

**DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD COAGULANTE DEL
VENENO DE *Bothrops ayerbei* Folleco 2010 (Equis Patiana) EN PLASMA
HUMANO.**

DANNI YOHANI SANTANA ROSERO

**UNIVERSIDAD DEL CAUCA
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES EXACTAS Y DE LA EDUCACIÓN
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA
POPAYÁN
2011**

**DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD COAGULANTE DEL
VENENO DE *Bothrops ayerbei* Folleco 2010 (Equis Patiana) EN PLASMA
HUMANO.**

DANNI YOHANI SANTANA ROSERO

Trabajo de grado presentado como requisito para optar al título de Biólogo

DIRECTOR.

SANTIAGO AYERBE GONZÁLEZ, MD.

ASESORES

**JIMMY ALEXANDER GUERRERO VARGAS
JOSÉ TORIBIO BELTRÁN VIDAL**

**UNIVERSIDAD DEL CAUCA
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES EXACTAS Y DE LA EDUCACIÓN
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA
POPAYÁN
2011**

Nota de Aceptación

Director _____
MD. Santiago Ayerbe González

Jurado _____
MSc. María del Pilar Rivas Pava

Jurado _____
MD. Franklin Correa

Lugar y fecha de sustentación: 9 de Junio de 2011

AGRADECIMIENTOS

Son muchas las personas e instituciones a quien tengo que agradecer espero poder reconocer de alguna manera todo su apoyo incondicional que me prestaron en mi trabajo de grado, primero que todo agradezco al Centro de Investigaciones Biomédicas- Bioterio (CIBUC), y al Grupo de Investigaciones Herpetológicas y Toxinológicas de la Universidad del Cauca (GIHT) por la prestación de servicios, y actividades que se realizaron en sus instalaciones, también a todos sus miembros especialmente a mi director M.D Santiago Ayerbe González quien me brindó su valiosa amistad y asesoría en el desarrollo de esta investigación.

A mis asesores José Beltrán Vidal y Jimmy Alexander Guerrero Vargas por ofrecerme su apoyo y amistad incondicional, también les agradezco por la motivación y asesorías prestadas durante la ejecución de este proyecto.

Al laboratorio de hematología de la Universidad del Cauca y a sus integrantes, primordialmente la doctora Julieta Montero y el M.D Franklin Correa quienes me ayudaron a cumplir con gran éxito las ideas planteadas en esta investigación.

A la M.Sc. María del Pilar Rivas Pava, y al M.Sc. Silvio Carvajal de la Universidad del Cauca por su valiosa amistad, aportes y asesorías prestadas.

Al programa de Biología, por brindarme la mejor educación y darme la oportunidad de capacitarme en el campo de la investigación. A la secretaria administrativa del departamento de Biología María Elena Velasco por brindarme su amistad y colaboración.

A mis amigos y compañeros de estudio Alexis Orozco, Fernelly Rojas, Nestor Leyton, Diana Burbano, e Ingrith Yurany Zemanate por brindarme su amistad y acompañamiento durante los momentos más difíciles y por no dejarme desfallecer.

A mi abuela Aurelia Mauna, a mi madre Lidia Aidé Rosero Mauna, a mi hermano Luis Felipe Hurtado, y a mis tías Rocío Rosero y Esperanza Rosero por su apoyo y valiosos consejos que me ayudaron en el transcurso de la vida. A Dios por darme la vida y las oportunidades que me han ayudado a tomar las decisiones que me llevaron a cumplir este gran sueño.

DEDICATORIA

Este trabajo lo dedico a mi madre Aidé Rosero Mauna, a mi Abuelita Aurelia Mauna y a mi hermano Luis Felipe Hurtado por creer en mí, compartir los buenos y malos momentos de mi vida.

TABLA DE CONTENIDO

	RESUMEN	
1.	INTRODUCCIÓN	11
2.	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	13
3.	JUSTIFICACIÓN	15
4.	OBJETIVOS	17
5.	MARCO TEÓRICO	18
5.1	CARACTERÍSTICAS GENERALES DEL GÉNERO <i>BOTHROPS</i>	20
5.2	CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS DE LA SERPIENTE <i>Bothrops ayerbei</i> (Folleco 2010)	21
5.3	CARACTERÍSTICAS DE LOS VENENOS	22
5.4	ENVENENAMIENTO BOTHRÓPICO	23
5.5	MECANISMO DE ACCIÓN DEL VENENO BOTHRÓPICO	23
5.6	EXÁMENES PARACLÍNICOS	25
5.7	MANIFESTACIONES CLÍNICAS CAUSADAS POR ENVENENAMIENTO	25
5.8	COAGULACIÓN DE LA SANGRE	26
5.9	FUNDAMENTO DEL TIEMPO DE PROTROMBINA (TP)	27
5.9.1	FUNDAMENTO DEL TIEMPO PARCIAL DE TROMBOPLASTINA (TPT)	27

5.9.2	FUNDAMENTO DE ACTIVIDAD COAGULANTE (Instituto Clodomiro Picado 2007)	27
6.	ANTECEDENTES	29
7.	METODOLOGÍA Y DISEÑO EXPERIMENTAL	32
7.1	CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LA ESPECIE OBJETO DE ESTUDIO	32
7.2	OBTENCIÓN DEL VENENO	34
7.3	OBTENCIÓN DEL PLASMA SANGUÍNEO HUMANO	37
7.4	TIEMPO DE PROTROMBINA (TP)	38
7.5	TIEMPO PARCIAL DE TROMBOPLASTINA (TPT)	39
7.6	SOLUCIÓN DE VENENO	39
7.7	DOSIS DE VENENOS	39
7.8	DETERMINACIÓN DE DOSIS COAGULANTE MÍNIMA (DCM) SOBRE PLASMA HUMANO	40
7.9	IMPORTANCIA DE LA DETERMINACIÓN DE DOSIS COAGULANTE MÍNIMA (DCM)	40

7.9.1	ANÁLISIS ESTADÍSTICO.	40
8.	RESULTADOS	41
9.	DISCUSIÓN	45
10.	CONCLUSIONES	48
11.	RECOMENDACIONES	49
12.	BIBLIOGRAFÍA	50

RESUMEN

La serpiente *B. ayerbei* que se encuentra en el valle alto del río Patía posee características en su veneno que causan efectos locales y sistémicos. Aunque existe información sobre las características toxinológicas del veneno de esta serpiente uno de los efectos importantes es la alteración en la coagulación sanguínea producida por este veneno. En este trabajo se determinó la actividad coagulante mínima del veneno en plasma humano. Se utilizó un método para evaluar la actividad coagulante *in vitro* propuesto por el Instituto Clodomiro Picado y el resultado obtenido fue DCM-P 78.42 ± 1.6 $\mu\text{g/ml}$ que difiere con otras especies del mismo género.

1. INTRODUCCIÓN

El veneno de las serpientes ha sido objeto de múltiples estudios para determinar su composición bioquímica, actividades fisiológicas y propiedades farmacológicas. En América Latina las serpientes de la familia Viperidæ, subfamilia Crotalinæ, género *Bothrops* son las que ocasionan la mayoría de accidentes a humanos y animales domésticos. El veneno Bothrópico produce efectos locales y sistémicos muy notables tales como dolor, edema, hemorragia y trastornos de la coagulación sanguínea (Pineda 2002). En otros trabajos realizados con veneno de *Bothrops asper* se ha demostrado que posee sustancias que afectan el sistema hemostático activando o inhibiendo la coagulación (Marval 1993). En estas serpientes se han identificado algunas enzimas que actúan sobre el fibrinógeno en forma parecida a la trombina, lo cual hace necesario poner en claro que propiedades toxinológicas tienen.

El envenenamiento Bothrópico es ocasionado por los géneros *Bothrops*, *Bothrocophias*, *Bothriechis*, *Bothriopsis*, y *Porthidium* (Ayerbe 2008). En la actualidad este envenenamiento ocupa del 95% a 99% para Colombia (Pineda 2002).

El Departamento del Cauca tiene características bio-geográficas muy variadas como su rango altitudinal que va desde 0 a 5.750 msnm, lo que determina la presencia de todos los pisos térmicos, además cuenta con cinco cuencas que presentan todas las condiciones para contar con una fauna ofídica muy diversa (Ayerbe 2009).

