

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS Y FARMACIA

Caracterización farmacopatológica del veneno de "mano
de piedra" *Atropoides nummifer* (Ruppell, 1845,
Squamata, Viperidae) y evaluación de la capacidad
neutralizante de dos sueros antiofídicos polivalentes
distribuidos en Guatemala



Informe de tesis

Presentado por:

Juan José Chávez Mulet

Para optar al Título de:
Biologo

Guatemala, marzo del 2001

DL
06
†(2108)

JUNTA DIRECTIVA

DECANA: Licda. Hada Marieta Alvarado Beteta

SECRETARIO: Lic. Oscar Federico Nave Herrera

VOCAL I: Dr. Oscar Manuel Cobar Pinto

VOCAL II: Dr. Rubén Dariel Velásquez Miranda

VOCAL III: Dr. Federico Adolfo Richter Martínez

VOCAL IV: Br. César Alfredo Flores López

VOCAL V: Br. Manuel Aníbal Leal Gómez

DEDICATORIA

A mis padres, Juan José y Lizzie, a mi hermana Luisa María, y a toda mi demás Familia.
A mis amigos de toda la vida, y a los de la "promo", Pablo, Alicia, Estuardo G., Claudia y Estuardo S.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco especialmente:

A la MSc. Patricia Saravia quien me permitió participar en el proyecto de investigación financiado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología CONCYT: MS.058-1 titulado: "*Transferencia Biotecnológica para la Caracterización Proteica e Inmunológica de los Venenos de Serpientes con el fin de evaluar y desarrollar localmente sueros antiofídicos específicos*" y NETROPICA, sin lo cual no hubiera sido posible llevar a cabo esta investigación.

Al Departamento de Bioquímica de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia de la Universidad de San Carlos de Guatemala por haberme proporcionado el equipo de laboratorio y los reactivos necesarios para realizar el trabajo experimental.

Al Museo de Historia Natural de la Escuela de Biología de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia de la Universidad de San Carlos de Guatemala; al Museo de Historia Natural "Jorge Ibarra" y al serpentario del Zoológico "La Aurora" por haber proporcionado los especímenes que fueron ordeñados para la obtención del veneno.

A Carlos Vásquez, Herbert Morales y al MSc. Oscar Lara por haber ordeñado los especímenes.

Al Instituto Clodomiro Picado por haberme donado los antivenenos, y al PhD. José María Gutiérrez por su valiosa asesoría en el diseño experimental de esta investigación.

Al Bioterio de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia de la Universidad de San Carlos, especialmente a Norma, por haberme proporcionado los ratones.

Al MSc. Jorge Matute por su valiosa asesoría en el tratamiento estadístico de los resultados, así como al MSc. Sergio Melgar por sugerirme los matices que le dieron rigor a esta investigación.

A los laboratorios de Virología y Microbiología del INCAP por haber liofilizado el veneno.

A Leonel Martínez por haber gestionado el uso del Fibrinómetro del Hospital San Juan de Dios para medir los tiempos de coagulación.

A la MSc. Carlota Monroy por haberme permitido realizar las neutralizaciones de la actividad Fosfolipasa A₂ en el Laboratorio de Entomología y Parasitología de la Escuela de Biología de la Universidad de San Carlos.

Al MSc. Oscar Lara por el material bibliográfico y las diapositivas que me proporcionó.

Al Lic. Fernando Díaz por haber tomado las diapositivas que acompañaron la exposición de esta investigación.

A la MSc. Patricia Saravia, Al Dr. Juan Fernando Hernández, al MSc. Oscar Lara, y a Eugenia Betoulle por haber revisado y pulido los detalles de este informe.

INDICE

I.	RESUMEN	1
II.	INTRODUCCIÓN	3
III.	ANTECEDENTES	5
	3.1. CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA DE LOS OFIDIOS	5
	3.2. CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LOS OFIDIOS	5
	3.3. COMPOSICIÓN DE LOS VENENOS OFÍDICOS	6
	3.3.1 Enzimas	7
	A) Fosfolipasa A ₂	7
	B) Enzimas Proteolíticas.	8
	a) Endopeptidasas.	8
	b) Exopeptidasas.	9
	c) Proteasas específicas.	9
	C) Otras Enzimas	10
	3.3.2. PROTEÍNAS Y POLIPÉPTIDOS NO ENZIMÁTICOS.	10
	A) Neurotoxinas.	11
	B) Hemorraginas.	11
	C) Miotoxinas.	11
	3.4. LA FAMILIA VIPERIDAE	12
	3.5.1 CARACTERÍSTICAS DE LOS ENVENENAMIENTOS PRODUCIDOS POR VIPÉRIDOS	13
	3.5.2. <i>Atropoides nummifer</i>	15
	3.5. ESTUDIOS TOXICOLÓGICOS DEL VENENO DE <i>Atropoides nummifer</i> REALIZADOS EN CENTROAMÉRICA	15
	3.6. PRODUCCIÓN Y PURIFICACIÓN DE SUEROS ANTIOFÍDICOS	16
IV.	JUSTIFICACIÓN	19
V	OBJETIVOS	20
	5.1 Objetivo General	20
	5.2 Objetivos Específicos	20
VI	MATERIALES, REACTIVOS Y MÉTODOS	21
	6.1. UNIVERSO DE TRABAJO	21
	6.2. MUESTRA:	21
	6.3. MATERIALES	21
	6.4 REACTIVOS	22
	6.4.1 OBTENCIÓN DEL VENENO.	23
	6.4.2. PREPARACIÓN DE REACTIVOS	23
	6.5 DISEÑO EXPERIMENTAL	24
	6.5.1. DETERMINACIONES DE LOS EFECTOS TOXICOLÓGICOS DEL VENENO	25
	A) DOSIS LETAL MEDIA (DL ₅₀)	25
	B) DOSIS HEMORRÁGICA MÍNIMA (DHM)	25
	C) DOSIS COAGULANTE MÍNIMA (DCM)	26
	D) ACTIVIDAD FOSFOLIPASA A ₂	26
	6.5.2. DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD NEUTRALIZANTE DE UN ANTIVENENO	27
	A) NEUTRALIZACIÓN DE LA DOSIS LETAL MEDIA	27
	B) NEUTRALIZACIÓN DE LA ACTIVIDAD HEMORRÁGICA	28
	C) NEUTRALIZACIÓN DE LA ACTIVIDAD COAGULANTE	29

	D) NEUTRALIZACIÓN DE LA ACTIVIDAD FOSFOLIPASA A ₂	29
	6.5.3 TRATAMIENTO ESTADÍSTICO	30
VII.	RESULTADOS	30
VIII.	DISCUSIÓN	32
IX.	CONCLUSIONES	34
X.	RECOMENDACIONES	38
XI.	REFERENCIAS	39
XII.	ANEXOS	40
	1 Distribución de <i>Porthidium nummifer</i> en México y Centroamérica.	47
	2 Tabla: Accidentes ofídicos ocurridos en Guatemala de 1987 a 1992	47
	3 Mapa: Distribución de otras especies de vipéridos en Centroamérica	48
	4 Tabla: Dosis Letal Media (DL ₅₀)	49
	5 Tabla: Neutralización Dosis Letal Media con el Antiveneno MYN	50
	6 Tabla: Neutralización Dosis Letal Media con el Antiveneno del ICP	50
	7a Tabla: Dosis Hemorrágica Mínima (DHM)	51
	7b Gráfico: Tendencia de la Curva para Determinar la DHM	51
	7c Gráfico: Determinación de la DHM	52
	8a Tabla: Neutralización de la Actividad Hemorrágica con el Antiveneno del ICP	53
	8b Gráfico: Neutralización de la Actividad Hemorrágica con el Antiveneno del ICP	53
	9a Tabla: Neutralización de la Actividad Hemorrágica con el Antiveneno MYN	54
	9b Gráfico: Neutralización de la Actividad Hemorrágica con el Antiveneno MYN evaluada con 2 DHM	54
	10a Tabla: Dosis Coagulante Mínima (DCM)	55
	10b Gráfico: Tendencia de la Curva para Determinar la DCM	55
	10c Gráfico: Determinación de la Actividad Coagulante	56
	11a Tabla: Neutralización de la Actividad Coagulante con el Antiveneno del ICP	57
	11b Gráfico: Tendencia de la curva para Determinar la Neutralización de la Actividad Coagulante	57
	11c Gráfico: Neutralización de la Actividad Coagulante con el Antiveneno del ICP	58
	12a Tabla: Neutralización de la Actividad Coagulante con el Antiveneno MYN	59
	12b Gráfico: Tendencia de la Curva para Determinar la Neutralización de la Actividad Coagulante con el Antiveneno MYN	59
	12c Gráfico: Neutralización del Efecto Coagulante con el Antiveneno MYN	60
	13a Tabla: Determinación de la Actividad Fosfolipasa A ₂	61
	13b Gráfico: Tendencia de la Curva para Determinar la Actividad Fosfolipasa A ₂	61
	14a Tabla: Neutralización de la Actividad Fosfolipasa A ₂ con el Antiveneno del ICP	62
	14b Gráfico: Tendencia de la Curva para Determinar la Neutralización de la Actividad Fosfolipasa A ₂ con el Antiveneno del ICP	62
	14c Gráfico: Neutralización de la Actividad Fosfolipasa A ₂ con el Antiveneno del ICP	63
	15a Tabla: Neutralización de la Actividad Fosfolipasa A ₂ con el Antiveneno MYN	64
	15b Gráfico: Neutralización de la Actividad Fosfolipasa A ₂ con el Antiveneno MYN	64
	16 Tabla: Caracterización toxicológica del veneno de <i>Crotalus durissus</i> de Guatemala	65
	17 Tabla: Caracterización toxicológica del veneno de <i>Bothrops asper</i> de Guatemala	66
	18 Tabla: Neutralización de las actividades tóxicas y enzimáticas de cuatro venenos de serpientes de Guatemala y Honduras por el antiveneno polivalente producido en Costa Rica (Rojas 1987)	67

I. RESUMEN

El propósito de esta investigación fue realizar la caracterización farmacopatológica del veneno de la serpiente *Atropoides nummifer*¹ (mano de piedra) y evaluar la capacidad neutralizante de los efectos caracterizados por los dos antivenenos polivalentes distribuidos en Guatemala, el antiveneno mexicano MYN®, y el antiveneno costarricense del Instituto Clodomiro Picado, ICP. Los efectos toxicológicos del veneno evaluados en este estudio fueron: el letal, hemorrágico, coagulante y actividad fosfolipasa A₂.

Las circunstancias que impulsaron la realización de este estudio fueron primeramente, la necesidad de profundizar en el estudio de *Atropoides nummifer*, un espécimen poco investigado en Centroamérica; así como la de evaluar la capacidad neutralizante de los dos antivenenos que se pueden encontrar en el país, los cuales no incluyen en su elaboración el veneno de esta especie. *Atropoides nummifer* está ampliamente distribuida en Guatemala y aunque no se conoce exactamente el impacto que tiene en el accidente ofídico se estima que éste es importante. De ahí que haya sido necesaria la caracterización de los efectos de este veneno y la evaluación de la eficacia neutralizante de los antivenenos antes mencionados.

Los resultados obtenidos revelaron que el veneno de *Atropoides nummifer* presenta los efectos característicos de los vipéridos. El veneno de especímenes guatemaltecos de *A. nummifer* mostró ser menos letal, menos coagulante y menos hemorrágico que los venenos de *Bothrops asper* y *Crotalus d. durissus* de especímenes guatemaltecos y costarricenses. Sin embargo presentó una importante actividad fosfolipasa A₂ comparada con la actividad fosfolipasa A₂ descrita para las especies antes mencionadas.

Ambos antivenenos resultaron igualmente efectivos para neutralizar el efecto coagulante. No obstante, el antiveneno del ICP fue más efectivo que el antiveneno MYN®

¹ Antes clasificada como *Porthidium nummifer* o *Bothrops nummifer*

para la neutralización de la actividad fosfolipasa A₂ y fue el que neutralizó los efectos letal, y hemorrágico; contrariamente al antiveneno MYN® con el cual no se pudo alcanzar la neutralización de estos efectos.

En vista que el antiveneno MYN® no neutralizó los efectos letal y hemorrágico y que mostró ser menos efectivo en la neutralización de la actividad fosfolipasa A₂, siendo ésta importante en el desarrollo de secuelas secundarias, se recomienda usar el antiveneno ICP para tratar el accidente ofídico provocado por esta especie.

II. INTRODUCCIÓN

En el siglo XVII un florentino llamado Francisco Redi mostró que el líquido que escurría de los colmillos de las serpientes causaba la muerte después de una mordedura (Ménez 1987). Desde entonces la investigación sobre el ofidismo ha conocido un desarrollo significativo. La causa de este notable interés por el ofidismo se comprende si se considera que en el mundo, cerca de 2,500 especies de serpientes diferentes han sido reportadas; dentro de las cuales 400 son venenosas y estimadas peligrosas para el hombre (Ménez 1987).

El ofidismo en los países tropicales y subtropicales es un problema relevante. La herpetofauna guatemalteca cuenta con 118 especies de ofidios, de las cuales 18 son venenosas. Éstas están agrupadas en tres de las cinco familias de ofidios representadas en la región -Hydrophidae, Elapidae y Viperidae-. (Campbell *et al.* 1989). Las especies en el país más comúnmente involucradas en el accidente ofídico son *Bothrops asper*, *Atropoides nummifer*, -conocida anteriormente como *Porthidium nummifer* o *Bothrops nummifer*-, *Agkistrodon bilineatus* y *Crotalus durissus durissus*. Se ha estimado que anualmente en el mundo mueren entre 50,000 y 100,000 personas a causa de envenenamientos por serpientes (Warrel & Fenner 1993). En Guatemala los datos epidemiológicos son incompletos (Cfr. Anexo 2) debido a que las personas afectadas no acuden a los Centros de Salud ya sea por la difícil accesibilidad o por idiosincrasia, prefiriendo ser atendidos por curanderos, lo que impide un registro confiable de los accidentes ofídicos. Sin embargo, por ser Centroamérica una región biogeográfica comparable, puede hacerse una analogía con la situación en Costa Rica en la que se ha estimado una incidencia del accidente ofídico de 15.6 casos por 100,000 habitantes/año, con tasas de mortalidad y de letalidad de 0.03/100,000 habitantes y 0.18 %, respectivamente (Arroyo, 2000).

