Epidemiológica de Antioquia* (en prensa).

Otero R., Galeano LA., Bolívar JA., *et al.* 2001. Aspectos actuales de las mordeduras de serpientes en Colombia. Propuesta de intervención para un problema grave de salud en Antioquia y Chocó. *Revista Epidemiológica de Antioquia* (en prensa).

Otero R., Núñez V., Osorio RG., Gutiérrez JM., Giraldo CA., Posada LE. 1995. Ability of six Latin American antivenoms to neutralize the venom of mapaná equis (*Bothrops atrox*) from Antioquia and Chocó (Colombia). *Toxicon*; 33: 809-815.

Ouyang, C. and Teng, C. M. 1976. Fibrinogenolytic enzymes of *Trimeresurus* venom. *Biochim. Biophys. Acta* 420, 298–308

Perez F., Bover R. 2007. La nueva cascada de la coagulación y su posible influencia en el difícil equilibrio entre trombosis y hemorragia. *Rev Esp Cardiol.* 60: 1217 – 1219

Perez J. C. y E.E. Sánchez. 1999. Natural Protease Inhibitors to Hemorrhagins in Snake Venoms and Their Potential Use in Medicine. *Toxicon* 37(5): 703-28.

Peters, J. A. y Orejas-Miranda, B. y Vanzolini, P. E. 1986. Catalogue of the Neotropical squamata, Part I: Snakes. Revised Edition. Washington, London (Smithsonian Institution Press), pp. 1-347.

Pirkle, H. and Stocker, K. 1991. Thrombin-like enzymes from snake venoms; an inventory. *Thromb. Haemostasis* 65, 444–450

Pirkle, H. and Theodor, I. 1998. Thrombin-like enzymes. In *Enzymes from Snake Venom* (Bailey, G. S., ed.), Alaken Inc., Fort Collins, CO. 39–69

Pough F.H., Janis C.M. & J.B. Heiser. 1999. Vertebrate Life. Fifth Edition. Prentice Hall Inc., Simon & Shuster Inc. New Jersey. 733 pp.

Rucavado A, Soto M, Escalante T, Loría GD, Arni R, Gutiérrez JM. 2005. Thrombocytopenia and platelet hypoaggregation induced by *Bothrops asper* snake venom. Toxins involved and their contribution to metalloproteinase-induced pulmonary hemorrhage. *Thromb Haemost.* 94: 123-131.

Ruiz de Torrent R. M., *et al.* 2006. Acción del veneno de *bothrops jararacussu* de Argentina sobre la coagulación sanguínea. *In Vet.* Vol. 8 (1). 1-12.

Scanlon J.D. & M.S. Lee. 2000. The Pleistocene Serpent Wonambi and the Early Evolution of Snakes. *Nature* 403(6768): 416- 420.

Schafer Al. *et al.* 1994. Coagulation cascade: an overview. En: Loscalzo J, Schafer Al, editores. *Thrombosis and hemorrhage.* Boston: Blackwell Scientific. 3-12.

SIVIGILIA. 2007. Instituto nacional de salud. OFIDOCO-2007. Bogotá D. C.

Slowinski J.B. & R. Lawson. 2002. Snake Phylogeny: Evidence From Nuclear and Mitochondrial Genes. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 24: 194-202.

Smith DC., Reddi KR., Laing G., Theakston RDG., Landon J. 1992. An affinity purified ovine antivenom for the treatment of *Vipera berus* envenoming. *Toxicon.* 30(8): 865-871.

Solorzano, A. y Cerdas, L. 1989. Reproductive biology and distribution of the Terciopelo, *Bothrops asper* GARMAN (Serpentes: Viperidae) in Costa Rica.- *Herpetologica*, Johnson City; 45 (4): 444-450.

Sullivan, J. B. 1987. Past, present, and future immunotherapy of snake venom poisoning. *Ann. Emerg. Med.* 16, 938-944.

Theakston RDG., Fan HW., Warrell DA., Dias Da Silva W., Higashi HG. and BIASG. 1992. Use of enzyme immunoassays to compare the efficacy and assess dosage regimens of three Brazilian *Bothrops* antivenoms. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 447: 593-604.

Townsend T.M., Larson A., Louis E. & J.R. Macey. 2004. Molecular Phylogenetics of Squamata: The Position of Snakes, Amphisbaenians, and Dibamids, and the Root of the Squamate Tree. *Systematic Biology* 53(5):735-757.

Tu, A. T. 1977. *Venoms: Chemistry, and Molecular Biology.* New York: Wiley. 560 pp

Vidal N. 2002. Colubroid Systematics: Evidence for an Early Appearance of the Venom Apparatus Followed by Extensive Evolutionary Tinkering. *J Toxicol Toxin Rev* 21:21-41.

White J. 2005. Snake venoms and coagulopathy. *Toxicon*, 45: 951-967.

Wijeyewickrema LC, Berndt MC. Andrews RK. 2005. Snake venom probes of platelet adhesion receptors and their ligands. *Toxicon*. 45:1051–61. [PubMed: 15922774]

World Health Organization. 1981. *Progress in the Characterization of Venoms and Standardization of Antivenoms*, 44 pp. Geneva: World Health Organization.

Wijeyewickrema LC, Berndt MC. 2005. Andrews RK. Snake venom probes of platelet adhesion receptors and their ligands. *Toxicon*. 45:1051–61. [PubMed: 15922774]

Yarlequé A., *et al.* 2003. Características bioquímicas y acción biológica de una hemorragina del veneno de *Bothrops brazili*. *Anales de la Facultad de Medicina Universidad Nacional Mayor de San Marcos*. Vol. 64, N° 3. 159 – 166

Yarlequé A., *et al.* 2003. Características bioquímicas y acción biológica de una hemorragina del veneno de *Bothrops brazili*. *Anales de la Facultad de Medicina Universidad Nacional Mayor de San Marcos*. Vol. 64, N° 3. 159 – 166

Y. Cury, *et al.* 2002. Evaluation of antivenoms in the neutralization of hyperalgesia and edema induced by *Bothrops jararaca* and *Bothrops asper* snake venoms. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 35: 1221-1228