La especie *Bothrops ayerbei* Folleco 2010 de la familia Viperidæ, antes conocida como *Bothrops cf. asper* sp. 1 se encuentra en el valle alto del río Patía (Ayerbe

2003, Ayerbe *et al.*, 2007), localizado entre el Occidente del Macizo Colombiano, la vertiente oriental de la Cordillera Occidental, la vertiente Norte la Cordillera Centro-Oriental y al Sur de la separación de aguas de los ríos Cauca y Patía entre los municipios de Popayán, El Tambo y Timbío (Folleco 2010).

Hasta el presente se han hecho algunos trabajos con el veneno de *B. ayerbei* (Yasnó 2005, Navia 2005, Mora 2010) y la información obtenida ya permite determinar la diferencia toxinológica entre ésta y otras especies del género *Bothrops*; sin embargo es indispensable investigar mucho más acerca de sus actividades tóxicas, especialmente su actividad coagulante en el plasma humano causada por proteinasas tipo Trombina (Acosta de Pérez *et al.*, 2004).

La actividad coagulante mínima proporcionada por este estudio nos dará una visión real de uno de los efectos producidos por el veneno de esta especie, lo cual permitirá comprender mejor su alcance en las mordeduras producidas a seres humanos pues así proporcionaríamos información muy valiosa para futuras investigaciones toxinológicas que afectan el sistema homeostático.

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Las serpientes han causado muchos casos de envenenamiento a seres humanos en el mundo, con un considerable número de fatalidades. La consecuencia directa es la toxicidad de sus venenos que inoculan cuando reaccionan en defensa propia al ser importunadas por el ser humano mientras se hallan en estado secretorio ó de reposo. Se estima que en nuestro planeta ocurren cerca de 5'400.000 mordeduras de serpientes al año, de los cuales mueren 125.345 personas. En Latinoamérica fallecen cerca de 5000 personas entre 150.000 accidentes ofídicos (Pineda 2002). En Colombia habitan aproximadamente 230 especies de ofidios y alrededor del 15% son venenosas siendo así las únicas que pueden representar un peligro para el hombre. Para Colombia se presentan alrededor de 3000 accidentes al año (Otero *et al.*, 2002), con una tasa de accidentalidad de 7.5/100.000 habitantes, pero se estima que ésta pueda ser mayor (Pineda 2002).

No solo hay que tener en cuenta el problema sanitario del ofidismo en nuestro planeta sino buscar explicaciones científicas que muestren que las serpientes desempeñan un papel muy importante en la economía de la naturaleza. Las serpientes resultan útiles porque destruyen gran cantidad de roedores cuya excesiva proliferación ocasiona un desequilibrio ecológico, que puede afectar a la salud humana.

Este trabajo busca determinar la actividad coagulante del veneno de *B. ayerbei*, pues será un aporte importante a la investigación toxinológica que en un futuro podría utilizar esta información con finalidades farmacéuticas aprovechando las enzimas que posiblemente se encuentren en este veneno, pues en algunas investigaciones con veneno de *Bothrops* como las realizadas en un canido que presentó intoxicación ofídica en Argentina muestran las proteínas semejantes a trombina que promueven el consumo de fibrinógeno, induciendo una coagulación

intravascular diseminada. Esto explica los coágulos en cavidad abdominal y otros órganos. Estas observaciones confirman la actividad coagulante presente en serpientes de especies del género *Bothrops* (Báez *et al.*, 2005). Dicha coagulación resulta de la acción de enzimas coagulantes y pro coagulantes, tales como serinoproteinasas 'tipo trombina' y metaloproteinasas que activan los factores X y II de la cascada de coagulación.

3. JUSTIFICACIÓN

La mayoría de investigaciones con ofidios hacen referencia a su distribución, a los diferentes tipos y grados de ofidismo, y a sus actividades tóxicas (Ayerbe 2003 y Gay *et al.*, 2004). Estos venenos pueden tener aplicaciones farmacéuticas en sus toxinas (Ayerbe *et al.*, 2003), pues es bien sabido que las especies del género *Bothrops* tienen proteínas que están siendo estudiadas para tratar algunas enfermedades.

Los venenos con las principales actividades tóxicas descritas para los vipéridos americanos pertenecen a serpientes del género *Bothrops*, como se muestra en algunas investigaciones en México que muestran actividad coagulante por mecanismos directos (sobre el fibrinógeno) y directos e indirectos (sobre plasma), siendo especialmente destacable la actividad del veneno de *B. asper*, que tiene capacidad coagulante sobre el plasma y sobre el fibrinógeno poniendo en evidencia la presencia de enzimas similares a la trombina (R. de Roodt *et al.*, 2005).

Con la elaboración de este trabajo se aporta al conocimiento científico las propiedades coagulantes del veneno de *B. ayerbei* Folleco 2010. Ya que las serpientes del género *Bothrops* presentan alteraciones en la coagulación sanguínea (Rodríguez 2004 y Barraviera 1999).

Son muchos los problemas que se presentan en la coagulación sanguínea, debido a trastornos en la cascada enzimática, por ende estandarizando esta prueba se puede determinar que hay deficiencia en alguno de los factores de la cascada de coagulación.

Para establecer si la clasificación de un envenenamiento Bothrópico es leve, moderada o grave se tiene en cuenta la alteración en las pruebas de coagulación que indican si el veneno Bothrópico ha alcanzado el torrente sanguíneo (Castrillón *et al.*, 2007). Esta investigación nos muestra cual es la concentración mínima de veneno que induce la coagulación en plasma humano, lo cual indica la diferencia en la alteración de la sangre específicamente sobre el fibrinógeno que puede causar la especie de interés (Equis Patiana) con otras especies.

4. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

- Determinar la actividad coagulante del veneno de *Bothrops ayerbei* Folleco 2010 en plasma humano.

OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Determinar la concentración mínima de veneno que permita la coagulación del plasma humano en 60 segundos (DCM-P).
- Estandarizar la prueba de manera que permita determinar la actividad coagulante del veneno de cualquier especie del género *Bothrops* en plasma humano.

5. MARCO TEÓRICO

Las serpientes pertenecen a la clase de los Reptiles, orden Squamata, suborden Ophidia ó Serpentes y se caracterizan por que carecen de extremidades aunque algunas tienen vestigios de ellas (Boidæ), el cuerpo está cubierto de escamas córneas en la parte dorsal y de placas en la ventral. Carecen de conducto auditivo externo, los ojos son casi inmóviles, sin párpados funcionales y están cubiertos por una escama transparente, tienen la pupila circular o elíptica, dependiendo si son de hábitos diurnos o nocturnos. Los ofidios se irradian en el Eoceno del periodo Terciario hace 50 millones de años (Futuyma 1998) y en la actualidad hay descritas cerca de 3000 especies con un total de 18 familias agrupadas en dos superfamilias (Pineda 2002).

Las glándulas salivales se han especializado como glándulas venenosas. El sentido del olfato es bastante desarrollado y está integrado por la lengua bífida que entra en contacto con el órgano de Jacobson en el paladar; sin embargo el oído es poco desarrollado.

Algunas especies poseen un sensor térmico en forma de orificios ó fosetas, localizadas entre las fosas nasales y los ojos, es característico de las víboras pertenecientes a la subfamilia Crotalinæ, y les permite detectar a sus presas en la oscuridad.

La apertura bucal puede llegar a un tamaño casi 10 veces lo normal, debido a que los huesos de la mandíbula y la maxilla están unidos por ligamentos elásticos, además la mandíbula inferior se une al cráneo por un hueso largo y móvil denominado hueso cuadrado, lo que permite que ésta y el cráneo se separen. Las serpientes tragan a su presa entera, sin cortarla ni masticarla: la tragan

comenzando casi siempre por la cabeza y la hacen progresar lentamente por su tubo digestivo.

En Colombia la subfamilia Crotalinæ esta representada por los géneros: *Bothriechis*, *Bothriopsis*, *Bothrocophias*, *Bothrops*, *Crotalus*, *Lachesis*, y *Porthidium* (Ayerbe 2003).