Las características bioquímicas del veneno a partir del cual se elaboran los antiofídicos es uno de los factores que determinan su especificidad y capacidad neutralizante. En Guatemala aún no se elaboran antiofídicos a partir de venenos de

especies nativas. Se encuentran disponibles únicamente dos sueros antiofídicos polivalentes, el antiveneno del Instituto Clodomiro Picado, ICP y el antiveneno MYN®, elaborados con venenos de especies costarricenses y mexicanas respectivamente. Se ha reportado que algunos factores como la alimentación, el clima o la distribución geográfica, entre otros, pueden alterar la composición bioquímica del veneno en las especies de ofidios (Taborska *et al.*, 1985; Meier 1986; Minton *et al.*, 1986; Chippaux *et al.*, 1991; Daltry 1996). De ahí que la investigación sobre la variabilidad toxicológica y bioquímica de los venenos ofídicos tenga una especial relevancia para aportar algunas pistas en los estudios sobre relaciones evolutivas (Dessauer 1987) y una importancia práctica en la preparación de antivenenos más efectivos (Chippeaux *et al* 1991).

Considerando el accidente ofídico como un problema de salud pública en el país, es indispensable realizar la caracterización farmacopatológica de los principales venenos ofídicos de las especies guatemaltecas y evaluar la capacidad de ser neutralizados por los antivenenos disponibles en Guatemala. La presente investigación tuvo como objetivo determinar estos aspectos para el veneno de la especie guatemalteca *Atropoides nummifer*, (mano de piedra) utilizando la metodología estandarizada internacionalmente para la determinación de actividades tóxicas de venenos y su neutralización con los antivenenos producidos en Costa Rica (ICP) y México (MYN®).

III. ANTECEDENTES

3.1. CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA DE LOS OFIDIOS

Phylum: Chordata

Clase: Reptilia

Orden: Squamata

Sub Orden: Ophidia

Los ofidios o serpientes son animales que pertenecen al Phylum de los Cordados (*Chordata*), es decir, poseen cuerda dorsal y simetría bilateral. Forman parte del Grupo de los Vertebrados (*Vertebrata*) por tener un endoesqueleto y un cráneo que envuelve al encéfalo (Web Site, Instituto Clodomiro Picado).

Están ubicadas en la Clase de los Reptiles (*Reptilia*, Suborden: *Ophidia*), por tener un corazón con tres cavidades, respiración pulmonar y temperatura corporal variable (poiquilotermos). Se les ha incluido dentro del Orden de los Escamosos (*Squamata*), porque tienen el cuerpo totalmente recubierto de escamas epidérmicas (Web Site, Instituto Clodomiro Picado).

3.2. CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LOS OFIDIOS

El suborden de las serpientes se caracteriza por la presencia de un esqueleto formado por un cráneo, una larga columna vertebral, costillas flotantes, ausencia de esternón; piel con escamas epidérmicas y, en algunas familias; rudimentos de pelvis y de miembros posteriores. Los ofidios se diferencian fácilmente de algunos lagartos y anfibios ápodos, por la siguiente combinación de caracteres: a) En el cráneo de las serpientes, la mandíbula no está directamente articulada al cráneo, sino por medio de un hueso corto, intermediario, llamado cuadrado; b) La mandíbula de los ofidios consta de dos ramas

separadas y débilmente unidas entre sí por medio de un ligamento elástico; c) Los ofidios carecen de oído externo, tímpano y oído medio, es decir, son sordas; d) El cuerpo siempre está cubierto por escamas yuxtapuestas y no por anillos con placas o piel lisa. (Web Site, Instituto Clodomiro Picado).

La herpetofauna mundial es sumamente abundante y diversa, existiendo alrededor de 2400 especies de ofidios (Web Site, Instituto Clodomiro Picado).

3.3. COMPOSICIÓN DE LOS VENENOS OFÍDICOS

Una propiedad de los venenos de las serpientes es la de iniciar la digestión extracelular de sus presas. Otra propiedad de numerosos venenos es la de inmovilizar rápidamente a la presa (Ménez 1987). En general, se puede decir que los venenos tienen una función de defensa en todos los animales y en los ofidios, también alimenticia y de ataque (Rieppel *et al.* 1988). Los venenos son producidos en glándulas especiales, que filogenéticamente son equivalentes a las parótidas (Bolaños 1984). En las familias Viperidae y Elapidae, las glándulas presentan células de tipo epitelial que vierten su secreción en canalículos que desembocan en un receptáculo (lumen) en donde es almacenada hasta su expulsión. Las glándulas de veneno de los vipéridos tienen forma triangular y poseen una glándula accesoria globular que rodea el extremo terminal del canalículo (Kochva *et al.*, 1966).

Los venenos de serpientes contienen alrededor de un 25% de sólidos totales de los cuales entre un 70 a 90 % están constituidos por proteínas y polipéptidos de relativamente alta masa molecular, responsables de la mayoría de los efectos farmacológicos. Esta alta concentración de sólidos les confiere una gran viscosidad a los venenos. El resto de los componentes (10 a 30%) lo forman sustancias orgánicas de baja masa molecular, tales como carbohidratos, lípidos, péptidos pequeños, aminoácidos libres, aminas biogénicas y nucleótidos, riboflavinas, ácidos orgánicos como también compuestos inorgánicos y elementos, tanto aniónicos como catiónicos (Bieber 1979).

3.3.1. ENZIMAS

Los venenos contienen una gran variedad de enzimas principalmente hidrolíticas, debido a su función en la digestión externa de las presas. La mayoría de enzimas no tienen un efecto letal y tampoco participan en los efectos fisiopatológicos del envenenamiento (Bolaños 1984).

A) Fosfolipasa A₂

Esta enzima ha sido encontrada en todos los venenos hasta hoy estudiados. Antiguamente se le conocía como lecitinasa, por ser la lecitina uno de sus principales sustratos. Hoy en día se han reportado numerosos sustratos sobre los cuales actúa. La fosfolipasa A₂ actúa hidrolíticamente sobre el carbono 2, formando la molécula conocida como lisolecitina, la cual es capaz de lisar eritrocitos. Debido a que la fosfolipasa A₂ no actúa directamente sobre los eritrocitos, -requiere del sustrato lecitina-, la acción de esta enzima se conoce como hemólisis indirecta.

La fosfolipasa puede actuar también sobre los fosfolípidos del sistema nervioso pudiendo interferir en la conducción axónica. La acción sobre fosfolípidos de membranas celulares produce alteraciones que se pueden poner de manifiesto por la permeabilidad de enzimas intracelulares. Sobre mitocondrias es capaz de provocar tumefacción y destrucción y, por lo tanto, afectar el sistema de transporte de electrones. Sin embargo, a pesar de la acción enzimática, la fosfolipasa A₂ no es responsable de la letalidad del veneno crudo. Su toxicidad puede considerarse como baja. Las masas moleculares de las fosfolipasas A₂ que han sido investigadas varían entre un mínimo de 8,500 daltons hasta un máximo de 36,000, ubicándose la mayoría entre 10,000 y 16,000 (Bolaños 1984; Rosenberg 1986).

Recientemente se han estudiado las lesiones musculares inducidas por la acción de enzimas miotóxicas con estructura fosfolipasa A₂. Estas enzimas básicas actúan a nivel de la membrana plasmática de las células musculares. Algunas de estas toxinas poseen una actividad fosfolipasa A₂ relativamente elevada mientras que otras exhiben una muy baja actividad enzimática o ninguna actividad fosfolipasa A₂, pero con actividad miotóxica (Díaz *et al*, 1992). Este tipo de enzimas que inducen graves edemas han sido detectadas en los venenos de especies del género *Bothrops*, algunas de las cuales pertenecen ahora a los géneros *Porthidium*, *Atropoides*, *Cerrophidion* o *Agkistrodon* (Gutiérrez *et al*, 1986)

B) Enzimas Proteolíticas.

El efecto proteolítico de los venenos sobre sustratos tales como la caseína, gelatina, albúmina bovina y otras proteínas se conoce desde los inicios del siglo. Pronto se llegó a observar que el fenómeno era complejo, interviniendo una serie considerable de enzimas con diferentes mecanismos de acción (Bolaños 1984). Las enzimas proteolíticas agrupan el conjunto de enzimas que participan en la degradación de proteínas. Actualmente se reconocen, en general, tres grupos de enzimas proteolíticas: endopeptidasas, exopeptidasas y proteasas altamente específicas (Barrett 1986)

a) Endopeptidasas.

Se encuentran ampliamente distribuidas en venenos de serpientes de la familia Viperidae y excepcionalmente en Elapidae. Las endopeptidasas actúan en el interior de las cadenas peptídicas (Barrett 1986) pudiendo hacerlo, inclusive, sobre los mismos componentes del veneno. Las masas moleculares de diferentes proteasas de venenos muestran una considerable variación desde 21,400 hasta 95,000 daltons; no obstante debe tenerse presente que algunas de estas enzimas tienden a formar dímeros, trímeros o tetrámeros, situación que altera la figura de la masa molecular. Las proteasas, con una masa molecular relativamente alta, pueden tener una buena antigenicidad. Estas proteasas dependen de iones metálicos, como el calcio y el zinc, para su actividad enzimática. Su

acción enzimática es inhibida por la presencia de agentes quelantes como el EDTA (Bolaños 1984).

b) Exopeptidasas.

Aparentemente sin importancia en la patología del envenenamiento, estas enzimas se encuentran ampliamente distribuidas en los venenos de las diferentes especies de serpientes venenosas. Se caracterizan por su efecto en di o tripéptidos y no se les conoce efecto farmacológico alguno (Bolaños 1984). Las exopeptidasas actúan en el extremo terminal de las cadenas peptídicas (Barrett 1986).

c) Proteasas específicas.

Estas enzimas solamente actúan sobre un sustrato específico y su efecto tiene gran importancia en la patología del envenenamiento (Bolaños 1984).

Quinogenasa

El quinógeno o bradiquininógeno, una globulina plasmática es el sustrato específico de la proteasa bradiquinina. La bradiquinina es un polipéptido que tiene un drástico efecto vasopresor y, además, aumenta la permeabilidad capilar. Esta enzima es por lo tanto uno de los factores involucrados en la brusca caída de la presión arterial y del edema que se manifiesta en el envenenamiento por vipéridos. Su mecanismo de acción pareciera ser a través de una inhibición de la angiotensinasa, enzima productora de angiotensina, un potente vasopresor. La bradiquinina no es un constituyente del veneno, sino que es liberada, por éste de los tejidos de la víctima. Este fenómeno se conoce con el nombre de acción autofarmacológica de los venenos, siendo típico del envenenamiento por vipéridos (Bolaños 1984).

Enzimas procoagulantes.

El mecanismo normal de coagulación sanguínea puede ser alterado de muy diversas formas por los venenos de serpientes, pero todas conducen únicamente a dos situaciones: coagulación y anticoagulación. La mayoría de los venenos contienen factores que pueden producir ambos tipos de efecto, dependiendo el resultado final de las concentraciones relativas de ambos. Las enzimas tipo trombina son proteasas altamente específicas para el fibrinógeno (Bolaños 1984).

C) Otras Enzimas.

Dentro de las enzimas hidrolíticas se encuentran *fosfodiesterasas*, capaces de hidrolizar ésteres del ácido fosfórico que actúan sobre ácidos nucleicos, ATP, etc. La *hialuronidasa* actúa hidrolizando el ácido hialurónico, facilitando la difusión del veneno en los tejidos. La hialuronidasa está presente en todos los venenos de vipéridos. La acetilcolinesterasa, encontrada frecuentemente en el veneno neurotóxico, típico de los elápidos (Bolaños 1984).

Dentro de las enzimas no hidrolíticas se pueden encontrar transaminasas, glutámica, pirúvica y láctica; la L-aminoácido oxidasa que transforma aminoácidos libres a cetoácidos. El grupo prostético de esta enzima es el responsable del color amarillo de los venenos (Thomas *et al.*, 1979).

3.3.2 PROTEÍNAS Y POLIPÉPTIDOS NO ENZIMÁTICOS.

Las más importantes toxinas de este grupo están representadas por las neurotoxinas, las cardiotoxinas, las citocinas, las hemorraginas y las miotoxinas (Bolaños 1984).

A) Neurotoxinas:

Son típicas de las familias Hydrophiidae y Elapidae y se caracterizan por interferir con la transmisión nerviosa. Estas toxinas han sido las mejores documentadas en los venenos de serpientes hasta la fecha. Las neurotoxinas postsinápticas impiden la interacción entre la acetilcolina liberada en la membrana presináptica y la α -subunidad del receptor colinérgico. Como consecuencia de esto no es posible sostener la contracción del músculo. Si los músculos del sistema respiratorio son afectados, puede ocurrir la muerte por parálisis respiratoria (Low *et al*, 1987).

B) Hemorraginas:

El fenómeno hemorrágico provocado por venenos de serpientes es uno de los eventos más importantes en la patología del envenenamiento. Los venenos de vipéridos son extremadamente hemorrágicos. Su acción depende de cationes bivalentes (Ca^{2+} , Mg^{2+} , Zn^{2+}) lo que sugiere que son metaloproteínas. Sus masas moleculares oscilan entre 40,000 y 100,000 daltons, lo que en este caso coincide con la excelente antigenicidad con que están dotadas (Bolaños 1984). El sangrado se produce como consecuencia de la acción de las hemorraginas sobre los vasos sanguíneos al degradar los componentes de la lámina basal de los capilares y vénulas, ocasionando colapso de los capilares y extravasación. Puede haber necrosis muscular local a causa de la isquemia, por bloqueo de la irrigación sanguínea (Web site del Instituto Clodomiro Picado)

C) Miotoxinas:

Las miotoxinas son pequeñas proteínas básicas que actúan a nivel de las células musculares provocando necrosis el cual es uno de los efectos del envenenamiento por serpientes de la familia Viperidae más importante en su patología. La necrosis es el mayor agente de secuelas permanentes en el accidente ofídico (Bolaños 1984; Ownby, 1990).

3.4 LA FAMILIA VIPERIDAE

Serpientes ponzoñosas, que se caracterizan por tener huesos faciales móviles, maxilar muy corto, perpendicularmente eréctil y soportando un par de largos colmillos curvados, huecos e inoculadores de veneno, pero sin surco externo; solenoglifas. Esta familia incluye serpientes en su mayoría ovovivíparas y de hábitos diversos. Hay más de 80 especies, distribuidas por América, Europa, Asia y África (Web Site, Instituto Clodomiro Picado).

Las serpientes de esta familia son las de mayor importancia desde el punto de vista médico, en primer lugar porque se ha demostrado que ocasionan la mayoría de los envenenamientos ofídicos en el ámbito mundial, y en segundo término porque los efectos ocasionados por el veneno son muy diversos, graves y generalmente dejan secuelas en la persona mordida (Web Site, Instituto Clodomiro Picado).

Agkistrodon bilineatus, *Crotalus durissus*, *Bothrops asper*, *Bothriechis aurifer*, *Bothriechis bicolor*, *Bothriechis schlegeli*, *Cerrophidion godmani*, *Porthidium nasutum*, *Porthidium ophryomegas* y *Atropoides nummifer* son las 10 especies de ofidios venenosos distribuidas en Guatemala que pertenecen a la familia Viperidae. Las tres primeras y la última de estas especies son las especies de ofidios involucrados comúnmente en el accidente ofídico en el país (Cfr. Anexo 3) (Campbell 1989).