Tabla 1. Clasificación del género *Bothrops*

<ul style="list-style-type: none">• Clase: Reptilia• Orden: Squamata• Suborden: Ophidia ó Serpentes
<p>Superfamilia</p> <ul style="list-style-type: none">• Colubroidea
<p>Familia:</p> <ul style="list-style-type: none">○ Viperidæ
<p>Subfamilia</p> <ul style="list-style-type: none">▪ Crotalinæ
<p>Géneros</p> <ul style="list-style-type: none">▪ <i>Bothrops</i>▪ <i>Crotalus</i>▪ <i>Lachesis</i>▪ <i>Bothrocophias</i>▪ <i>Bothriopsis</i>▪ <i>Bothriechis</i>▪ <i>Porthidium</i>

5.1. CARACTERÍSTICAS GENERALES DEL GÉNERO *Bothrops*

El envenenamiento producido por las serpientes del género *Bothrops*, causa dolor intenso en la zona afectada, hemorragia, formación de edema, descenso de la presión arterial, aparición del síndrome de coagulación intravascular diseminada, hemólisis y posterior necrosis (Isla 2003).

El género *Bothrops* se encuentra ampliamente distribuido en todo el país y es el importante debido a los constantes accidentes (Patiño 2002) que se presentan sobre todo en comunidades rurales que es superior al 80% (Ayerbe 2003).



Figura 1. Características Morfológicas

Fuente: Cortesía Serpentario CIBUC

Foto: Danni Santana

Especie: *Bothrops ayerbei* Folleco 2010

Las serpientes del género *Bothrops* son solenoglifas, esto significa que presentan un par de colmillos largos, caducos con orificio central a manera de aguja

hipodérmica en cada lado de la maxilla. Esta es corta, gruesa y se une con la mandíbula posteriormente.

5.2. CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS DE LA SERPIENTE *Bothrops ayerbe* (Folleco 2010)

Los adultos presentan una longitud que varía entre 110 cm para los machos y 130 cm para las hembras respectivamente, pero hay individuos que llegan a medir 210 cm. La cabeza es más larga que ancha en forma de punta de flecha y se diferencia del cuello (figura 2 y figura 3); la parte supra cefálica posee una marca particular consistente en un diseño de dos líneas que empieza un poco antes de la base del cuello y se extiende a lo largo de la cabeza formando en ocasiones una especie de triángulo (Figura 1). El ojo es mediano y tiene una pupila vertical. El cuerpo tiene una forma ligeramente triangular.



Figura 2. Vista superior *B. ayerbe* (Folleco 2010) Fase amarilla.

Fuente: Cortesía Serpentario CIBUC

Foto: Santiago Ayerbe



Figura 3. Vista superior *B. ayerbe* (Folleco 2010). Fase gris

Fuente: Cortesía Serpentario CIBUC

Foto: Santiago Ayerbe

5.3. CARACTERÍSTICAS DE LOS VENENOS

Los venenos de las serpientes son una mezcla de diferentes compuestos sólidos (16 a 52%) especializados que varían su composición de acuerdo con la especie; de los cuales 70 a 90% son proteínas y polipéptidos y 10 a 30%, compuestos y elementos de bajo peso molecular. Entre los compuestos proteicos con actividad enzimática encontramos las Fofolipasas A_2 que se encuentran en todos los venenos de las serpientes, también se hallan fosfodiesterasas, fosfatasas, acetilcolinesterasa, hialuronidasa, enzimas proteolíticas, y una enzima con actividad similar a la trombina, es decir, de tipo coagulante. Otros componentes proteicos son las neurotoxinas, las cardiotoxinas y las citotoxinas (Pineda 2002).

Los iones no proteicos se clasifican en orgánicos e inorgánicos. Dentro de los inorgánicos encontramos Na^+ , K^+ , Zn^{++} , Ca^{++} , Mg^{++} , Co^{++} , sulfatos, cloratos, y fosfatos. Entre los compuestos orgánicos, se encuentran aminoácidos como la histidina, el ácido aspártico, la glicina, el ácido glutámico, la cerina y la alanina,

entre otros. También se encuentran carbohidratos, lípidos y aminos. Las aminos son las causantes del dolor intenso, edema y la caída de la tensión arterial (Pineda 2002).

En serpientes del género *Bothrops* se encuentran proteasas como la que se aisló del veneno de *Bothrops alternatus* con actividad similar a la trombina, denominada Balterobin, con un peso molecular de 30.000, con actividad coagulante sobre fibrinógeno bovino (Smolka *et al.*, 1998).

5.4. ENVENENAMIENTO BOTHRÓPICO

Es ocasionado por los géneros *Bothrops*, *Bothrocophias*, *Bothriechis*, *Bothriopsis*, y *Porthidium*. El género *Bothrops* ocasiona cerca del 90% de las mordeduras en Colombia seguido por *Bothriechis schlegelii* con un 2% (Ayerbe 2008). La toxicidad de los géneros *Bothriechis* y *Bothriopsis* es moderada, mientras que la toxicidad de los géneros *Bothrops*, *Bothrocophias* y *Porthidium* es severa.

Sus manifestaciones son: Locales: dolor inmediato muy severo y persistente; en el curso de pocas horas edema progresivo, equimosis, y hemorragias en el sitio de la mordedura. Sistémicas: náuseas, vómito, diarrea, sudoración, sangrado por diferentes órganos (Patiño 2002).

5.5. MECANISMO DE ACCIÓN DEL VENENO BOTHRÓPICO

Los mecanismos del veneno de las serpientes tienen básicamente tres efectos que pueden variar según la especie, el estado de desarrollo (juvenil, adulto), y su procedencia, ya que se han encontrado diferencias en las composiciones del veneno de una misma especie, con diferente edad o de diferente región. Los tres mecanismos de acción que ocasionan estos venenos son: acción necrosante, acción coagulante y acción hemorrágica (Pineda 2002).



Figura 4. Acción necrosante

Fuente: Cortesía HUSJ

Foto: Santiago Ayerbe, MD



Figura 5. Acción coagulante

Fuente: Cortesía HUSJ

Foto: Santiago Ayerbe, MD



Figura 6. Acción hemorrágica

Fuente: Cortesía HUSJ

Foto: Santiago Ayerbe, MD

5.6. EXÁMENES PARACLÍNICOS

Estas pruebas paraclínicas permiten establecer el grado de actividad del veneno sobre los órganos blanco y los diferentes substratos. Las pruebas paraclínicas mas importantes en el Ofidismo Bothrópico son: pruebas de coagulación, dosificación del fibrinógeno, determinación de los niveles séricos de productos de degradación del fibrinógeno, tiempo parcial de tromboplastina y tiempo de protrombina, recuento de plaquetas, cuadro hemático, parcial de orina, niveles de nitrógeno ureico sanguíneo y de creatinina sérica (Pineda 2002).

5.7. MANIFESTACIONES CLÍNICAS CAUSADAS POR EL ENVENAMIENTO

Los efectos presentados en el envenenamiento por mordedura de serpientes del

género *Bothrops* pueden ser de tipo local y sistémico. Dependiendo de la vía de inoculación puede haber variaciones, por ejemplo, una inoculación endovenosa producirá más cambios sistémicos que una inoculación subcutánea ó intramuscular y una inoculación intra-arterial genera la aparición de un cuadro de obstrucción por trombos en los capilares arterio-venosos.

5.8. COAGULACIÓN DE LA SANGRE

La coagulación es el proceso determinado por la hemostasia de la sangre que a su vez depende de por lo menos cuatro sistemas: el vascular, las plaquetas, los factores plasmáticos de coagulación y el sistema fibrinolítico.

Se denomina coagulación al proceso por el cual la sangre pierde su liquidez, tornándose similar a un gel en primera instancia y luego sólida, sin experimentar un verdadero cambio de estado. Este proceso es debido en última instancia a que una proteína soluble que normalmente se encuentra en la sangre, el fibrinógeno, experimenta un cambio químico que la convierte en insoluble y con la capacidad de entrelazarse con otras moléculas iguales, para formar enormes agregados macromoleculares en forma de una red tridimensional.

El fibrinógeno, una vez transformado, recibe el nombre de fibrina. Coagulación es por lo tanto, el proceso enzimático por el cual el fibrinógeno soluble se convierte en fibrina insoluble (Gamboa 1992).

Un coágulo es, por lo tanto, una red tridimensional de fibrina que eventualmente ha atrapado entre sus fibras a otras proteínas, agua, sales y hasta células sanguíneas. Aunque las plaquetas son las que forman el trombo blanco al principio, es el polímero de fibrina que se forma a partir de los factores de coagulación el que da la sustancia y la resistencia al coágulo (Gamboa 1992).

Anteriormente este conjunto de reacciones y activaciones de proteínas se ha interpretado como una cascada en donde se distinguían dos vías: en vía extrínseca e intrínseca. Actualmente se considera que ambas vías no son independientes en absoluto, ya que la vía extrínseca activa también al factor X a través del factor XI, considerándola como el inicio fisiológico de la coagulación.

5.9. FUNDAMENTO DEL TIEMPO DE PROTROMBINA (TP)

Cuando se añade calcio y un extracto hístico al plasma, el factor VII reacciona con el factor hístico y se forma un producto que convierte el factor X a su forma activa el factor Xa; éste a su vez reacciona con el factor V, con el calcio y con los fosfolípidos para formar la protrombinasa extrínseca que convierte la protrombina en trombina. Entonces la trombina convierte el fibrinógeno en fibrina. La velocidad de formación de la fibrina depende de los factores V, VII, X, II y I por lo cual, esta prueba es empleada para medir la actividad total de estos factores (Gamboa 1992).

5.9.1 FUNDAMENTO DEL TIEMPO PARCIAL DE TROMBOPLASTINA (TPT)

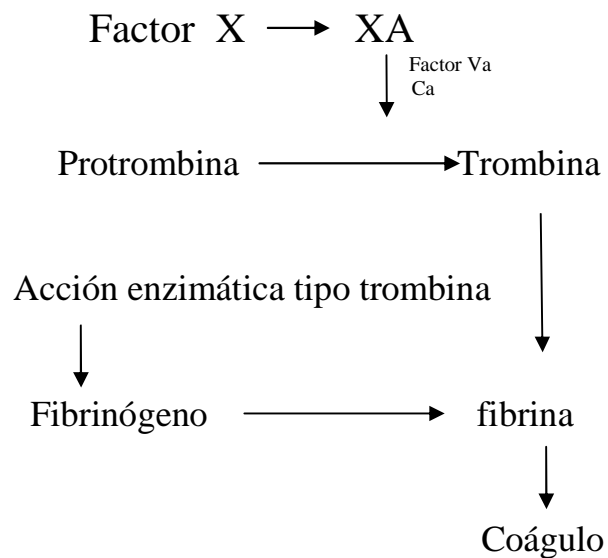
Cuando se añade calcio y cantidad suficiente de fosfolípidos plaquetarios al plasma, se activan todos los factores de la coagulación necesarios para la formación de protrombinasa intrínseca, ésta activa la protrombina y la trombina así formada convierte el fibrinógeno en fibrina (Gamboa 1992).

5.9.2 DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD COAGULANTE DEL VENENENO

La actividad coagulante de los venenos se puede determinar sobre plasma o sobre una solución de fibrinógeno. Esta actividad se estudia en el laboratorio agregando diversas cantidades de veneno a alícuotas de plasma humano citratado o de una solución de fibrinógeno. Muchos venenos de serpientes contienen enzimas que actúan directamente sobre el fibrinógeno (serino

proteinasas 'tipo trombina'), o sobre el factor X (metaloproteinasas) o sobre la protrombina (serina proteinasas o metaloproteinasas) (figura 7). El resultado de la acción de estas enzimas es la coagulación del plasma o, en el caso de las enzimas 'tipo trombina', la coagulación tanto del plasma como de las soluciones de fibrinógeno. La actividad se determina midiendo los tiempos de coagulación del plasma o del fibrinógeno luego de agregar diversas concentraciones de veneno. La Dosis Coagulante Mínima sobre plasma (DCM-P) o sobre fibrinógeno (DCM-F) corresponde a la concentración de veneno que induce la coagulación en 60 segundos. (Gutiérrez J.M 2007)

Figura 7. Acción del veneno sobre la cascada de coagulación



6. ANTECEDENTES

Los estudios hechos en serpientes del género *Bothrops* han sido encaminados principalmente a sus actividades tóxicas especialmente por los efectos sistémicos que pueden producir alteraciones en la sangre como hemorragias y coagulación, debido a los componentes presentes en sus venenos (Maruñak *et al.*, 2006).

Estos venenos contienen proteínas y polipéptidos cuya actividad farmacológica puede ser útil para contrarrestar el efecto deletéreo de algunas enfermedades de los seres humanos.

Son diversos los trabajos relacionados con los accidentes ocasionados por serpientes del género *Bothrops*, donde se exponen las manifestaciones clínicas relacionadas con la actividad tóxica del veneno, hecho de gran importancia sanitaria y socio-económica, pues las mordeduras en su mayoría afectan a campesinos durante el desempeño de sus labores agrícolas (Ayerbe, 1979, 2000; 2001, 2003 y 2008; R. de Roodt 2004).

Del veneno de *B. alternatus* de Brasil se aisló una proteasa con actividad similar a la de la Trombina, denominada Balterobin, con actividad coagulante sobre fibrinógeno bovino (Smolka *et al.*, 1998). Lo convierten en un gel de fibrina, sin entrecruzamiento, y rápidamente es seguida de procesos fibrinolíticos. La sucesión de fenómenos inducen a la desfibrinación induciendo la hemorragia. Pero en *B. ayerbei* todavía no hay estudios con su actividad coagulante.

De *Bothrops alternatus* del nordeste argentino se aisló una enzima de su veneno que corresponde a una metaloproteasa ácida perteneciente probablemente al grupo P-III (55 kDa) de las svMPs (snake venoms metalloproteinases), compatible con alternagina, aislada por Souza y col (2000) del veneno de *B. alternatus* de Brasil. Las actividades exhibidas por esta enzima ponen en evidencia la elevada

toxicidad que la misma posee ya que presenta capacidad de afectar la pared de vasos sanguíneos, factores de la coagulación, desencadenando un proceso inflamatorio e hipoxia tisular que conllevan a otros daños tisulares (Gay *et al.*, 2004).

Alvarado Islas A. *et al.*, 2004, Obtuvieron de una fracción crotálica con actividad hemoaglutinante y evaluación *in vivo* e *in vitro* del probable daño a tejidos. Algunos de los venenos crotálicos tienen una fracción aglutinante con afinidad por receptores celulares, que podría ser utilizada como agente antiviral para bloquear los sitios de entrada. La finalidad fue aislar estas fracciones que podrían tener uso farmacéutico.

Los venenos de la especie *B. asper* de Costa Rica han sido estudiados detalladamente en cuanto a composición, toxicidad, y neutralización por antivenenos especialmente las actividades: hemorrágica, dosis letal, miotóxica, edematizante, coagulante, desfibrinante y fosfolipasa A₂ (Saravia *et al.*, 2001).

En los venenos que han sido estudiados en latino América se ha encontrado que tienen propiedades químicas y mecanismos de acción en sus toxinas que actúan directamente en el ser humano (Gutiérrez 2002).

Algunas serpientes como *B. cotiara* de la Provincia de Misiones de Argentina, Paraguay y Sur de Argentina se encuentran en peligro de extinción por la reducción de sus poblaciones, siendo difícil encontrar ejemplares de esta especie. Sin embargo se hizo una caracterización completa de esta especie con ejemplares alojados en el Serpentario del Centro Zootoxicológico de Misiones de Argentina (Adolfo R. de Roodt *et al.*, 2006).

El veneno utilizado en este trabajo tiene diferencias mínimas en la concentración del veneno puro y la DL₅₀, siendo el de la especie *B. ayerbei* el que presenta la mayor concentración de veneno, seguida por las especie *B. asper* (Navia 2006).

En la Universidad de Nariño se trabajo con veneno de *B. ayerbei*. Mora 2010 hizo la comparación de la variación proteica del veneno en cinco poblaciones, cuatro de la especie *Bothrops asper*, dos de ellas al suroccidente de Colombia, una de la costa pacifica del departamento de Nariño y otra del departamento del Cauca, las otras dos poblaciones una de Costa Pacifica y la otra del Caribe de Costa Rica y la quinta población la especie *B. ayerbei*.

Camayo 2010 de la Universidad del Cauca realizó 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.

7. METODOLOGÍA Y DISEÑO EXPERIMENTAL

7.1. CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LA ESPECIE OBJETO DE ESTUDIO

La especie *B. ayerbei* Folleco 2010 de la familia Viperidæ se encuentra en el valle alto del río Patía (figura 8), localizado entre el Occidente del Macizo Colombiano, la vertiente oriental de la Cordillera Occidental, la vertiente Norte de la Cordillera Centro-Oriental y al Sur del divorcio de aguas de los ríos Cauca y Patía entre los municipios de Popayán, El Tambo y Timbío. Hacia el Sur en Nariño se localiza en los municipios de La Cruz, Colón, Génova, San Pablo, La Unión, Taminango, Policarpa, (Ayerbe 2003).