Agkistrodon bilineatus habita en zonas húmedas de baja altura, a orillas de ríos, pantanos o campos de caña de azúcar. Se distribuye en las vertientes Pacífica y Atlántica, entre 0 y 600 msnm, en los departamentos de Escuintla, Suchitepéquez, Retalhuleu y San Marcos. Se le conoce comúnmente como cantil de agua o mocasín. *Crotalus durissus* habita en zonas terrestres áridas, bosques de pinos de altura, sabanas de coníferas y de palmas. Se distribuye en la vertiente Pacífico entre 0-1500 msnm, en Escuintla, Santa Rosa, Guatemala, Suchitepéquez y Petén. Se le conoce comúnmente como cascabel o crótala. *Bothrops asper* habita en zonas terrestres húmedas y se distribuye en la costa Sur

y Norte, entre 0-1500 msnm, en Alta Verapaz, Baja Verapaz, Izabal, Retalhuleu, Escuintla y Santa Rosa. Se le conoce comúnmente como barba amarilla, cantil devanador o terciopelo. *Bothriechis aurifer* es una especie arborícola de bosques nubosos y bosques subtropicales húmedos, se distribuye en la vertiente Atlántica entre 1200-2300msnm. Se le conoce comúnmente como cantil loro, cantil verde, gushnayera (Campbell 1989). *Bothriechis bicolor* es una especie arborícola de bosques nubosos y se distribuye en la vertiente del Pacífico, entre 600-2700 msnm en Sololá y Escuintla. Se le conoce como cotorra o tamagás verde. *Bothriechis schlegeli* es arborícola y habita en selvas húmedas. Se distribuye en la vertiente Atlántica entre 0-1500 msnm en Alta Verapaz. *Cerrophidion godmani* es terrestre y habita en lugares con rocas, bosques de coníferas y a orillas de riachuelos. Se distribuye en tierras altas entre 600-2700 msnm, en Alta Verapaz, El Progreso, Escuintla, Guatemala, Suchitepéquez y Santa Rosa. Se le conoce como cantil frijolillo, cantil de tierra fría. *Porthidium nasutum* es terrestre de zonas húmedas o pantanosas. Se distribuye en la vertiente Caribe y algunas llanuras pacíficas del Sur Occidente entre 0-600 msnm en Alta Verapaz, Baja Verapaz, Petén y Escuintla. Se le conoce como cantil tamagás, cantil sapo. *Porthidium ophryomegas* habita en zonas terrestres. Se distribuye en la vertiente Pacífica, entre 0-1500 msnm y algunos valles secos de la vertiente Atlántica, en Alta Verapaz, Baja Verapaz, Escuintla y El Progreso. Se le conoce comúnmente como chatilla, hocico de cerdo, víbora castellana, tamagás ñatas (Van den Brüle, 1982) (Cfr. Anexo 3)

3.4.1 CARACTERÍSTICAS DE LOS ENVENENAMIENTOS PRODUCIDOS POR VIPÉRIDOS.

Los envenenamientos provocados por vipéridos son múltiples y severos, se caracterizan por efectos locales inmediatos y manifestaciones sistémicas diversas. El grado de severidad de los envenenamientos en estos casos depende de varios factores, entre ellos: la cantidad de veneno inoculado; el sitio anatómico de la mordedura, por ejemplo en la cabeza y el tronco suelen ser casos más severos, peso y talla, por ejemplo en niños las

mordeduras se complican con frecuencia; y el estado fisiológico del individuo (Web Site del Instituto Clodomiro Picado).

Los efectos locales se caracterizan por presentarse en el sitio de la mordedura, teniendo una evolución rápida y caracterizándose por dolor severo, edema, hemorragia y necrosis. Los efectos sistémicos pueden aparecer al cabo de 2-3 horas después de la mordedura, y generalmente son los que causan la muerte del individuo (Web Site del Instituto Clodomiro Picado).

El cuadro hemorrágico sistémico se reconoce por un sangrado en órganos y mucosas que puede originar hipovolemia (disminución del volumen sanguíneo), y por ende un choque cardiovascular (síndrome debido a la insuficiente perfusión de sangre circulante a los tejidos). La hemorragia es ocasionada por las hemorraginas del veneno sobre los capilares y se manifiestan con equimosis (mancha en piel por extravasación de sangre), hemoptisis (expectoración de sangre) y gingivorragia (hemorragia de la mucosa gingival). La mayoría de los venenos de la familia Viperidae tienen una enzima "tipo trombina", que actúa sobre el fibrinógeno produciendo microtrombos (coágulos sanguíneos pequeños en el interior de un vaso) de fibrina. Además, algunos venenos activan el factor X de la coagulación. Como consecuencia de estas acciones se da la desfibrinación, con disminución de los niveles de fibrinógeno y con prolongación de los tiempos de coagulación de protrombina y de tromboplastina parcial (Web Site del Instituto Clodomiro Picado).

Otras consecuencias de la acción de los venenos son los cuadros de coagulación intravascular diseminada que se acompañan de trombocitopenia (disminución en el número de plaquetas) y productos de degradación del fibrinógeno. El choque cardiovascular es uno de los efectos principales como causas de muerte en individuos mordidos, sobretudo por serpientes del grupo de los "cantiles". El sangrado y la exudación ocasionados tanto a nivel local como sistémico originan un cuadro hipovolémico que puede llegar hasta un choque cardiovascular (Web Site del Instituto Clodomiro Picado).

La insuficiencia renal puede presentarse a causa de la acción directa de toxinas en las células de los túbulos renales o de un problema de perfusión a nivel renal. En estos casos se observa oliguria (secreción escasa de orina) o anuria (supresión o disminución de la secreción urinaria) y se elevan las concentraciones séricas de urea y creatinina. Evaluaciones patológicas han demostrado nefrosis de nefrona distal, necrosis tubular aguda y necrosis cortical (Web Site del Instituto Clodomiro Picado).

3.4.2 *Atropoides nummifer*

Atropoides nummifer, antes *Porthidium nummifer* o *Bothrops nummifer* (Werman 1992) es conocida en Guatemala como “mano de piedra”, y pertenece a la familia Viperidae. Su hábitat es terrestre, y se encuentra en bosques húmedos y cálidos, campos situados a la orilla de selvas húmedas y cálidas, sabanas de coníferas de altura. Se distribuye a lo largo de la Vertiente Atlántica y Pacífica, entre 0-2700 msnm. (Van den Brüle 1982) (Cfr. Anexo 1). En Mesoamérica se distribuye desde San Luis Potosí, México, hasta la zona del Canal de Panamá, por la vertiente Atlántica; y desde el sudeste de Oaxaca, México, atravesando Chiapas, y de Guatemala a El Salvador, así como en Costa Rica y Panamá (Campbell, *et al* 1989). Los nombres comunes de esta especie son: mano de piedra, brazo de piedra, “otoay(a)”, dormilón(a), timbo, chinchitor (Van den Brüle 1982), serpiente brincadora. *Atropoides nummifer* está considerada dentro de las especies con mayor impacto en el accidente ofídico en Guatemala. En Guatemala se pueden encontrar dos subespecies *P. n. mexicanum*, en la vertiente Pacífica y *P. n. occiduum* en la vertiente Atlántica (Campbell, *et al.* 1989).

3.5 ESTUDIOS TOXICOLÓGICOS DEL VENENO DE *Atropoides nummifer* REALIZADOS EN CENTROAMÉRICA

Los estudios toxicológicos del veneno de *A. nummifer* en Centroamérica son escasos. La Dosis Letal Media (DL₅₀) encontrada por Bolaños R. (1972) en *B. nummifer* costarricense – hoy *Atropoides nummifer* - fue de 125 µg/g +/- 17.0. En 1987 Overall

determinó la DL_{50} inducida por el veneno de *Bothrops nummifer* guatemalteca en 297.17 $\mu\text{g/g}$ en ratones blancos de 16-18 g.

En 1987 Díaz reportó una Dosis Hemorrágica Mínima (DHM) de 20 μg para la especie *B. nummifer* guatemalteca, mientras que la DHM reportada para la especie de Costa Rica fue de 1.7 μg . (Díaz 1987).

En 1987 Rojas, G., *et al.* estudiaron la habilidad de un antiveneno polivalente producido en Costa Rica para neutralizar las actividades letal, hemorrágica, edematígena, proteolítica, hemolítica, hialuronidasa y fibrinolítica, del veneno de diversas especies de ofidios venenosos de Centroamérica, dentro de los cuales se encontraba el de *B. nummifer* de especímenes hondureños. Para el efecto letal de *B. nummifer* reportaron una DL_{50} de 128 $\mu\text{g/ratón}$, requiriendo para la neutralización una dosis eficaz 50% (DE_{50}) de 769 μL antiveneno/mg veneno. Para el efecto hemorrágico reportaron una DHM de 18 μg y una Dosis Eficaz Media (DE_{50}) de 157 μL antiveneno/mg veneno (Rojas G. *et al* 1987).

3.6 PRODUCCIÓN Y PURIFICACIÓN DE SUEROS ANTIOFÍDICOS

En la producción industrial de los antivenenos se llevan a cabo las siguientes etapas. La primera etapa es la obtención del veneno. Los venenos constituyen la materia prima necesaria e indispensable para la producción de los antivenenos. Se extrae el veneno individualmente de cada uno de los diferentes especímenes, se mantiene congelado y liofilizado para que no se altere su composición química (Web Site del Instituto Clodomiro Picado). El Instituto Clodomiro Picado utiliza una mezcla de partes iguales de los venenos de *Bothrops asper*, *Crotalus durissus durissus* y *Laquesis muta* obtenidos de ejemplares colectados en Costa Rica. El antiveneno Myn ® es preparado de ejemplares mexicanos de los géneros *Bothrops* y *Crotalus*.

La segunda etapa es la producción del antisuero. Esta se inicia mediante la inmunización de animales, específicamente, en caballos mayores de 3 años. Se utilizan estos por la facilidad en el manejo y los grandes volúmenes de sangre que permite obtener durante el periodo de producción. La inmunización consiste en la inyección subcutánea de una solución salina de veneno y adyuvante (potenciador de la respuesta inmune) en el dorso del caballo. Los animales son inmunizados cada 10 días con dosis crecientes de la solución, durante un periodo aproximado de 3-4 meses. Una vez que se ha completado el proceso de inmunización, y luego de las evaluaciones pertinentes que evidencian un título adecuado de anticuerpos presentes en el suero de cada uno de los animales, se realiza una sangría de producción. Esta consiste, en obtener varios litros de sangre, por punción de la vena yugular, la cual es inmediatamente colectada asépticamente en recipientes estériles que contienen un anticoagulante (Web Site del Instituto Clodomiro Picado).

La tercera etapa es el fraccionamiento del plasma equino. Aquí empieza el proceso de purificación de las globulinas equinas (anticuerpos neutralizantes) que fueron producidas por los caballos durante la inmunización. Una vez que llegan al laboratorio de fraccionamiento los envases con la sangre obtenida de los caballos, se dejan reposar a 4°C, de esta forma se separa el plasma (sobrenadante donde se encuentran las globulinas o anticuerpos, entre otras cosas) de los glóbulos rojos, los cuales son retornados a cada uno de los animales en una solución glucosada, con el fin de evitarles estados de anemia. Entonces el plasma obtenido, es separado para iniciar el proceso de fraccionamiento de los anticuerpos presentes. La purificación implica la eliminación de otras sustancias, como por ejemplo el fibrinógeno (proteína que interviene en la coagulación sanguínea) y la albúmina, entre otras (Web Site del Instituto Clodomiro Picado).

El método de purificación con sales el más empleado, consiste en mezclar el plasma con una solución de sulfato de amonio al 12 % con el propósito de precipitar y eliminar el fibrinógeno. Luego al filtrado obtenido se le efectúa una segunda precipitación con la misma sal pero a una concentración final de 24 %, con el fin de que las globulinas

precipiten; en el filtrado se queda la albúmina. De esta manera, el precipitado se reconstituye con agua y se dializa por varios días para eliminar el sulfato de amonio. Posteriormente, los anticuerpos se diluyen hasta que cada ml de suero sea capaz de neutralizar 3 ó 4 mg de veneno, en el caso del suero polivalente y de 0,5 mg para el suero anti-coral. Por último, el antiveneno es esterilizado por filtración en membranas con un poro de 0,22 micrómetros, y envasado estérilmente (Web Site del Instituto Clodomiro Picado).

El control de calidad se realiza tanto durante el proceso de purificación como al producto final envasado en ampollas de 10 ml, como lo establecen las normas sanitarias internacionales para productos biológicos de uso humano. Para cumplir con esas normas a todo producto se le realizan las siguientes determinaciones: a) Biológicas: potencia (neutralización), esterilidad (ausencia de bacterias y hongos), pirógenos, inocuidad y seguridad. b) Químicas: concentración de proteínas y de albúmina, contenido de fenol y cloruro de sodio, electroforesis y pH; y c) Físicas: presencia de partículas, turbidez y color del producto (Web Site del Instituto Clodomiro Picado).

IV. JUSTIFICACIÓN

Guatemala cuenta en su herpetofauna con 18 especies de ofidios venenosos, haciéndolo un país rico en este tipo de especímenes. A pesar de esto, sin que pueda restársele importancia, no se ha podido determinar la magnitud real del accidente ofídico. Los datos epidemiológicos reportados son inexactos e incompletos debido a que la mayoría de accidentes ofídicos ocurren en áreas rurales, alejadas de los centros de salud, haciendo difícil el seguimiento de este tipo de accidente.

Esta situación se ve agravada por el hecho que la población en el área rural sea más bien reticente a ser tratada por médicos, prefiriendo la intervención de curanderos, lo que aumenta el subregistro de los casos de mordeduras por serpientes. Por otro lado es común que las personas confundan a esta especie con otras más conocidas, como la barba amarilla. De ahí que no pueda saberse con certeza la incidencia de los accidentes causados por *Atropoides nummifer*, una de las principales especies de ofidios venenosos en Guatemala. Sin embargo la amplia distribución de la especie en el país hace suponer que la incidencia de esta especie en los accidentes ofídicos es significativa.

El veneno de *A. nummifer* ha sido poco estudiado en Centroamérica, por lo que fue necesario caracterizarlo en este estudio. A la vez, dado que los únicos antisueros disponibles en Guatemala para hacer frente al accidente ofídico, el suero mexicano Myn® de *Bioclon* y el suero polivalente costarricense ICP del Instituto Clodomiro Picado, no incluyen en su elaboración el veneno de *A. nummifer*, sino que son elaborados a partir de otras especies que pueden diferir bioquímica y antigénicamente, era necesario evaluar la capacidad real de dichos antisueros para neutralizar el veneno de la especie estudiada.

V. OBJETIVOS

5.1 Objetivo General:

- Realizar la caracterización farmacopatológica del veneno de *Atropoides nummifer* y evaluar la capacidad neutralizante de los principales efectos del veneno por diferentes sueros antiofídicos polivalentes distribuidos en Guatemala.