Se hizo la determinación coagulante mínima utilizando un pool de veneno de cuatro especímenes adultos de *B. ayerbei* procedentes de la vereda Pomorroso, corregimiento de San Joaquín, municipio de El Tambo (Cauca), el cual fue donado por el Centro de Investigaciones Biomédicas de la Universidad del Cauca (CIBUC).

Los animales presentes en el CIBUC son animales sanos, certificados por el Médico Veterinario y Zootecnista Diego Vergara Collazos, adscrito a este centro. Estos especímenes vienen siendo utilizados en diversas investigaciones Toxinológicas y fisiológicas entre otras.

Figura 8. Cuencas de Importancia Herpetológica en el Departamento del Cauca.



Fuente: cortesía del Grupo de Estudios Ambientales [GEA] de la Universidad del Cauca

Escala 1:1'500.000

7.2. OBTENCIÓN DEL VENENO

El veneno de cada ejemplar fue obtenido por extracción manual (ordeño) utilizando un gancho sencillo y un gancho de presión diseñados para la manipulación e inmovilización de serpientes. Para la recolección del veneno se empleó un embudo recubierto con papel parafilm y sujetado a tubos Eppendorf, en condiciones estériles.

Una vez inmovilizada la serpiente se empleo el método europeo de sujeción en el cual se emplean 3 soportes, el dedo anular en un extremo, el índice sobre la cabeza y el dedo pulgar sujetando el otro extremo de la cabeza de la serpiente, estas posiciones de agarre imposibilitan al reptil de girar y morder, se acercó el embudo a la serpiente para que ésta mordiera el látex de manera natural y una vez ubicados los colmillos de la serpiente dentro del embudo se procedió a realizar masajes sobre su maxilar superior procurando presionar las glándulas de veneno (figura 9).

El veneno recolectado en tubos Eppendorf (figura 10) se almacenó congelado a una temperatura de -20°C para su posterior liofilización.



Figura 9. Sujeción y Extracción de Veneno

Fuente: Cortesía Serpentario CIBUC

Foto: Danni Santana



Figura 10. Veneno recolectado en tubo eppendorf

Fuente: Cortesía Serpentario CIBUC

Foto: Danni Santana

7.3. OBTENCIÓN DEL PLASMA SANGUÍNEO HUMANO

Se obtuvo 5 ml de sangre humana de cuatro personas con edades comprendidas entre 19 y 26 años, sanos y sin problemas de coagulación (figura 11). La muestra se mezcló con citrato de sodio 0.109 M, 3.2% como anticoagulante (estandarizado por Gamboa, 1992 y Maruñak *et al.*, 2006), y se centrifugó a 5000 rpm durante diez minutos para la obtención del plasma. Luego se mezcló el plasma de los donantes para conseguir el pool (figura 12).

El plasma obtenido se mantuvo congelado a -20 °C durante un corto periodo con el fin de preservarlo mientras se realizaban pruebas pertinentes de coagulación (TPT Y TP).



Figura 11. Sangre obtenida

Foto: Danni Santana

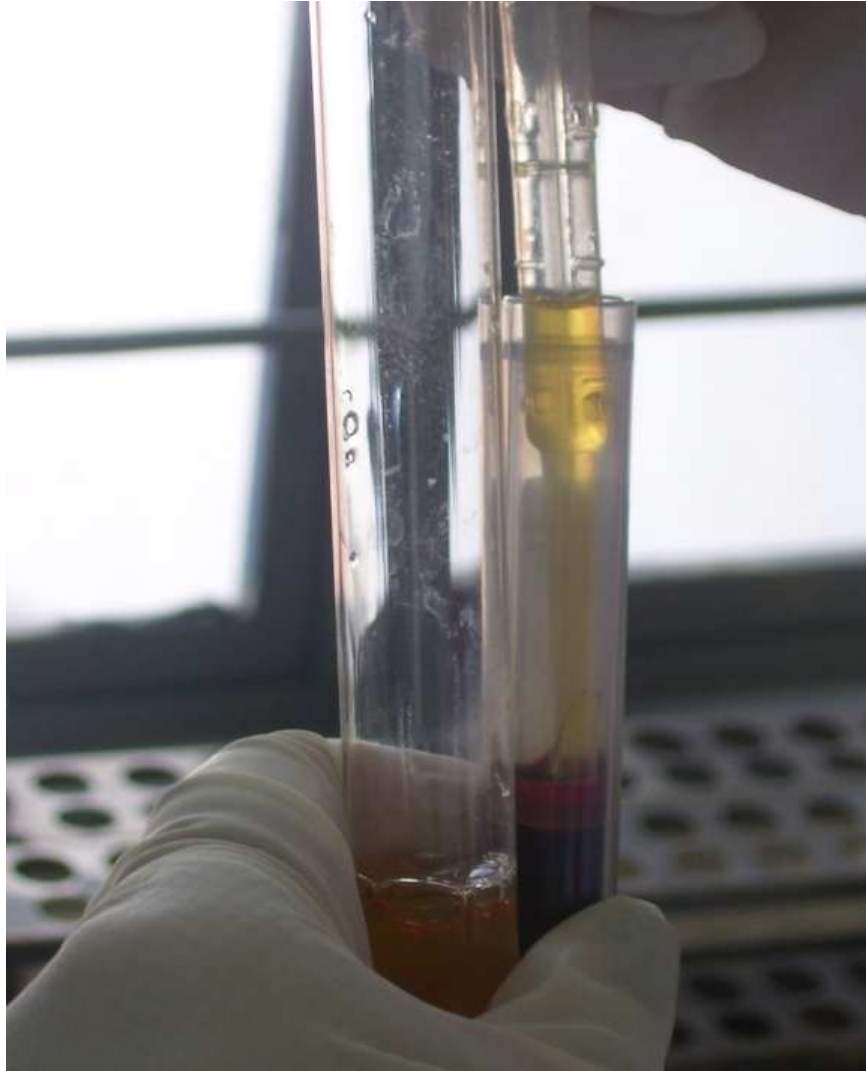


Figura 12. Plasma Recolectado

Foto: Danni Santana

7.4. TIEMPO DE PROTROMBINA (TP)

El plasma almacenado a una temperatura de $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ se precalentó a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. Se siguieron las instrucciones indicadas por el fabricante del reactivo de tromboplastina a fin de la reconstitución y preservación del mismo.

El reactivo se precalentó a 37 °C en cantidades de 0,2 ml por cada prueba. El tiempo de protrombina se determinó colocando 0,1 ml de plasma en cada tubo y posteriormente se adicionó 0,2 ml de reactivo. Con un cronometro se midió el tiempo de aparición del coaguló (Gamboa 1992).

7.5. TIEMPO PARCIAL DE TROMBOPLASTINA (TPT)

El plasma almacenado y el cloruro de calcio 0.25 M se precalentaron a 37 °C. En cada tubo agregamos 0,1 ml de reactivo y posteriormente se añadió 0,1 ml de plasma, luego incubamos y adicionamos 0,1 ml de cloruro de calcio 0.25 M. con el cronometro se midió el tiempo de coagulación tan pronto se adicionó el cloruro de calcio 0.25 M (Gamboa 1992).

7.6. SOLUCIÓN DE VENENO

Partiendo de la dosis letal cincuenta (DL_{50}) 5.96 $\mu\text{g/g}$, para *B. ayerbeii*, obtenida por Navia (2006), se hizo una extrapolación al plasma humano y se preparó una solución madre de veneno Bothrópico 146.6 $\mu\text{g/ml}$ en solución salina amortiguada con fosfatos (PBS).

7.7. DOSIS DE VENENOS

Inicialmente se prepararon cuatro concentraciones sub-letales de la DL_{50} de *B. ayerbeii* : se hicieron las siguientes diluciones de veneno en PBS (60%,50%, 25%, y 12.5%).

Luego se aumento un poco la concentración para obtener las dosis de veneno que induce coagulación del plasma en 60 segundos.

7.8. DETERMINACIÓN DE DOSIS COAGULANTE MÍNIMA (DCM) SOBRE PLASMA HUMANO

Se utilizó el método propuesto por el instituto Clodomiro picado (2007). La actividad coagulante se determinó agregando un volumen de 0,1 mL de cada una de las diluciones seriadas de veneno a las alícuotas de plasma humano citratado (0,2 mL), mezclando suavemente por inversión y midiendo el tiempo de aparición de un coágulo sólido, empleando para esto un cronómetro. La concentración coagulante mínima (DCM) es definida como la concentración final de veneno ($\mu\text{g/ml}$) que induce a coagulación del plasma en 60 segundos (Maruñak *et al.*, 2006).

7.9. IMPORTANCIA DE LA DETERMINACIÓN DE DOSIS COAGULANTE MÍNIMA (DCM)

Su importancia radica en que esta prueba confirma la presencia de serinoproteinasas y metaloproteinasas en el veneno de las serpientes. Adicionalmente si conocemos su (DCM) podríamos inferir cual es la cantidad y que suero antiofídico podrían utilizar los médicos en el tratamiento de un accidente ofídico.

7.9.1 ANALISIS ESTADÍSTICO.

SPSS versión 11.5 es un producto modular perfectamente integrado indicado para todas las etapas del proceso analítico: planificación, recogida de datos, acceso y tratamiento de los mismos y presentación de los resultados.

Se utilizó el programa estadístico no paramétrico y los datos se incorporaron al análisis utilizando la regresión lineal.

Los datos incorporados, fueron la concentración de proteína y tiempo de acción del veneno con un nivel de significancia de 0,005.

8. RESULTADOS

Se preparó una solución madre de veneno Bothrópico 146.6 µg/ml en solución salina amortiguada con fosfatos (PBS), y se hicieron las siguientes diluciones:

Tabla 2. Diluciones de la solución madre de veneno

Solución madre µg/ml	Primera dilución	Segunda dilución	Tercera dilución	Cuarta dilución
146.6	60%	50%	25%	12.5%

Tabla 3. Concentraciones de veneno vs. Tiempo de coagulación

Concentraciones de veneno (µg/ml)	Tiempo de coagulación en segundos(s).
87.96	55
87.96	57
87.96	58
87.96	55
87.96	60
87.96	57
87.96	56
73.3	65
73.3	72
73.3	67
73.3	66
73.3	74
73.3	70
73.3	68
73.3	58
73.3	64
73.3	68
36.65	109
36.65	106
36.65	108
36.65	106
36.65	102
18.33	183
18.33	184

Tabla 4. Control positivo

Cantidad de trombina en ml	Cantidad de plasma en ml	Tiempo de coagulación en segundos(s).
0,1	0,2	7
0,1	0,2	6
0,1	0,2	6

Tabla 5. El control negativo

PBS en ml	Cantidad de plasma en ml	Tiempo de coagulación en segundos(s).
0,1	0,2	No coaguló
0,1	0,2	No coaguló
0,1	0,2	No coaguló

TIEMPO DE PROTROMBINA (PT)

El control normal de PT debe dar un tiempo entre 10.5 y 13.5 segundos. El tiempo de coagulación PT en la prueba dio 11 segundos sobre 11 lo que indica que el plasma se encontró en perfectas condiciones.

TIEMPO PARCIAL DE TROMBOPLASTINA (TPT)

La coagulación se presentó en un tiempo de 34 segundos sobre 34 segundos lo que nos confirmó las perfectas condiciones en la que se encontraba el plasma.

ANALISIS ESTADÍSTICO

Correlación de Pearsonm

Se identificó asociación negativa estadísticamente significativa ($R=-0.923$ y $P<0.001$) entre la concentración de proteínas (%) y el tiempo (s) de coagulación del veneno.

Mediante estimación curvilínea se detectó que se acomodaba a una relación lineal.

Tabla 6. Valores de la correlación de Pearson

	Concentración (%)	Tiempo (segundos)
Concentración (%) Correlación de Pearson Sig. (bilateral) N	1 24	-,923 ,000 24
Tiempo (segundos) Correlación de Pearson Sig. (bilateral) N	-,923 ,000 24	1 24

** .La correlación es significativa al nivel de 0,000 (bilateral).

La concentración de proteína que causa coagulación del plasma en 60 segundos, se estimó por regresión lineal.

El valor de la significancia indica la actividad pro coagulante del veneno y de la influencia de la concentración del mismo en la disminución del tiempo.

REGRESION LINEAL

Para determinar la Dosis Coagulante Mínima-Plasma (DCM-P) se aplicó un análisis de regresión lineal, donde se comparó la dosis-respuesta (μg de veneno en el eje de las abscisas (y) vs. tiempo de coagulación en el eje de las ordenadas (x)). La prueba fue muy significativa (F: 127,440; gl: 1; p: <0,01), donde se determinó que el tiempo está influenciado en un 85,3% por la concentración. La fórmula para determinar la DCM-P fue: $\text{CON } \mu\text{g/ml} = 114.42 - 0.60 \times \text{TIEMPO (Segundos)}$. La DCM-P obtenida fue de $78.42 \pm 1.6 \mu\text{g/ml}$.

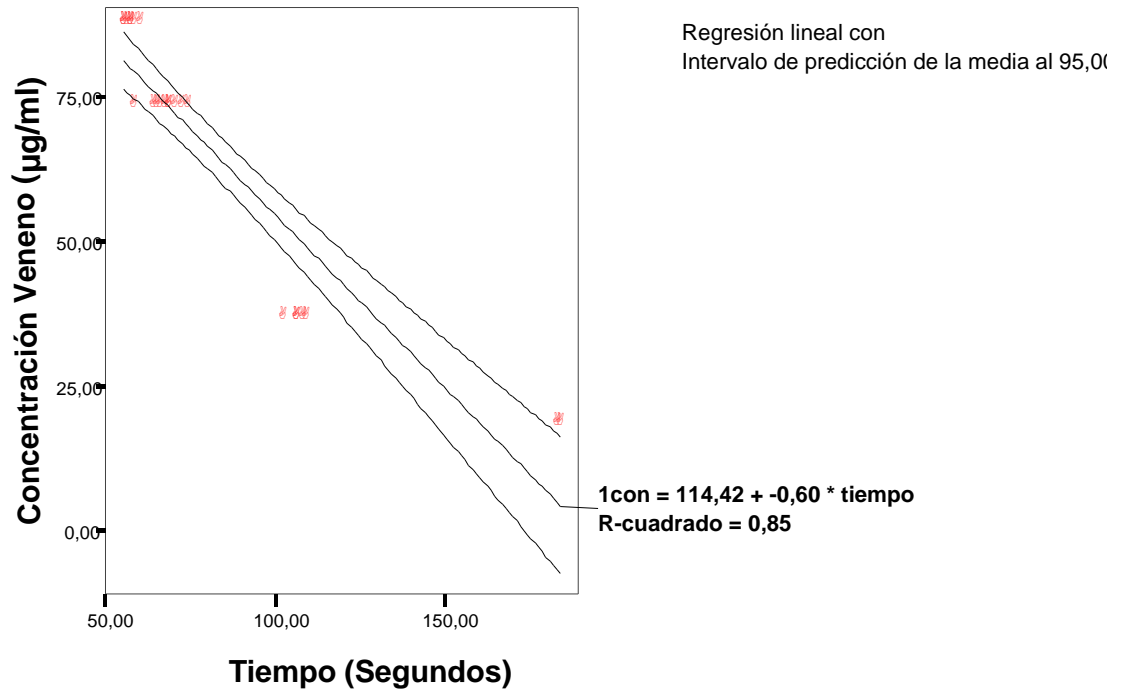


Figura 13. Curvas dosis – respuesta. Determinación de la Dosis Coagulante Mínima (DCM).

9. DISCUSIÓN

El veneno total de la serpiente *B. ayerbeí* que habita en el valle alto del río Patía posee actividades tóxicas que afectan la coagulación de la sangre, lo cual queda demostrado con la coagulación del plasma que implica el consumo de fibrinógeno. De acuerdo con resultados obtenidos para la especie *B. ayerbeí* en las investigaciones de Mora (2010) muestran que su veneno se caracteriza por presentar principalmente metaloproteinasas y serinoproteinasas y en menor proporción fosfolipasas, lo que ocasiona efecto procoagulante de los venenos, y como resultado se desarrolla defibrinogénación y defibrinación, caída de los niveles de fibrinógeno e incremento de los productos de degradación de fibrinógeno.