5.2 Objetivos Específicos:

- Determinar el efecto letal del veneno expresado como la Dosis Letal media (DL_{50}).
- Determinar la actividad hemorrágica del veneno expresada como la Dosis Hemorrágica Mínima (DHM).
- Determinar la actividad coagulante del veneno expresada como la Dosis Coagulante Mínima (DCM).
- Determinar la actividad fosfolipasa A_2 del veneno
- Evaluar la capacidad neutralizante de los efectos letal, hemorrágico, coagulante y fosfolipasa A_2 por los sueros antiofídicos distribuidos en Guatemala.

VI. MATERIALES, REACTIVOS Y MÉTODOS

6.1. UNIVERSO DE TRABAJO

- Veneno liofilizado de serpientes adultas en cautiverio de la especie *Atropoides nummifer*, subespecies *A. n. mexicanum* y *A. occiduum* (Ophidia: Viperidae Crotalinae) distribuidas en Guatemala.

6.2. MUESTRA:

- Veneno liofilizado de serpientes en cautiverio del Zoológico La Aurora y de los Museos de Historia Natural Jorge Ibarra y de la Escuela de Biología. Se utilizó la mezcla del veneno extraído de 2 ejemplares de la sub-especie *A. n. mexicanum*, y de 3 ejemplares de la sub-especie *A. n. occiduum*.

6.3. MATERIALES

Agitador magnético.

Agujas calibre 27.

Algodón.

Balanza analítica.

Baño María a 37 °C.

Beakers.

Cajas de bioterio para ratones.

Centrífuga.

Coagulómetro (*Behring Fibrintimer Ser n°:3.6 F 1219 F Labor GmbH*)

Equipo de disección.

Frasco de 1 L.

Gradillas para tubos.

Jeringas de plástico de 1 ml con agujas de 28 ^{1/2}

Marcador indeleble.
Micropipetas y puntas.
Papel parafilm.
Pipetas de 1, 2 y 5 ml
Plástico transparente.
Probetas.
Tapones de hule para tubos.
Termómetro.
Tubos de ensayo.
Tubos eppendorf.

6.4 REACTIVOS

Alcohol.
4 frascos de Antiveneno Myn® lote B-8F-01 (Exp. 06/2000)
4 frascos de Antiveneno ICP lote 3161299 LQ (Exp. 12/2000)
Azul de Timol 0,01%
Buffer 0,1 M Tris-HCl, 10 M CaCl₂ pH 8,5
Etanol al 90 %
H₂O destilada y libre de CO₂
H₂SO₄ conc.
Heptano
Isopropanol (2-propanol)
NaOH 0.018 N
Plasma humano anticoagulado con citrato de sodio (3.8g/dL)
Ratones Swiss Webster de 16 – 20 gramos de masa, del mismo lote de reproducción.
Solución salina amortiguada con fosfatos, pH 7.2 (PBS).
Tritón X-100
Yema de huevo.
Veneno liofilizado

6.4.1 OBTENCIÓN DEL VENENO.

El sistema de recolección del veneno se realizó mediante métodos que garantizaron un mínimo de pérdida de la actividad biológica de las proteínas y toxinas del veneno. Los especímenes fueron ordeñados por personal capacitado, MSc. Oscar Lara y el Br. Carlos Vásquez. Los venenos se recolectaron, inmediatamente se centrifugaron en frío para eliminar material en suspensión, y se congelaron a -70° C. Posteriormente se liofilizaron, hasta un punto en el cual la humedad residual no fuera mayor de 2 a 5 %. Para conservarlos se mantuvieron a -20° C en frascos herméticamente cerrados, con el objeto de evitar la absorción de humedad ambiental (Bolaños 1984).

6.4.2. PREPARACIÓN DE REACTIVOS

- **Solución salina amortiguada con fosfatos, pH 7.2 (PBS)**

- a) $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.31 g (2mM)
 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$... 2.86 g (8mM)
 NaCl 7.65 g (131mM)
- b) Ajustar a 1L
- c) Ajustar pH a 7.2
- d) Autoclavear 20 min. a 15 lb/pugada²

- **Sustrato para determinar actividad fosfolipasa A₂**

- a) Colocar 10 ml de yema de huevo sin burbuja en una probeta con 50 ml de buffer Tris-HCl, CaCl_2 y tritón X-100 al 1%.
- b) Homogenizar bien el sustrato.

- **Mezcla de extracción para determinar actividad fosfolipasa A₂**

Isopropanol (2-propanol).....40 partes
Heptano.....10 partes
H₂SO₄ conc.....55 µL / 100 ml

- **Mezcla de titulación para determinar actividad fosfolipasa A₂**

- a) Etanol 90% en H₂O destilada + Azul de Timol 0.01%
- b) Guardar en frasco ámbar cubierto con papel aluminio.

6.5 DISEÑO EXPERIMENTAL

Se determinaron los efectos letal, hemorrágico, coagulante y actividad fosfolipasa A₂. El estudio de la relación dosis-respuesta en las determinaciones anteriores permitió obtener la “dosis mínima” necesaria para inducir un efecto particular. Luego se incubó la “dosis reto”, un número determinado para cada neutralización de “dosis mínimas” de veneno, con diferentes volúmenes de antiveneno. Se procesaron las mezclas de veneno y antiveneno siguiendo el método de pre-incubación, que consiste en incubar la muestras durante 30 min. a 37 °C. Los ensayos de preincubación fue el método seguido en esta etapa. Este método asegura que las toxinas del veneno sean previamente neutralizadas antes de ser sometidas a evaluación (Gutierrez, et al 1990). Para evaluar las diferencias entre los valores obtenidos en cada tratamiento, se calcularon intervalos y se compararon siguiendo los siguientes criterios: ningún traslape, existe diferencia significativa entre los tratamientos; traslape, no existe diferencia significativa entre los tratamientos.

6.5.1. DETERMINACIÓN DE LOS EFECTOS TOXICOLÓGICOS DEL VENENO

A. DOSIS LETAL MEDIA (DL₅₀)

Se prepararon varios niveles con concentraciones de veneno definidas. Luego se inocularon 0.5 ml de estas soluciones a tres ratones por nivel empleando la vía intraperitoneal. Se inocularon tres ratones con PBS, los cuales sirvieron como controles negativos. Se registraron las muertes a las 48 horas y se aseguró que los ratones inoculados con PBS estuvieran vivos. Se calculó la Dosis Letal Media (DL₅₀), definida como los microgramos de veneno por gramo de masa corporal con la que se asegura la muerte del 50% de ratones en 48 horas, empleando el método de Spearman-Kärber (Gené 1987).

B. DOSIS HEMORRÁGICA MÍNIMA (DHM)

Se prepararon soluciones con diferentes concentraciones de veneno utilizando PBS como diluyente y se inyectaron 0.1 ml de cada solución por la vía intradérmica, en la región abdominal, a grupos de tres ratones. Se inoculó un grupo adicional de tres ratones con 0.1 ml de PBS sin veneno. Para determinar la actividad, dos horas después de la inyección de veneno, se sacrificaron los ratones mediante inhalación con éter, se removió la piel de la región ventral, se midió el área hemorrágica en la región interna de la piel y se determinó el diámetro de la lesión hemorrágica: $D = 2 \times (A/\pi)^{1/2}$ en donde D = diámetro, A = área. Los resultados se graficaron en una curva dosis-respuesta (μg de veneno vs mm diámetro de lesión hemorrágica) para extrapolar la Dosis Hemorrágica Mínima (DHM), definida como el número de microgramos de veneno que inducen 10 mm de diámetro en la lesión hemorrágica al cabo de dos horas (Gutiérrez *et al.* 1980; Kondo *et al.* 1960)

C. DOSIS COAGULANTE MÍNIMA (DCM)

Se obtuvo sangre humana colectada por punción venosa, se agregó la sangre a tubos con anticoagulante de citrato de sodio 3.8g/dL; una parte de solución de citrato por nueve de sangre. Luego de agitar suavemente y centrifugar la sangre a 2000 rpm durante 10 minutos, se colectó el plasma con pipeta Pasteur. Se analizaron los tiempos de coagulación del plasma a utilizar para asegurarse de que estuviera dentro de los rangos normales: TTP 25-45 segundos y TP 0.5-13.5 segundos. Se prepararon tubos conteniendo 0.2 ml de plasma y se incubaron durante 3-5 minutos a 37°C. Se agregó a los tubos con plasma 0.1 ml de soluciones conteniendo diferentes concentraciones de veneno y se determinó el tiempo de coagulación con un coagulómetro. Cada nivel de veneno se trabajó por triplicado. Se utilizaron tres controles negativos con PBS y tres positivos con la DL₅₀ para asegurar la coagulación del plasma. Los resultados se graficaron en una curva dosis-respuesta (μg de veneno vs tiempo de coagulación en segundos) para extrapolar la cantidad de veneno que coagula el plasma en 60 segundos, la cual corresponde a la Dosis Coagulante Mínima (DCM) (Gené *et al.* 1989; Theakston 1983).

D. ACTIVIDAD FOSFOLIPASA A₂

Este método tritrimético permitió medir la actividad enzimática de las fosfolipasas A₂ del veneno, por la medición de la cantidad de base (NaOH) que se consumió para neutralizar los ácidos grasos liberados de un sustrato de fosfatidilcolina (lecitina) obtenida de la yema de huevo, por la acción de las fosfolipasas A₂. Los lípidos se extrajeron usando 2-propanol, heptano y ácido sulfúrico. Los ácidos grasos libres se extrajeron en la capa de heptano y fueron cuantificados valorando la cantidad de NaOH necesaria para producir un cambio en la mezcla de titulación (azul timol) (Dole 1956).

Se vertieron en tubos de ensayo de 1 ml de sustrato + 0,1 ml de muestra (veneno a diferentes concentraciones) y se incubaron 20 min. a 37 °C. Luego se agregó a cada tubo 5 ml de mezcla de extracción (heptano, 2-propanol y ácido sulfúrico) y se agitaron con

fuerza. Se dejaron en reposo por 10 minutos a temperatura ambiente. Después se agregaron 2 ml de heptano y 3 ml de agua destilada y se invirtieron los tubos. Se tomaron 2 ml de la fase superior y se vertió 1 ml de la mezcla de titulación. Se tituló con NaOH 0,018 N hasta la aparición de un color amarillo-verdoso. El NaOH se diluyó en agua destilada libre de CO₂. Se calculó el número de miliequivalentes de NaOH 0,018 N utilizados (volumen de NaOH x [NaOH]) y se expresaron los resultados en $\mu\text{eq} / \text{mg}$ de toxina.min. Los resultados se graficaron en una curva como actividad de la fosfolipasa A₂ vs μg de veneno (Dole 1956).

6.5.2. DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD NEUTRALIZANTE DE UN ANTISUERO

A. NEUTRALIZACIÓN DE LA DOSIS LETAL MEDIA

Se prepararon mezclas que contenían una dosis reto de veneno correspondiente a 2 DL₅₀ y varias diluciones del antiveneno, asegurándose que 0.5 ml de la mezcla contuviera la dosis reto (WHO 1981). Debido a la DL₅₀ tan elevada de este veneno se utilizaron 2 DL₅₀ en la preparación de los diferentes niveles de veneno/antiveneno a probar, en lugar de utilizar 4 DL₅₀ como Dosis Reto (WHO 1981). Las diluciones de antiveneno, se realizaron a manera de obtener distintas razones μL de antiveneno/mg de veneno. Se completó el volumen correspondiente a cada nivel con PBS para obtener la concentración de veneno requerida. Se preparó un control conteniendo la misma cantidad de veneno pero sin antiveneno y un control conteniendo antiveneno sin veneno. Se incubaron los tubos con veneno/antiveneno en baños de agua a 37°C durante 30 min. Luego se inocularon grupos de 3 ratones de 18-20 gramos de masa con alícuotas de 0.5 ml de las mezclas y de los controles, empleando la vía intraperitoneal. Se observó la letalidad durante un período de 48 horas posteriores a la inoculación. Se calculó la Dosis Efectiva Media (DE₅₀), definida como el radio de μl de antiveneno / mg de veneno en la que se protege al 50% de la población de ratones inoculados, empleando el método de Spearman-Kärber (Gené 1987; WHO 1981)

B. NEUTRALIZACIÓN DE LA ACTIVIDAD HEMORRÁGICA

Se prepararon mezclas que contenían una dosis reto de veneno correspondiente a 10 Dosis Hemorrágicas Mínimas (DHM) y varias diluciones del antiveneno, asegurándose que 0.1 ml de la mezcla contuviera la dosis reto. Las diluciones de antiveneno, se realizaron de la misma manera que en el caso de la neutralización de la dosis letal. Se completaron los volúmenes correspondientes con PBS para obtener la concentración de veneno requerida. Se preparó un control conteniendo la misma cantidad de veneno pero sin antiveneno y un control conteniendo antiveneno sin veneno. Se incubaron los tubos en baños de agua a 37°C durante 30 min. Luego se inocularon grupos de 3 ratones de 18-20 gramos de masa con alícuotas de 0.1 ml de las mezclas y de los controles, empleando la vía intradérmica en la región abdominal. Se sacrificaron los ratones mediante inhalación de éter dos horas después de la inyección y se removió la piel. Se midió el área hemorrágica en la región interna de la piel y se determinó el diámetro de la lesión hemorrágica. Esta medición se determinó calcando el área hemorrágica sobre plástico transparente y luego calculando el número de cuadros de 1 mm x 1 mm inscritos en el círculo que delimitaba el área hemorrágica. ($D = 2 \times \sqrt{A/\pi}$ en donde D=diámetro, A=área). Se preparó una curva donde se graficaron en el eje de las abscisas las razones antiveneno / veneno y en el eje de las ordenadas, el diámetro de la lesión hemorrágica. Finalmente, tomando como punto de referencia el diámetro de la lesión inducida por la solución de veneno incubado sin antiveneno, se estimó la Dosis Eficaz 50% (DE₅₀), correspondiente a la razón μL de antiveneno / mg de veneno en la que el diámetro de la lesión hemorrágica disminuía en un 50 % con relación al diámetro de la lesión inducida por el veneno solo (Gutiérrez *et al.* 1985; Gutiérrez, *et al.*, 1990; Kondo *et al.*, 1960)

En el caso de la evaluación de la capacidad neutralizante de la actividad hemorrágica con el antiveneno Myn ® se trabajó con 2 DHM ya que no fue posible alcanzar una neutralización efectiva del efecto hemorrágico con 10 DHM.