La metodología empleada permitió confrontar los resultados obtenidos de la actividad coagulante mínima (DCM-P) de este estudio con los reportados para la misma especie por Mora (2010) que contrastan fuertemente. La DCM-P obtenida fue de 78.42 ± 1.6 µg/ml que fue menor a los datos reportados por Mora (2010) 96.2 ± 1.1 µg/ml. La diferencia puede radicar en la posible desnaturalización del veneno o seguramente el método utilizado difiere en el cálculo de la DL 50, puesto que en la investigación de Navia (2005) se tuvo en cuenta solo un individuo mientras que en la investigación de Mora (2010) se utilizó un pool con ejemplares adultos.

Recordemos que la DCM-P y la Dosis Letal 50 pueden variar dependiendo de muchos factores, como el tipo de dieta, la edad y la metodología empleada (solano *et al.*, In prep), lo cual puede causar una gran incertidumbre en los modelos aplicados a las investigaciones con animales vivos.

Tabla 7. Actividad Coagulante Mínima y Dosis letales para *Bothrops ayerbei* y especies relacionadas filogenéticamente.

Especie	Procedencia	Autor	Actividad Coagulante Mínima	Dosis Letal 50
<i>B. ayerbei</i>	Valle del Patía, Cauca	Navia (2005)	-	5.96 µg/g
<i>B. ayerbei</i>	Valle del Patía, Cauca	Mora (2010)	96.2 ± 1.1 µg/ml	2.94 µg/g
<i>B. ayerbei</i>	Valle del Patía, Cauca	Este estudio	78.42 ± 1.6 µg/ml	-
<i>B. jararacussu</i>	Argentina	Maruñak <i>et al.</i> (2006)	18.5 ± 1.5 µg/ml	2.176 µg/g

La lectura de la Actividad Coagulante Mínima y Dosis Letal 50 es inversamente proporcional a su valor (cuanto menor es el valor más alta es la actividad biológica)

Es bien sabido que en Colombia se encuentran varias poblaciones de *B. asper* (Navia 2005, Mora 2010 y Yasnó 2005) lo que indica sus diferencias toxinológicas pero es importante realizar estudios que brinden la posibilidad de aportar a la ciencia y a nuestro país metodologías que podamos utilizar en especies del mismo género con la finalidad de mostrar diferencias o semejanzas significativas. Esta investigación nos muestra una visión completa de la metodología empleada puesto que se trabajó con un pool de plasma humano con el fin de que no hubiera falla en los factores de coagulación y también se trabajó con un pool de veneno puesto que una sola serpiente puede variar dependiendo de muchas circunstancias (solano *et al.*, In prep), mientras que otros estudios como el realizado por Navia (2005) a pesar de que las pruebas son diferentes el veneno utilizado fue extraído de una sola serpiente y esto puede afectar la investigación mostrando disminución en la letalidad de sus venenos.

Podemos comparar los valores obtenidos con los de otro autor que trabajó con el veneno de serpiente *Bothrops jararacussu* de Argentina (Maruñak *et al.*, 2006) que fue muy particular puesto que se utilizó plasma de carnero en su investigación sin embargo el procedimiento utilizado es muy parecido al empleado en este estudio.

La DCM-P que obtuvimos fue mayor en comparación de la DCM-P de *B. jararacussu* $18.5 \pm 1.5 \mu\text{g/ml}$ (Maruñak *et al.*, 2006), por lo tanto es posible que los efectos de *B. ayerbei* sean menos severos sobre la coagulación de la sangre que los causados por *B. jararacussu*; sin embargo cabe destacar que la serpiente de nuestro interés según los datos obtenidos en el Centro de Investigaciones Biomédicas de la Universidad del Cauca (CIBUC) se encuentra en gran cantidad en comparación con la serpiente del vecino país, por lo cual es posible en un futuro cercano analizar completamente su veneno y buscar sus posibles usos terapéuticos con una buena cantidad de veneno extraída de estos especímenes.

La relación que existe entre Dosis Letal 50 y actividad coagulante es muy alta ya que son directamente proporcionales según los estudios realizados con *B. jararacussu* de Argentina al compararlos con *B. ayerbei* la DL50 obtenida para el veneno de *B. jararacussu* de Argentina fue de $2.176 \mu\text{g/g}$ de peso corporal, equivalente a la cantidad de veneno que causó la muerte del 50% de los animales en 48 horas (Maruñak *et al.*, 2006), mientras que la DL50 obtenida para el veneno de *B. ayerbei* fue de $5.96 \mu\text{g/g}$ de peso corporal (Navia 2006), lo que nos muestra que la serpiente de interés es menos letal y con menor efecto coagulante que la serpiente *B. jararacussu*.

10. CONCLUSIONES

La determinación de Actividad Coagulante Mínima del veneno de *Bothrops ayerbeii* (Folleco 2010) en plasma humano aseguró resultados satisfactorios para futuras investigaciones con nuestra especie de interés.

El veneno de *B. ayerbeii* posee actividades toxinológicas que actúan directamente en el sistema hemostático específicamente en la coagulación sanguínea, lo cual nos indica que esta especie posee enzimas similares a la trombina que activan la cascada de la coagulación.

El valor encontrado para la DCM-P fue de $78.42 \pm 1.6 \mu\text{g/ml}$ el cual es un dato interesante que indica una de las primeras investigaciones toxinológicas para la especie de nuestro interés.

La estandarización de la metodología empleada es importante puesto que la podemos aplicar a cualquier especie del mismo género para encontrar su Actividad Coagulante Mínima.

11. RECOMENDACIONES.

Para la determinación de diferencias más significativas entre estas y otras especies del mismo género se recomienda plantear investigaciones desde el punto de vista molecular lo cual sumado a otras variables como DCM-P traerán bases más concretas.

Es importante realizar el procedimiento de las demás pruebas de actividad biológica en la especie de interés y compararlo con las demás serpientes que se encuentren emparentadas filogenéticamente, esto contribuiría al mejor entendimiento de la composición de su veneno y al manejo adecuado de los accidentes ofídicos.

12. BIBLIOGRAFÍA

- 1 ACOSTA DE PÉREZ, O.; MARUÑAK, S.; RUÍZ DE TORRENT, R.; TEIBLER, G.; LEIVA, L.; GAY, C.; ORTEGA, H.3. 2004. Actividad fosfolipásica, defibrinante, mionecrótica y letal del veneno de la serpiente *Bothrops jararacussu* de Argentina. **Universidad Nacional del Nordeste Comunicaciones Científicas y Tecnológicas**. Resumen: V-019. 4 pp.
- 2 ALVARADO ISLAS A.; PAZ VILLAFÁN O.; LEON CAMPOS Y.; AGUILAR SETIEN A. 2004. Obtención de una fracción crotálica con actividad hemoaglutinante y evaluación *in vivo* e *in vitro* del probable daño a tejidos. **Técnica Pecuaria en México**; 42(2): 247-260.
- 3 AYERBE GONZÁLEZ, S.; ARRIETA GUEVARA; C. A. CHANTRE ORTIZ; E. R. CORAL PLAZA Y J. GUERRERO VARGAS. 2007. Catálogo de los Reptiles presentes en las Colecciones de Referencia y Exhibición del Museo de Historia Natural de la Universidad del Cauca. Taller Editorial Universidad del Cauca, Popayán (Colombia). 84 pp.
- 4 AYERBE GONZÁLEZ, S.; LATORRE LEDEZMA J. P. 2009. Manual para la prevención y mejoramiento en la atención del Paciente con accidente ofídico. Secretaria Departamental de Salud del Cauca. ISBN: 978-958-44-5272-6. 60 pp.
- 5 AYERBE GONZÁLEZ, S.; 2003. Ofidismo en Colombia. Memorias del Primer Congreso Para Médicos Generales del Suroccidente Colombiano. Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad del Cauca. Popayán Colombia. 16 pp.
- 6 AYERBE GONZÁLEZ, S.; 2001. Tratamiento del Ofidismo en el Departamento del Cauca. **Revista de la Facultad de Ciencias de la Salud Universidad del Cauca**. 2001 Vol.3, no.1, 20-26/62.