C. NEUTRALIZACIÓN DE LA ACTIVIDAD COAGULANTE

Se obtuvo plasma humano colectado de la misma forma como fue descrito para la determinación de la actividad coagulante. Se prepararon mezclas que contenían una cantidad constante de veneno y varias diluciones del antiveneno, de tal manera que se obtuviera una dosis reto de veneno correspondiente a dos Dosis Coagulantes Mínimas (DCM) en 0.1 ml de la mezcla. Se agregó un volumen de diversas diluciones del antiveneno, para obtener las diferentes razones μL antiveneno / mg veneno y se incubaron 30 minutos a 37°C . Se prepararon tubos conteniendo 0.2 ml de plasma y se incubaron también durante 3-5 minutos a 37°C . Se agregaron a los tubos con plasma 0.1 ml de las diferentes mezclas de veneno/antiveneno y se determinó el tiempo de coagulación utilizando un coagulómetro. Cada nivel antiveneno/veneno se trabajó por triplicado. Se utilizaron tres controles negativos con antiveneno y tres positivos con la dosis reto de veneno. Se hizo una curva dosis-respuesta (μg de veneno vs tiempo de coagulación en segundos) y conociendo el tiempo de coagulación de los plasmas a los que se les agregó veneno sin antiveneno, se determinó la Dosis Eficaz correspondiente a la razón μL antiveneno / mg veneno que coagulaba el plasma en un tiempo correspondiente a tres veces el tiempo de coagulación del plasma al que se agregó veneno solo (Gené *et al.* 1989; Theakston 1983)

D. NEUTRALIZACIÓN DE LA ACTIVIDAD FOSFOLIPASA A_2

Se escogieron 5 niveles de antiveneno a probar y a partir de la determinación de la actividad de la fosfolipasa A_2 se escogió la cantidad mínima de veneno que inducía la mayor actividad enzimática, siendo ésta la concentración reto de veneno para neutralizar. Se prepararon las mezclas de veneno/antiveneno y se incubaron 30 min a 37°C . Con estas soluciones se repitió la operación descrita para la determinación de la actividad fosfolipasa A_2 . Se utilizaron dos tipos de controles, soluciones de antiveneno y soluciones de PBS. La actividad enzimática se expresó en $\mu\text{eq}/\text{mg}$ de veneno.min, se graficaron en una curva:

Actividad de la fosfolipasa A₂ vs μg de veneno y se determinó la Dosis Efectiva Media definida como la razón μL antiveneno /mg veneno que reduce en un 50 % la actividad enzimática inducida por el veneno (Dole, 1956).

6.5.3 TRATAMIENTO ESTADÍSTICO

Se realizaron 3 repeticiones por nivel para cada determinación y neutralización; siendo el nivel, los microgramos de veneno, en el caso de las determinaciones, o las razones μL de antiveneno/mg de veneno en el caso de las neutralizaciones. Esos datos se tabularon y graficaron, haciendo una regresión lineal para cada tratamiento con todos los datos en un mismo gráfico. De esta manera fue posible considerar la variabilidad de la respuesta debidas al tratamiento, ya sea los ratones en caso de las pruebas in vivo o el sustrato en el caso de las pruebas in vitro. La tabulación de los datos, las tendencias de las curvas y las regresiones lineales pueden ser consultadas en los Anexos 4 al 15. En cada regresión lineal se estimó el valor p para determinar su validez, encontrándose que todas las regresiones tenían un valor p inferior a 0.01. Para la determinación de la Dosis Coagulante Mínima (DCM) y la Dosis Hemorrágica Mínima (DHM), se escogió la sección de la curva en la que ésta tenía un comportamiento lineal. No se consideró la sección de la curva en la que la reacción había llegado ya a un umbral para obtener una regresión lineal más precisa. Esto se realizó ya que se trataba de reacciones enzimáticas que por el comportamiento de la reacción permitían despreciar la sección en la que agregar más veneno no iba a tener una manifestación significativa en la respuesta.

Por último se calcularon los intervalos de confianza de los efectos y de las neutralizaciones evaluadas. Los intervalos se calcularon directamente para los valores en el eje de las abscisas considerando la varianza, de la siguiente manera:

$$UPL = \bar{X} + \frac{1}{1-C^2} \left[(\hat{X} - \bar{X}) + \frac{t_{\alpha/2} S}{\hat{\beta}_1} \sqrt{\frac{n+1}{n} (1-C^2) + \frac{(\hat{X} - \bar{X})^2}{SS_{xx}}} \right]$$

$$LPL = \bar{X} + \frac{1}{1-C^2} \left[(\hat{X} - \bar{X}) - \frac{t_{\alpha/2} S}{\hat{\beta}_1} \sqrt{\frac{n+1}{n} (1-C^2) + \frac{(\hat{X} - \bar{X})^2}{SS_{xx}}} \right]$$

$$C^2 = \frac{t_{\alpha/2}^2 S^2}{\hat{\beta}_1^2 SS_{xx}}$$

Siendo respectivamente, UPL y LPL los valores superior e inferior del intervalo determinado para un valor "y" dado, \bar{X} : la media de los niveles, \hat{X} , el valor obtenido con la ecuación de regresión, $\hat{\beta}_1$ la pendiente de la curva de regresión, SS_{xx} la suma de cuadrados en "x" y S^2 la suma de cuadrados/n-2. El valor $t_{\alpha/2}$ está basado en n-2 grados de libertad (Ott L.1988).

VII. RESULTADOS

La caracterización farmacopatológica del veneno de *Atropoides nummifer*, abarcó la determinación de los efectos coagulante, hemorrágico, letal y actividad fosfolipasa A₂, así como la respectiva determinación de la capacidad de ser neutralizados con el antiveneno del Instituto Clodomiro Picado y el antiveneno mexicano Myn®.

En la Tabla No.1 pueden observarse los resultados obtenidos en cada una de las determinaciones así como las dosis eficaces que describen la capacidad neutralizante de cada uno de los antivenenos estudiados contra los efectos determinados.

Una vez calculados los intervalos de las neutralizaciones² con los antivenenos Myn® e ICP para cada efecto, se compararon entre sí. Como puede observarse en la tabla de resultados se encontró únicamente que los intervalos de las neutralizaciones del efecto coagulante se traslapaban completamente, concluyéndose que no podía establecerse diferencia significativa entre las dos neutralizaciones para dicho efecto. Los intervalos para las neutralizaciones de la actividad fosfolipasa A₂ no se traslaparon, indicando que existe diferencia significativa en la capacidad neutralizante de ese efecto. En los casos del efecto hemorrágico y el efecto letal quedaba claro que existía diferencia significativa en la capacidad neutralizante sin necesidad de tratar el caso estadísticamente. El antiveneno MYN® no fue capaz de neutralizar el efecto letal y para determinar la DE₅₀ del efecto hemorrágico con el antiveneno MYN® se requirió una dosis superior a 1000 µL de antiveneno MYN® /mg de veneno frente a 617 µL de antiveneno ICP /mg de veneno utilizando 5 veces menos de veneno, pudiéndose así afirmar que el antiveneno MYN® no neutralizó efectivamente el efecto hemorrágico.

² El método para calcular los intervalos se muestra en la metodología.

Tabla n° 1: Actividades tóxicas inducidas por el veneno de *Atropoides nummifer* de Guatemala y su neutralización con dos antivenenos.

Actividad ^b	Determinación	Neutralizaciones (Dosis Eficaces ^a)	
		ICP	MYN®
Dosis Letal *	DL ₅₀ ^c		
	353.6 µg/g (152.6 – 819.02)	707.11 ^d (305.2 – 1638.1)	N. N ^e
Hemorrágica *	DHM ^f		
	37.3 µg (15.2 – 91.0)	617.0 ^g (295.0 – 951.0)	>1000 ^h
Coagulante	DCM ⁱ		
	19.5 µg (11.1 – 27.9)	601.4 ^j (380.5 – 827.5)	738.1 (290.1 – 1222.4)
Fosfolipasa A ₂ *	20.16 ^k	762.7	2678
	µEq/mg.min	(605.3 – 922.4)	(1717.3 – 3648.8)

^a Letal: Razón µl de Antiveneno / mg de veneno con la cual la actividad letal sólo es neutralizada en un 50%. Hemorrágica: Razón µg de Antiveneno / mg de veneno en la que el diámetro de la lesión hemorrágica disminuye en un 50% con relación al diámetro de la lesión inducida con el veneno sólo. Coagulante: Razón µg de Antiveneno / mg de veneno con la cual el plasma coagula en un tiempo 3 veces superior al tiempo de coagulación con el veneno sólo. Fosfolipasa A₂: Razón µg de Antiveneno / mg de veneno con la cual la actividad fosfolipasa A₂ sólo es neutralizada en un 50%

^b Los intervalos para cada determinación y neutralización se muestran entre paréntesis.

^c Método de Spearman-Kärber. Dosis letal media: microgramos de veneno por gramo de masa corporal con la que se asegura la muerte del 50% de ratones en 48 horas.

^d Se utilizaron 2 DL₅₀ como dosis reto para las neutralizaciones con los dos antivenenos.

^e NN = No hubo neutralización.

^f DHM = Dosis Hemorrágica Mínima, dosis de veneno que provoca una lesión hemorrágica de 10 mm de diámetro

^g Dosis Reto: 10 DHM

^h Dosis Reto: 2 DHM

ⁱ Dosis Coagulante mínima = dosis de veneno que coagula el plasma en 60s

^j Dosis reto para los dos antivenenos: 2 DCM

^k Dosis de veneno que provoca la mayor actividad enzimática

* Actividades cuya neutralización fue significativamente diferente entre el ICP y el MYN®

VIII. DISCUSIÓN

Atropoides nummifer es una de las especies de ofidios venenosos que se encuentran en la región mesoamericana; se distribuye a lo largo de la vertiente Atlántica, desde San Luis Potosí hasta el Canal de Panamá (Campbell, 1998) (Cfr. Anexo 1). Se han identificado dos subespecies de *Atropoides nummifer* en Guatemala, *A.n.mexicanum* distribuida en la vertiente Atlántica y *A.n. occiduum*, distribuida en la vertiente Pacífica. De ahí que se hayan considerado estas dos subespecies para obtener la mezcla del veneno estudiado. Como en el resto de Centroamérica, *Atropoides nummifer* se encuentra ampliamente distribuida en Guatemala por lo que se supone interviene significativamente en el accidente ofídico (Cfr. Anexo 1).

Para el tratamiento del accidente ofídico en Guatemala, se encuentran disponibles dos antivenenos polivalentes, uno de elaboración mexicana (Antiveneno Myn®), y otro de elaboración costarricense, el Antiveneno del Instituto Clodomiro Picado (ICP). Sin embargo en ninguno de estos dos antivenenos se ha incluido el veneno de *A. nummifer* en el procedimiento para su elaboración. Por eso fue importante evaluar la capacidad neutralizante de estos dos antivenenos contra el veneno de *A. nummifer* de Guatemala.

En la primera fase del estudio se identificó que el veneno de *A. nummifer* presentaba los efectos letal, coagulante, hemorrágico, y actividad fosfolipasa A₂; todos estos efectos, característicos a los reportados para el resto de vipéridos (Campbell 1989). Sin embargo, al comparar la dosis letal media (DL₅₀) y el efecto hemorrágico de *A. nummifer* de Guatemala con individuos de la misma especie de Honduras, se encontró que la especie guatemalteca presenta una menor actividad letal y actividad hemorrágica que la de Honduras (Cfr. Anexo 18).

Una apreciación global de los efectos farmacológicos del veneno de *A. nummifer* caracterizados en este estudio denota una clara diferencia en la toxicidad respecto a

venenos de otras especies de ofidios venenosos de la misma familia, como el de *Crotalus durissus* o el de *Bothrops asper* de la región guatemalteca. La DL_{50} de *A. nummifer* fue superior a la DL_{50} de *B. asper* (Saravia-Otten *et al.* 2000) (Cfr. Anexo 17) y a la de *C. durissus* (Guevara, 2000) (Cfr. Anexo 16), lo que significa que el veneno de *A. nummifer* es menos letal que el de las otras especies.

La actividad fosfolipasa A_2 determinada para *A. nummifer* resultó ser más elevada que la de *C. d. durissus* y ligeramente inferior a la reportada para *B. asper* (Cfr. Anexos 16 y 17) siendo esta actividad la más importante encontrada en el veneno de la especie estudiada. La actividad fosfolipasa A_2 es una característica importante de los venenos de ofidios, y está vinculada a otros efectos como el miotóxico, cardiotóxico, hemorrágico, hemolítico, edematígeno, y agregación de plaquetas, entre otros (Harris 1991). Las fosfolipasas A_2 actúan hidrolíticamente lisando las membranas de eritrocitos y otras células (Kitchens, *et al* 1987; Harris 1991). Es por eso que a pesar de la letalidad relativamente moderada de esta especie en comparación con la de las otras especies antes mencionadas, los efectos del veneno de *A. nummifer*, puedan manifestarse con más énfasis en daños locales con secuelas secundarias, que no deben por eso ser subestimadas ya que son generalmente causa de impedimentos físicos importantes sobretodo en la población juvenil.

La determinación de los efectos letal, coagulante, hemorrágico y actividad fosfolipasa A_2 permitieron determinar las diferentes dosis reto utilizadas para poder evaluar la capacidad neutralizante de los dos antivenenos estudiados.

Al evaluar las neutralizaciones de los efectos descritos anteriormente, no se encontraron diferencias significativas en la neutralización del efecto coagulante del veneno de *A. nummifer* de Guatemala con el antiveneno del ICP y con el antiveneno Myn®. No obstante, fue posible apreciar diferencias significativas en la capacidad neutralizante de la DL_{50} , la actividad hemorrágica y la actividad fosfolipasa A_2 .

En efecto el antiveneno ICP resultó ser más efectivo para la neutralización de la actividad fosfolipasa A₂ y el único efectivo para neutralizar la actividad hemorrágica y la toxicidad letal media (Cfr. Tabla nº1).

Si consideramos que la capacidad neutralizante de un antiveneno está dada por la especificidad del reconocimiento antígeno-anticuerpo y que dicha especificidad depende de las características del veneno a partir del cual fueron producidos los anticuerpos, es muy probable que el origen de las diferencias en las capacidades neutralizantes sean consecuencia de las características del veneno de los especímenes utilizados para elaborar el antiveneno. En apoyo a esto se ha reportado que venenos de individuos de la misma especie pero de regiones geográficas diferentes muestran variaciones en la composición proteica. Esto reflejaría la selección de diferentes toxinas para que las serpientes puedan alimentarse de diferentes tipos de presas (Daltry et al., 1996). Considerando estos hechos y la presencia de una barrera ecológica entre Costa Rica y Nicaragua, podía esperarse que las especies de ofidios de Costa Rica mostraran ciertas diferencias en la composición proteica de los venenos que se manifestara en una menor capacidad neutralizante del antiveneno ICP contra el veneno de *A. nummifer*. Sin embargo los resultados obtenidos reflejan una neutralización efectiva contra los efectos con el antiveneno del ICP. Esto sugiere que los epitopos más importantes de las toxinas que conforman el veneno de *A. nummifer* son reconocidos efectivamente por los anticuerpos del antiveneno producido a partir de víperidos costarricenses, y que, por lo tanto existen regiones comunes conservadas dentro del proceso evolutivo que son reconocidos por este antiveneno.

Respecto a las neutralizaciones estudiadas con el antiveneno MYN® es significativo hacer notar que fue ineficaz para inhibir la actividad hemorrágica, y sobretodo la actividad letal del veneno de la mano de piedra.

La caracterización farmacopatológica del veneno de *A. nummifer* permitió situar su toxicidad y letalidad frente a otros venenos de serpientes de la familia Viperidae dentro de Guatemala, apareciendo como un veneno menos letal y menos hemorrágico que el de *C.*

durissus o *B. asper*. Sin embargo la actividad fosfolipasa A₂ fue la actividad más importante encontrada en el veneno estudiado. Finalmente, haciendo un balance de los resultados obtenidos, el antiveneno del ICP neutralizó mejor la actividad fosfolipasa A₂, y neutralizó efectivamente el efecto hemorrágico y la dosis letal media. Dada la importancia de los efectos hemorrágicos y de la actividad fosfolipasa A₂ en el desarrollo de secuelas secundarias como se indicó anteriormente y que no se detectó la neutralización eficaz del efecto letal con el antiveneno MYN®, se recomienda utilizar el antiveneno producido en Costa Rica para tratar el accidente ofídico provocado por *A. nummifer*.

IX. CONCLUSIONES

El veneno de *Atropoides nummifer* presenta los efectos locales y sistémicos característicos de los especímenes de la familia Viperidae

La actividad fosfolipasa A₂ fue el efecto más importante encontrado en el veneno de *Atropoides nummifer*.

El veneno de *Atropoides nummifer* es menos letal, menos coagulante y menos hemorrágico que el veneno de *B. asper* y *Crotalus durissus*, de Guatemala.

El antiveneno del ICP resultó ser más efectivo que el antiveneno MYN ® para la neutralización de la actividad fosfolipasa A₂. Es importante subrayar que se requirió un volumen considerable de este último antiveneno para neutralizar la dosis eficaz media establecida para este efecto.

El antiveneno MYN ® no neutralizó la dosis letal media del veneno estudiado, así como el efecto hemorrágico.

X.RECOMENDACIONES

Utilizar el antiveneno del ICP para tratar el accidente ofídico provocado por *Atropoides nummifer* de Guatemala.

En vista a los resultados obtenidos, incluir el veneno de *Atropoides nummifer* en la mezcla de venenos para elaborar los antivenenos MYN® podría mejorar su capacidad neutralizante hacia ese veneno.

Estudiar las diferencias farmacológicas entre las subespecies de *Atropoides nummifer* y evaluar la capacidad neutralizante de los antivenenos MYN® e ICP entre esas mismas subespecies.

Divulgar las conclusiones de este estudio en los centros de salud y hospitales con el fin de mejorar el tratamiento del accidente ofídico provocado por *Atropoides nummifer*.

IX REFERENCIAS

1. Alape-Girón, A., 1997 Immunochemical, biochemical and evolutionary studies on *Micrurus nigrocintus nigrocintus* venom toxins, Mikrobioloiskt och Tumorbilologiskt Centrum (MTC) Karolinska Institutet, Stockholm.
2. Arroyo O., Gutiérrez J.M., Rojas, G., 2000 Epidemiología del Accidente Ofídico en Costa Rica simposio Internacional: El envenenamiento Ofídico: un problema de Salud Pública en Latinoamérica. XXX Aniversario del Instituto Clodomiro Picado, UCR.
3. Barrett, A.J., 1986 The clases of proteolytic enzymes, Plant Proteolytic Enzymes, Dalling MJ Ed, Boca Raon, CRC Press 1, USA.
4. Bieber, A.L., 1979 Metal and nonprotein constituents in snake venoms Snake Venoms Ed. Berlin Springer, USA.
5. Bolaños R., 1984 Serpientes, venenos y ofidismo en Centroamérica., Editorial Universidad de Costa Rica. Costa Rica.
6. Campbell, J.A., Lamar, W., 1989 The venomous Reptiles of latin America Cornell University Press. USA
7. Cerdas Fallas, 1985, El Ofidismo en Centroamérica y el papel del Biólogo en la salud tropical *In* Primer Congreso Nacional de Biología. Memorias. Editado por JC. Godoy Ciudad Guatemala, Guatemala, EB-USAC, AGHN, CQFQ, DB-UDV.
8. Chalí Gómez. 1994 Estudio Clínico, Antropológico y Epidemiológico, realizado en la Región Norte del Departamento de El Quiché. 1 de enero de 1987 al 3 de diciembre de 1992, Guatemala. Tesis Médico y Cirujano. USAC.

9. Chippaux, JP., Williams, V., White, J., 1991 Snake venom variability: methods of study, results and interpretation, *Toxicon*, 29,1279.
10. Daltry, J.C. *et al* 1996 Diet and snake venom evolution. *Nature*, 379, 537-540.
11. Desiderio Carrillo. 1994 Estudio Clínico, Antropológico y Epidemiológico, realizado en la Región Occidental del Departamento de Huehuetenango. 1 de enero de 1987 al 3 de diciembre de 1992, Guatemala. Tesis Médico y Cirujano. USAC.
12. Díaz C., *et al* Isolation and Characterization of Basic Myotoxic Phospholipases A₂ from *Bothrops godmani* Snake Venom Arch. Of Bioch.Biophy. Vol 298 N.1 october pp.135-142 1992
13. Diaz Lara E.L., 1987 Efectos hemorrágicos y mionecróticos de los venenos de serpientes guatemaltecas de las especies Bothrops asper Garman 1883 y Bothrops nummifer mexicanus. Dumeril Birbon & Dumeril (Ophidia: Viperidae Crotalinae) USAC Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. Tesis presentada para optar al título de Licenciado en Biología.
14. Dole VP, A relation between non-esterified fatty acids in plasma and the metabolism of glucose. *Journal of Clinical Investigation* 1956; 35:150-154.
15. Gené, JA.; Robles, A.1987 Determinación de la dosis letal media por el método de Spearman-Karber. *Revista Médica del Hospital Nacional de Niños*. Costa Rica 22, 35-40.
16. Gené, J. A., Roy, A., Rojas, G., Gutiérrez, J.M. y Cerdas, L. 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.

17. González Cutzal. 1994 Estudio Clínico, Antropológico y Epidemiológico, realizado en la Región Sur del Departamento de Huehuetenango. 1 de enero de 1987 al 3 de diciembre de 1992, Guatemala. Tesis Médico y Cirujano. USAC.
18. Guevara, C., 2000 Caracterización toxicológica del veneno de la serpiente de cascabel (*Crotalus durissus durissus* Lineaeus 1758, Viperidae) y evaluación de la potencia neutralizante de los sueros antiofídicos disponibles en Guatemala. Informe de Tesis de Biólogo. USAC, Guatemala.
19. Gutiérrez, J.M., 1995 Clinical toxicology of snake bite in Central America IN Hand book of clinical toxicology of animal venoms and poisons Meyer J. and With J. Eds. CRC Press.
20. Gutiérrez, J.M., Arroyo, O. Y Bolaños, R. 1980 Mionecrosis, hemorragia y edema inducidos por el veneno de *Bothrops asper* en ratón blanco. *Toxicon* 18:603-610.
21. Gutiérrez, J. M., Gené, J.A., Rojas, G. Y Cerdas, L. 1985 Neutralization of proteolytic and hemorrhagic activities of Costa Rica snake venoms by a polyvalent antivenom. *Toxicon* 23:887-893
22. Gutiérrez, J.M., Rojas, G. Lomonte, B., J.A. y Chaves F. 1990 La evaluación de la capacidad neutralizante de los antivenenos en América. Publicación offset del Instituto Clodomiro Picado.
23. Harris, J., 1991 Phospholipases in snake venom and their effects on nerve and muscle, in *Snake Toxins*, Harvey, A.L., Ed. Pergamon Press, Oxford.
24. Kitchens, C.S., et al 1987 Severe myonecrosis in a fatal case of envenomation by the canebrake rattlesnake (*Crotalus horridus atricaudatus*) *Toxicon*, 25,455.

25. Kochva, E., Groves, J.D., 1966 The venom gland of *Vipera palestinae* with comments on the glands of some other viperines, Acta. Anat., 62, 365.
26. Kondo, H., Kondo, S., Ikewaza, Y., Murata, R. Y Ohsaka, A.1960 Studies on the quantitative method for the determination of hemorrhagic activity of Habu snake venom. Japan. J. Med. Sci. Biol. 13:43-51
27. López Santizo. 1994 Estudio Clínico, Antropológico y Epidemiológico, realizado en las Regiones Sur Occidente y Occidente del Departamento de El Quiché. 1 de enero de 1987 al 3 de diciembre de 1992, Guatemala. Tesis Médico y Cirujano. USAC.
28. Low, B.W., Corfield P.W.R. Acetylcholine receptor a-toxin bindin site –theoretical and model studies., AsiaPacific J. Pharmacol., 2, 115.
29. Ménez A., 1987 Les serpents venimeux La Recherche 190 (18) Jul-Ag.887-893
30. Meier, J., 1986 Individual and age-dependent variations in the venom of the fer-de-lance (*Bothrops atrox*), Toxicon, 24, 395.
31. Minton, S.A., Winstein, S.A., 1986 Geographic and ontogenic variation in venom of the western diamondback rattlesnake (*Crotalus atrox*) Toxicon, 24, 71.
32. Monroy E.M. 1994 Estudio Clínico, Antropológico y Epidemiológico, realizado en la Región Nor-Oriente del Departamento de Huehuetenango. 1 de enero de 1987 al 3 de diciembre de 1992, Guatemala. Tesis Médico y Cirujano. USAC.
33. Nakada, K., Nakada, F.,Ito, E.e Inoue, F. 1984 Quantification of myonecrosis and comparison of necrotic activity of snake venoms by determination of creatine phosphokinase activity in mice sera. Toxicon 22:921-930.

34. Ott, L., 1988, An introduction to statistical methods and data analysis, 3^oed. Merrell Daw Research Institute PWS-KENT Publishing Company. USA.
35. Overall Ibarra C.P., 1987 Toxicidad de los venenos de Bothrops asper y Bothrops nummifer de Guatemala en ratón blanco Universidad de San Carlos de Guatemala Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. Tesis presentada para optar al título de Licenciado en Química Farmacéutica.
36. Ownby, C. 1990 Locally acting agents: myotoxins, hemorrhagic toxins and dermonecrotic factors. Handbook of Toxinology, Marcel Decker, New York
37. Pérez López A.E. 1994 Estudio Clínico, Antropológico y Epidemiológico, realizado en el Departamento de Quetzaltenango. 1 de enero de 1987 al 3 de diciembre de 1992, Guatemala. Tesis Médico y Cirujano. USAC.
38. Porres Rodas E.E. 1994 Estudio Clínico, Antropológico y Epidemiológico, realizado en el Departamento de Suchitepéquez. 1 de enero de 1987 al 3 de diciembre de 1992, Guatemala. Tesis Médico y Cirujano. USAC.
39. Reyes Ramos J, 1994, Cuadro Clínico, y Hallazgos Anatomopatológicos en Accidente Ofídico en el Departamento de Petén. 1 de enero de 1987 al 3 de diciembre de 1992, Guatemala. Tesis Médico y Cirujano. USAC.
40. Rieppel, O., *et al.* A review of the origin of snakes Evolutionary Biology, Vol. 22, Plenum Press, New York 1988, 37.
41. Rojas G., *et al* 1987 Neutralización de las actividades tóxicas y enzimáticas de cuatro venenos de serpientes de Guatemala y Honduras por el antiveneno polivalente producido en Costa Rica. Rev.Trop., 35(1):59-67.

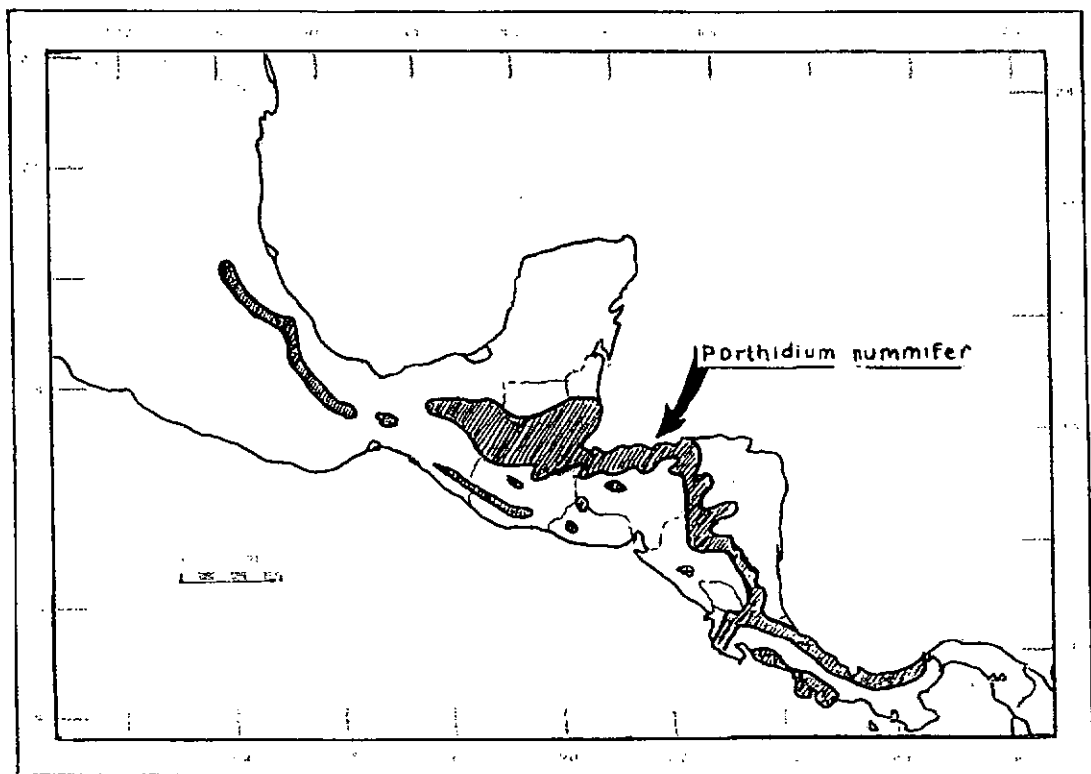
42. Rosales J.C. 1994 Estudio Clínico, Antropológico y Epidemiológico, realizado en la Región Sur del Departamento de Guatemala. 1 de enero de 1987 al 3 de diciembre de 1992, Guatemala. Tesis Médico y Cirujano. USAC.
43. Rosenberg, P., 1986 The relationships between enzymatic activity and pharmacological properties of phospholipases in natural poisons. *Natural Toxins*. Clarendon Press Oxford, 129.
44. Santamarina de León. 1994, Estudio Clínico, Antropológico y Epidemiológico, realizado en el Departamento de Retalhuleu. 1 de enero de 1987 al 3 de diciembre de 1992, Guatemala. Tesis Médico y Cirujano. USAC.
45. Saravia P., et al, The venom of *Bothrops asper* from Guatemala: toxic activities and neutralization by antivenoms. *Toxicon* 2001 Feb 1; 39 (2-3): 401-405
46. Simon Chuy. 1994, Estudio Clínico, Antropológico y Epidemiológico, realizado en la Región Nor-Oriente del Departamento de El Quiché. 1 de enero de 1987 al 3 de diciembre de 1992, Guatemala. Tesis Médico y Cirujano. USAC.
47. Taborska, E., Kornalik, F, 1985 Individual variability of *Bothros asper* venom, *Toxicon*, 23,612.
48. Theakston, R.D.G. y Reid, H.A. (1983) Development of simple standard assay procedures for the characterization of snake venoms. *Bull. World Health Organization* 61: 949-956
49. Thomas, R.g., Pough, F.H., 1979 The effect of the rattle snake venom on digestion of prey, *Toxicon* 221.