- 7 AYERBE GONZÁLEZ, S.; 2001. Ofidismo en el Departamento del Cauca, Colombia. Epidemiología, etiología, Clínica y complicaciones. . **Revista de la Facultad de Ciencias de la Salud Universidad del Cauca**. 2000 Vol.2, no.4, 21-28/55.
- 8 AYERBE GONZÁLEZ, S.; 2008. Ofidismo en Colombia. Enfoque, Diagnóstico y Tratamiento. Memorias del Primer Congreso Para Médicos Generales del Suroccidente Colombiano. Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad del Cauca. Popayán Colombia. Cáp. 49. 25 pp.
- 9 AYERBE GONZÁLEZ, S., GUERRERO VARGAS, J. A.; RIVAS PAVA, M.P. 2003. Introducción a la Toxinología Importancia de la Conservación de Especies Consideradas Peligrosas por ser Venenosas. Manejo de Fauna Silvestre en Amazonía y Latinoamérica. Mc. Arthur Foundation. 381-385 pp.
- 10 BÁEZ, A.; TEIBLER, P.; MERLO, W.; BURNA, A.; ACOSTA BADARÓ, M.; SOLANA, M.; INFULESKI, R.; ACOSTA DE PÉREZ, O. 2005. Lesiones Sistémicas en un Canino por Intoxicación Ofídica. Departamento Clínicas, Facultad de Ciencias Veterinarias, UNNE, Sargento Cabral 2139, Corrientes (3400), Argentina. **Revista Veterinaria de Argentina**. 16: 2, 95–98.
- 11 BARRAVIERA, B. E P. CAMARA-MARQUES-PEREIRA 1999. Acidentes por Serpentes do Gênero *Bothrops* in: Barraviera, B. Venenos, Aspectos Clínicos e Terapêuticos, EPUB. 268 -272.
- 12 CAMAYO, R. 2010. Evaluación del efecto del veneno de *Bothrops asper* (serpentes: Viperidae) sobre fibrinógeno humano y la neutralización producida por sueros antiofídicos polivalentes colombianos. Trabajo de grado (Biólogo). Universidad del Cauca. Facultad de ciencias Naturales, Exactas y de la Educación. Departamento de Biología.
- 13 GAMBOA, BERBEST, M.C.; 1992. Hemostasia Procedimientos Interpretación y Correlación Clínico- Patológica. Federación Colombiana de Laboratorios Clínicos. Bogotá. 186 pp.

- 14 FOLLECO - FERNÁNDEZ, A. 2010. Taxonomía del complejo *Bothrops asper* (serpentes: Viperidæ) en el sudoeste de Colombia. Revalidación de la especie *Bothrops rhombeatus* (García 1896) y descripción de una nueva especie. **Revista Novedades Colombianas**, 10(1):33-69
- 15 GAY, C.; MARUÑAK, S. L.; LEIVA, L. C.; ACOSTA DE PÉREZ, O. C. 2004. Aislamiento y caracterización de una hemorragina acídica del veneno de *Bothrops alternatus*. Universidad Nacional Del Nordeste Comunicaciones Científicas Y Tecnológicas. 4pp.
- 16 GUTIÉRREZ, J. M. 2002. Comprendiendo los venenos de serpientes: 50 años de investigaciones en América Latina. Instituto Clodomiro Picado, Facultad de Microbiología, Universidad de Costa Rica, San José, Costa Rica. **Revista de Biología Tropical**. Trop. 50(2): 377-394.
- 17 INSTITUTO CLODOMIRO PICADO. 2007. Manual de métodos de laboratorio. Determinación de actividades tóxicas de venenos de serpientes y su neutralización por antivenenos. Universidad de Costa Rica. Facultad de Microbiología. 21-22.
- 18 ISLA, M.; MÁLAGA, O.; YARLEQUÉ, A. 2003. Características bioquímicas y acción biológica de una hemorragina del veneno de *Bothrops brazili*. An. Fac. med., jul. /sep. vol.64, no.3, p.159-166. ISSN 1025-5583.
- 19 MARUÑAK, S.L.; RUÍZ DE TORRENT, R.M.; TEIBLER, G.P.; GAY, C.C.; LEIVA, L.; ACOSTA DE PÉREZ, O. 2006. Acción del veneno de *Bothrops jararacussu* de Argentina sobre la coagulación sanguínea. UNNE. **InVet**. 8(1): 119-128.
- 20 MARVAL, E.; AROCHA PIÑANGO. C. L. 1993. Efecto de Algunos Venenos y Secreciones de Animales sobre el Mecanismo Hemostático. INTERCIENCIA 18(1): 10-15. URL: <http://www.interciencia.org.ve>.
- 21 MORA-OBANDO, D. L. 2010. Análisis de la variación proteica de los venenos de *Bothrops asper* de la reserva natural de las aves El Pangán, Barbacoas (Nariño), El Tambo (Cauca), de las costas Pacífica y del

- Caribe de Costa Rica y *Bothrops cf. asper* del valle del Patía (Cauca). Trabajo de grado (Biólogo). Universidad de Nariño. Facultad de Ciencias y Exactas Naturales. Programa de Biología. Nariño. 134 pp.
- 22 NAVIA-PIZO, R. 2006. Determinación de la dosis letal 50 del veneno de tres poblaciones de *Bothrops asper* (Serpentes Viperidæ) y su incidencia epidemiológica en Departamento de Cauca, Colombia. edición; Popayán; Trabajo de grado (Biólogo). Universidad del Cauca. Facultad de ciencias Naturales, Exactas y de la Educación. Departamento de Biología. Popayán-Cauca. 101 pp.
- 23 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. Investigación financiada por la Universidad de Antioquia y el Instituto Bioclón, Laboratorios Silanes S. A. de C. V., México. **latreia**, 15:1.
- 24 PATIÑO, C. 2002. Serpientes Venenosas. Grupo de Estudio de Animales Silvestres. Universidad Nacional de Colombia. **Boletín GEAS**. V III, núm. 1- 6 / 37.
- 25 PINEDA, D. 2002. Accidente Ofídico. Pineda, D. Accidentes por Animales Venenosos. Instituto Nacional de Salud. 19-69. 194 pp.
- 26 R. DE ROODT, A.; ESTÉVEZ-RAMÍRES, J.; DOLAB J. A.; MANZANELLI M. V.; PIÑEIRO N.; PANIAGUA J.F Y URS VOGT A. 2006. Características Biológicas e Inmunológicas del Veneno de *Bothrops cotiara* (Serpentes: Viperidae). **Revista de Biología Tropical**. (Int. J. Trop. Biol. ISSN-0034-7744) Vol. 54 (3): 889-901.
- 27 R. DE ROODT, A.; ESTÉVEZ-RAMÍREZ, J.; PANIAGUA-SOLÍS, J.; LITWIN, S.; CARVAJAL SAUCEDO, A.; DOLAB, J, A.; ROBLES-ORTIZ, L, E.; ALAGÓN, A. 2004. Toxicidad de venenos de serpientes de

- importancia médica en México. **Gaceta Médica de México**. Vol. 141 No. 1, 2005.
- 28 RODRÍGUEZ, S.; NEGRIN, A.; BURGER, M. 2004. Efecto adverso por suero antiofídico. Departamento de Toxicología y Centro Nacional de Fármaco vigilancia. **Revista Medica del Uruguay**. 20: 228-232
- 29 SARAVIA, P.; ROJAS, E.; ESCALANTE, B. T.; ARCE, V.; CHAVES, E.; VELÁSQUEZ, R.; LOMONTE, B.; ROJAS, G.; GUTIERREZ, J. M. 2001. The venom of *Bothrops asper* from Guatemala: toxic activities and neutralization by antivenoms. **Toxicon** 39. 401-405.
- 30 SMOLKA, M.B.; MARANGONI, S.; OLIVEIRA, B. AND NOVELLO, J.C. 1998. Purification and partial Characterization of a Thrombin-Like enzyme, Balterobin, from the venom of *Bothrops alternatus*. **Toxicon** 36, 7, 1059-1063.
- 31 SOLANO, G.; A, SEGURA; M. HERRERA; A. GÓMEZ; M. VILLALTA; J.M GUTIÉRREZ and G. LEON. Study of the design and analytical properties of the lethality neutralization assay used to estimate antivenom potency against *Bothrops asper* snake venom. S.p.1 in Prep. 1-33 pp.
- 32 YASNÓ, F. 2005. Determinación del efecto citotóxico y genotóxico del veneno de serpiente *Bothrops asper* (Viperidæ) en eritrocitos de sangre periférica de ratones (*Mus musculus*) mediante la prueba de micronúcleos. Trabajo de grado (Biólogo). Universidad del Cauca. Facultad de ciencias Naturales, Exactas y de la Educación. Departamento de Biología. Popayán-Cauca.