50. Valle Rivera M.L. Estudio Clínico, Antropológico y Epidemiológico, realizado en el Departamento de Jalapa. 1 de enero de 1987 al 3 de diciembre de 1992, Guatemala Noviembre de 1994. Tesis Médico y Cirujano. USAC.
51. Van den Brùle, B- 1982 Ofidios Venenosos de Guatemala, CECON Serie Documentos Ocasionales n°:2.
52. Warrell, D.A., Fenner, P.J., 1993 Venomous bites and stings. Br, Med. Bull. 49, 423-439.
53. Web Site: Instituto Clodomiro Picado. Universidad de Costa Rica. Facultad de Microbiología. <http://cariari.ucr.ac.cr>
54. Wermann, S.T., 1992 Phylogenetic relationships of Central and South American pitvipers of the genus Bothrops (sensu lato): cladistic analyses of biochemical and anatomical characters IN Biology of the Pitvipers, The Univeristy Of Texas at Arlington. USA
55. Worl Health Organization, 1981 Progress in the characterization of venoms and standarization of antivenoms WHO, Geneva.
56. Yan Sánchez. 1994, Estudio Clínico, Antropológico y Epidemiológico, realizado en el Departamento de Jutiapa. 1 de enero de 1987 al 3 de diciembre de 1992, Guatemala. Tesis Médico y Cirujano. USAC.

ANEXOS

ANEXO 1

DISTRIBUCIÓN DE *PORTHIDIUM NUMMIFER* EN MÉXICO Y CENTROAMÉRICA

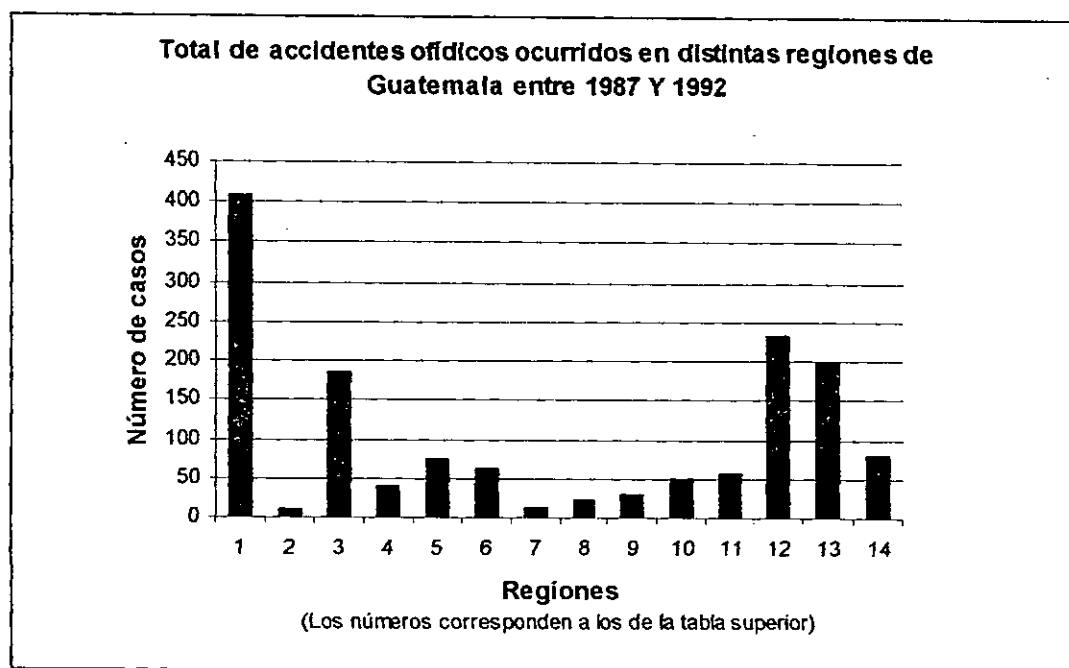


Adaptado de Campbell, J., Lamar, W., 1998 *The Venomous Reptiles of Latin America*, Comstock Publishing Associates, USA

ANEXO 2

ACCIDENTES OFIDICOS OCURRIDOS EN GUATEMALA DE 1987 A 1992¹

	REGIÓN	1987	1988	1989	1990	1991	1992 ²	Total	Hombres	Mujeres
1	Escuintla	27	60	69	58	60	63 70	407	315	92
2	Este Quiché	1	0	4	2	1	2	10	8	2
3	Norte Quiché	25	29	34	28	36	34	186	118	68
4	S. Occ. y Occ. Quiché	1	1	9	15	6	8	40	27	13
5	Jalapa	10	12	8	12	13	19	74	47	27
6	Jutiapa	7	12	11	7	10	15	62	44	18
7	Nor-Oriente Huehue.	1	2	1	3	2	3	12	5	7
8	Occ. Huehuetenango	4	0	2	7	6	4	23	15	8
9	Sur Huehuetenango	2	0	3	8	5	11	29	14	15
10	Poptún (Petén)	ND	ND	12	13	10	7 8	50	ND	ND
11	Quetzaltenango	15	4	14	14	7	4	58	34	24
12	Retalhuleu	29	44	40	40	51	29	233	151	81
13	Suchitepéquez	46	34	31	23	27	38	199	138	61
14	Depto. de Guatemala	15	11	7	9	18	18	78	59	19
	TOTAL	183	209	245	239	252	255/263	1461	652	341

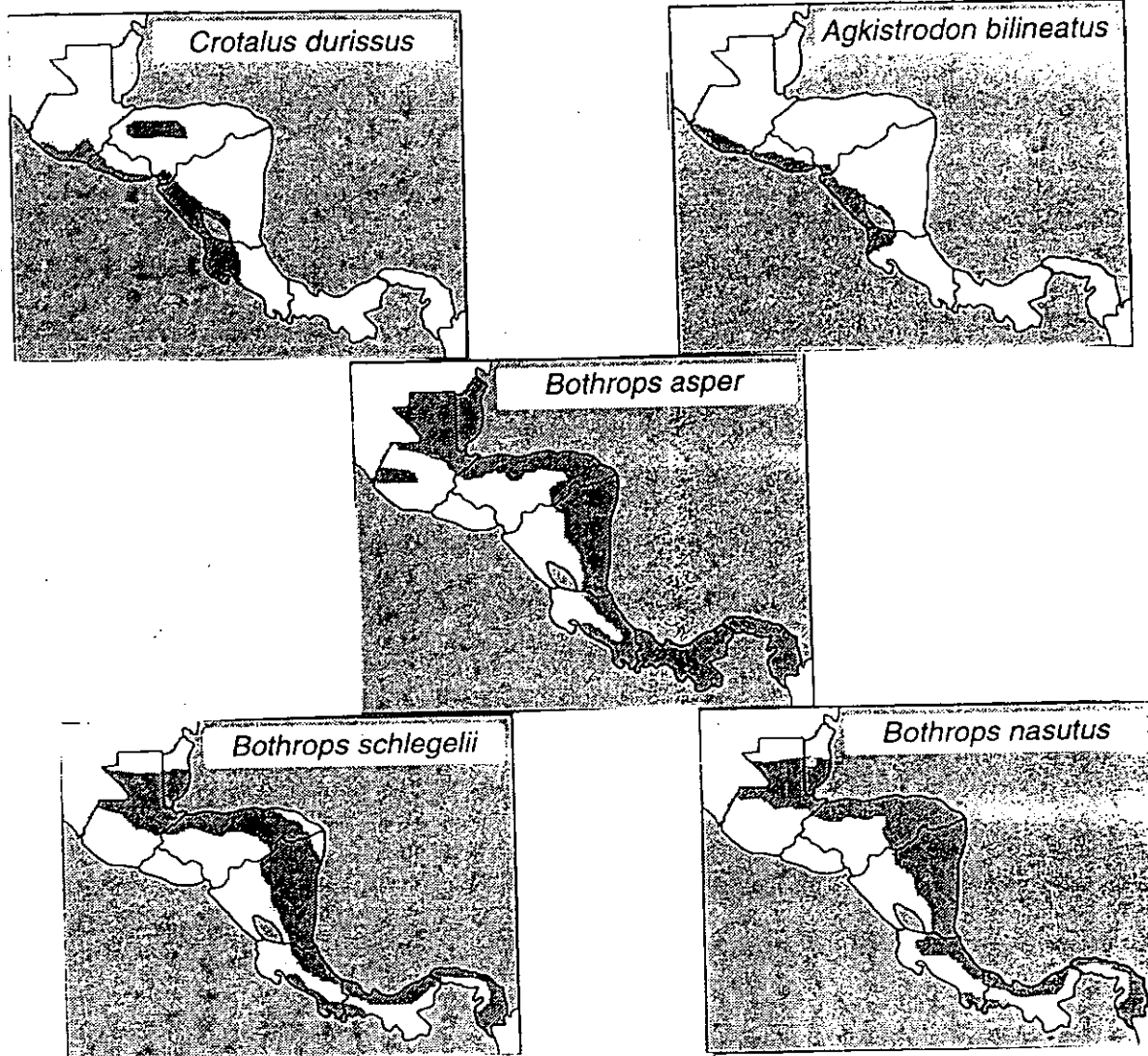


¹ Los únicos registros de accidentes ofídicos reportados en el Instituto Guatemalteco de Seguridad Social (IGSS) comprenden el periodo 1987-1992. Los datos fueron obtenidos de las tesis que se encuentran en las referencias, los cuales a su vez fueron obtenidos de las formas F-4 y F-6 de los distintos puestos de salud y hospitales correspondientes a cada región.

² Los datos a la derecha en esta columna corresponden al año 1993

ANEXO 3

MAPA: DISTRIBUCIÓN DE OTRAS ESPECIES DE VIPÉRIDOS EN CENTROAMÉRICA



Adaptado de Gutiérrez, J.M., 1995 *Clinical toxicology of snake bite in Central America* IN *Hand book of clinical toxicology of animal venoms and poisons* Meyer J. and With J. Eds. CRC Press.

ANEXO 4

DOSIS LETAL MEDIA (DL ₅₀)					
DOSIS	INDIVIDUOS / DOSIS	MUERTES A LAS 48 HORAS		INDIVIDUOS / DOSIS	MUERTES A LAS 48 HORAS
31.25	3	0			
62.5	3	0			
125	3	0			
250	3	1			
500	3	2			
1000	3	3			
2000	3	3			
4000	3	3			

PBS	3	0
-----	---	---

DL₅₀ = 353.55 µg,
 Grados de libertad: 5
 Límites de confianza del
 95 %: (152.62 - 819.02)

ANEXO 5

NEUTRALIZACIÓN DOSIS LETAL MEDIA CON MYN (Dosis Reto: 2 DL ₅₀)					
DOSIS	INDIVIDUOS / DOSIS	MUERTES A LAS 48 HORAS		INDIVIDUOS / DOSIS	MUERTES A LAS 48 HORAS
1000	3	3			
500	3	3			
250	3	3			
125	3	3			
62.5	3	3			

Veneno	3	3
Antiveneno	3	0

No hubo neutralización

ANEXO 6

NEUTRALIZACIÓN DOSIS LETAL MEDIA CON ICP (Dosis Reto: 2 DL ₅₀)					
DOSIS	INDIVIDUOS / DOSIS	MUERTES A LAS 48 HORAS		INDIVIDUOS / DOSIS	MUERTES A LAS 48 HORAS
2000	3	0			
1000	3	1			
500	3	3			
250	3	2			
125	3	3			
62.5	3	3			
veneno	3	3			
antiveneno	3	0			

Veneno	3	3
Antiveneno	3	0

Grados de libertad: 5
 Límites de confianza del 95 %: (305.24-1638.06)
 Dosis Eficaz Media = 707.11 µL de Antiveneno/mg de Veneno

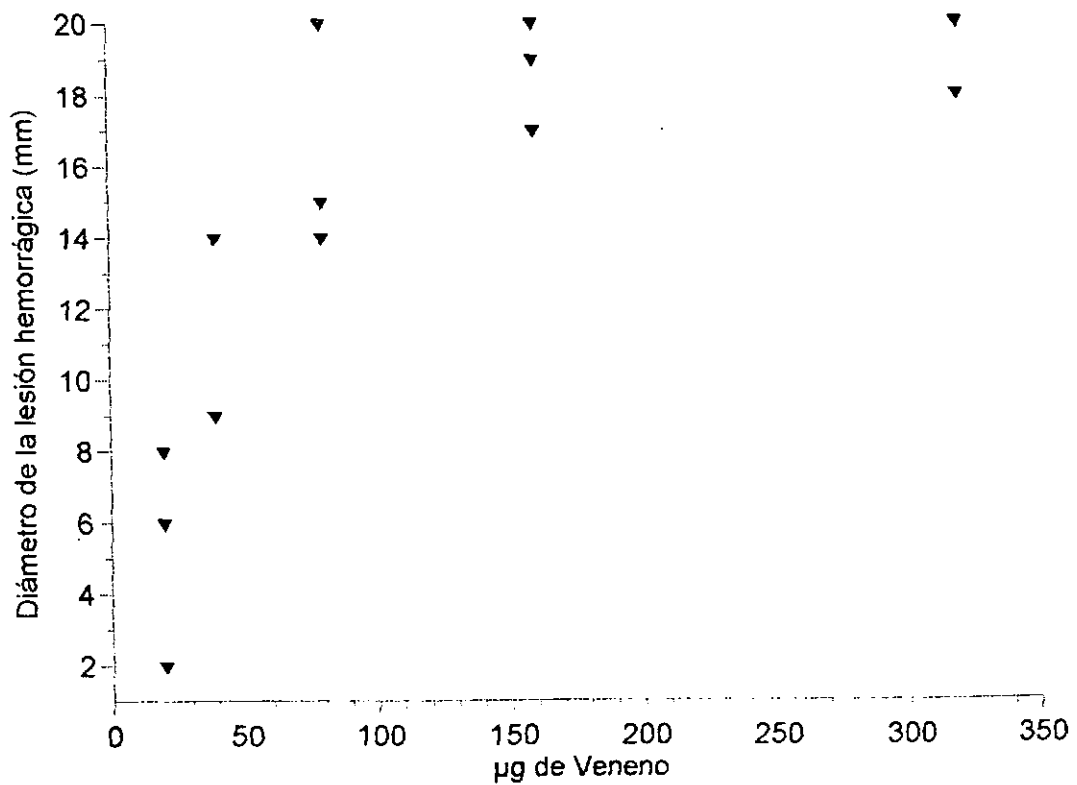
ANEXO 7a

DOSIS HEMORRÁGICA MÍNIMA (DHM)		
μg de veneno	Logaritmo natural de μg de veneno	Diámetro de la lesión (mm)
20	3.00	2
20	3.00	8
20	3.00	6
40	3.69	9
40	3.69	9
40	3.69	14
80	4.38	15
80	4.38	14
80	4.38	20
160	5.08	19
160	5.08	17
160	5.08	20
320		18
320		20

Diámetro de la lesión (mm)	
PBS	0
PBS	0
PBS	0

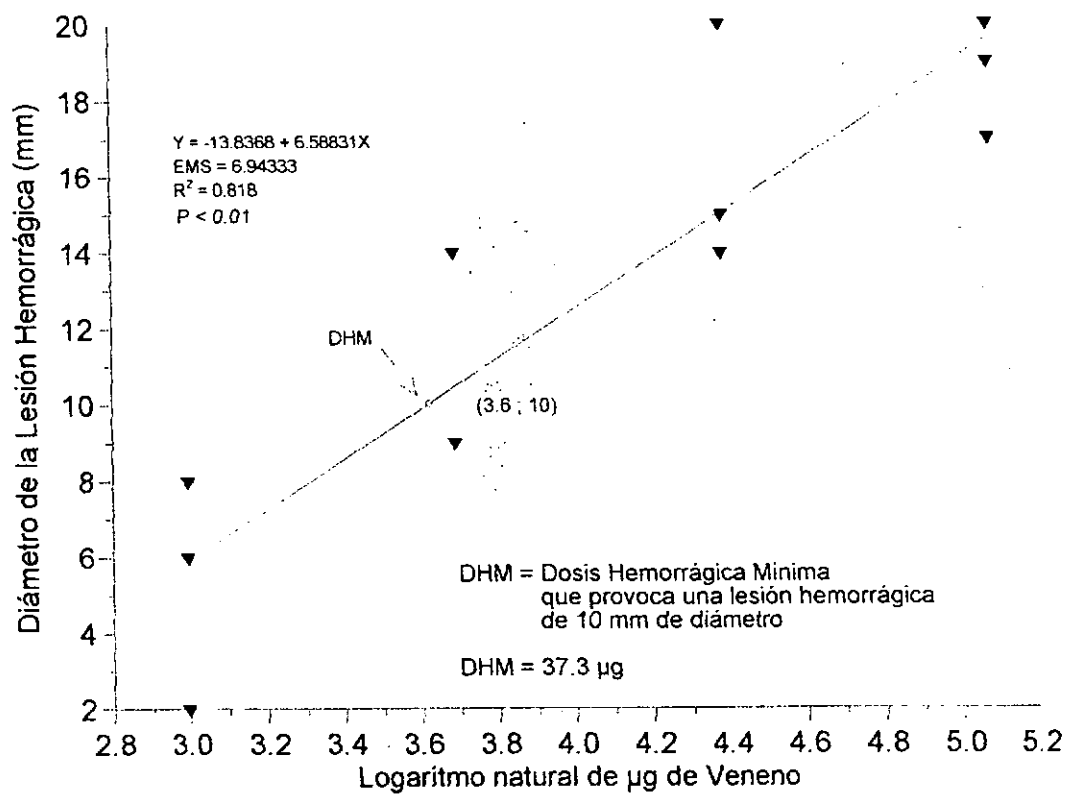
ANEXO 7b

Dosis Hemorrágica Mínima (DHM)



ANEXO 7c

Dosis Hemorrágica Mínima (DCM)



ANEXO 8a

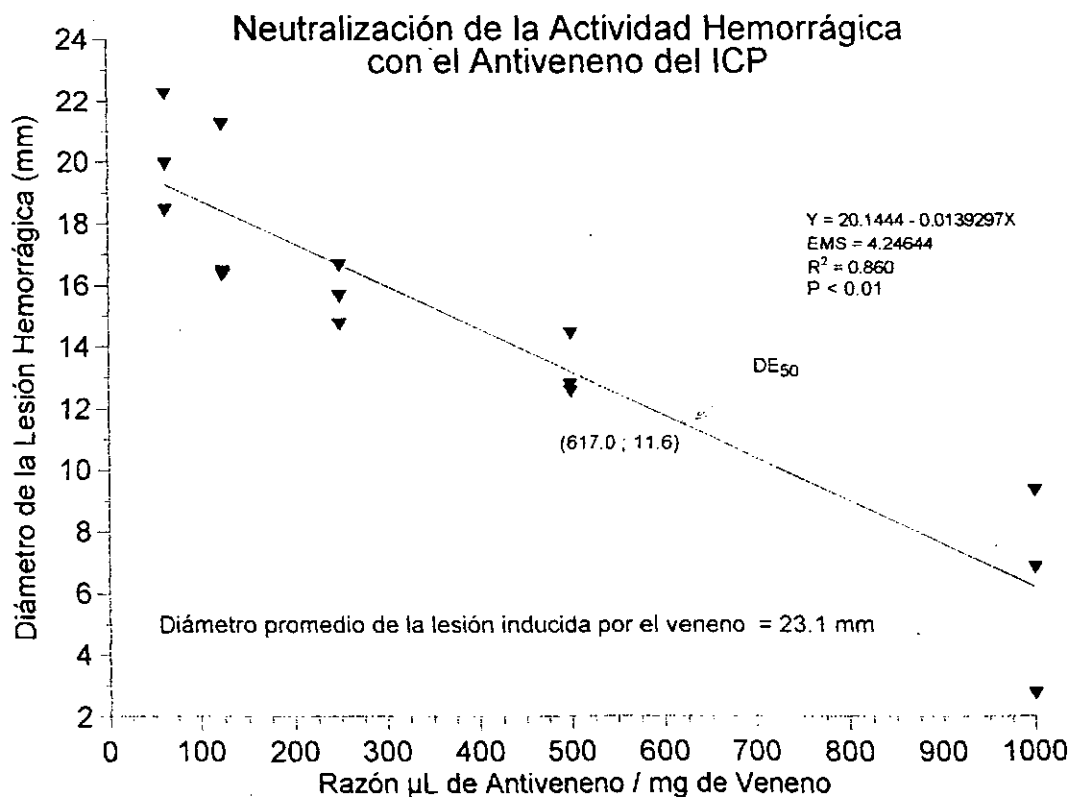
NEUTRALIZACIÓN DE LA ACTIVIDAD HEMORRÁGICA CON EL ANTIVENENO DEL ICP

Razón μ L de antiveno/mg de veneno	Diámetro de la lesión (mm)	% Neutraliz.
62.5	22.3	3.3
62.5	20.0	13.3
62.5	18.5	19.8
125	21.3	7.7
125	16.5	28.5
125	16.4	28.9
250	16.7	27.6
250	15.7	31.9
250	14.8	35.8
500	14.5	37.1
500	12.8	44.5
500	12.6	45.4
1000	9.4	59.2
1000	6.9	70.1
1000	2.8	87.9

Diámetro de la lesión (mm)	
Veneno	22.5
Veneno	22.8
Veneno	20.9
Promedio	23.1

Diámetro de la lesión (mm)	
Antiveneno	0
Antiveneno	0
Antiveneno	0

ANEXO 8b



ANEXO 9a

NEUTRALIZACIÓN DE LA ACTIVIDAD HEMORRÁGICA CON EL ANTIVENENO MYN

Razón μ L de antiveno/mg de veneno	Diámetro de la lesión (mm)	% Neutraliz.
125	17.0	25.6
125	19.7	13.5
250	16.9	26.1
250	17.9	21.6
250	17.3	24.0
500	10.2	55.4
500	16.2	28.8
500	23.7	0.0
1000	10.4	54.4
1000	16.2	28.8
2000	5.4	76.3
2000	4.8	79.0
2000	0.0	100.0

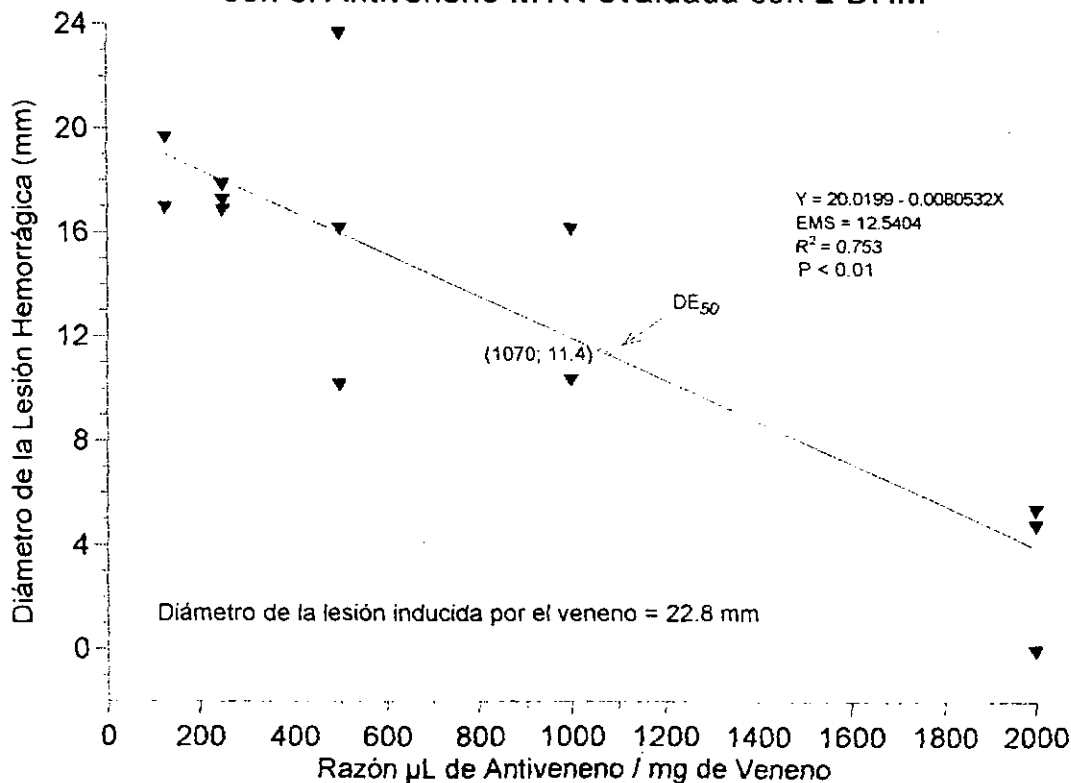
	Diámetro de la lesión (mm)
Veneno	20.2
Veneno	24.6
Veneno	23.5
Promedio	22.8

	Diámetro de la lesión (mm)
Antiveneno	0
Antiveneno	0
Antiveneno	0

Nota: Dosis reto = 2 DHM
con 10 DHM no fue posible
alcanzar la Dosis Eficaz

ANEXO 9b

Neutralización de la Actividad Hemorrágica con el Antiveneno MYN evaluada con 2 DHM



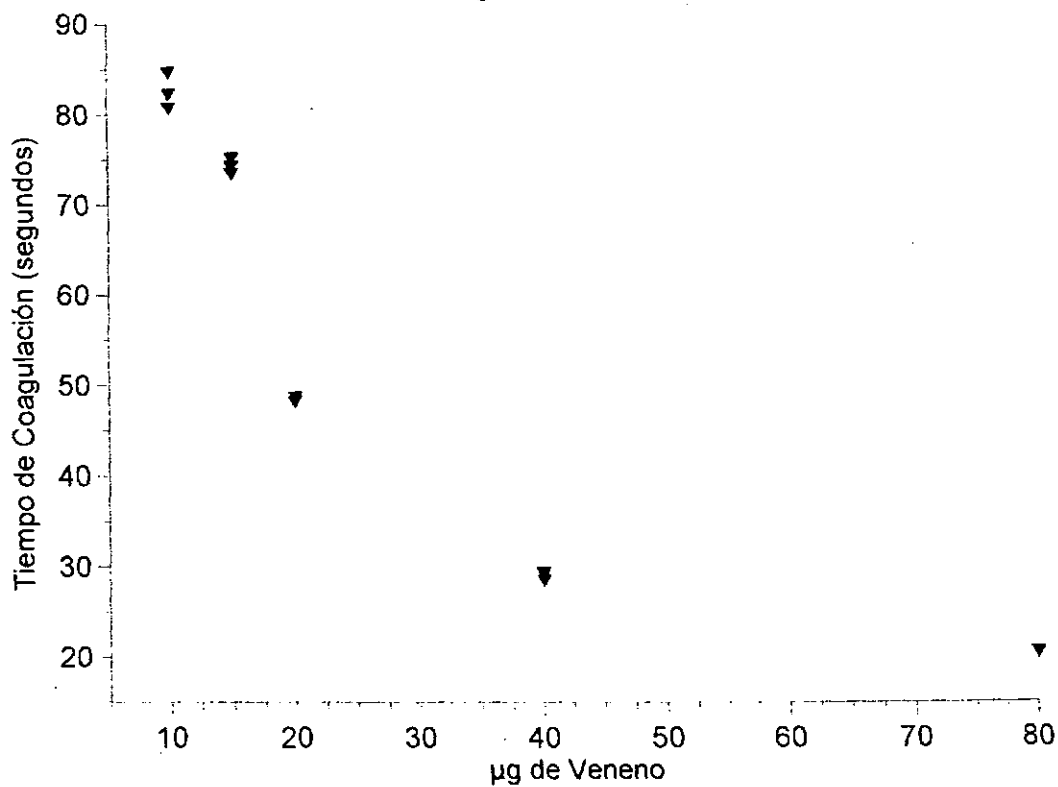
ANEXO 10a

DOSIS COAGULANTE MÍNIMA (DCM)		
Nivel	Tiempo (segundos)	Raiz cuadrada del tiempo
80	20.7	4.5
80	20.8	4.6
80	20.7	4.5
40	29.6	5.4
40	29.4	5.4
40	28.7	5.4
20	48.4	7.0
20	48.9	7.0
20	48.4	7.0
15	73.7	8.6
15	74.5	8.6
15	75.4	8.7
10	82.5	9.1
10	84.9	9.2
10	80.9	9.0

Tiempo (segundos)	
PBS	0
PBS	0
PBS	0

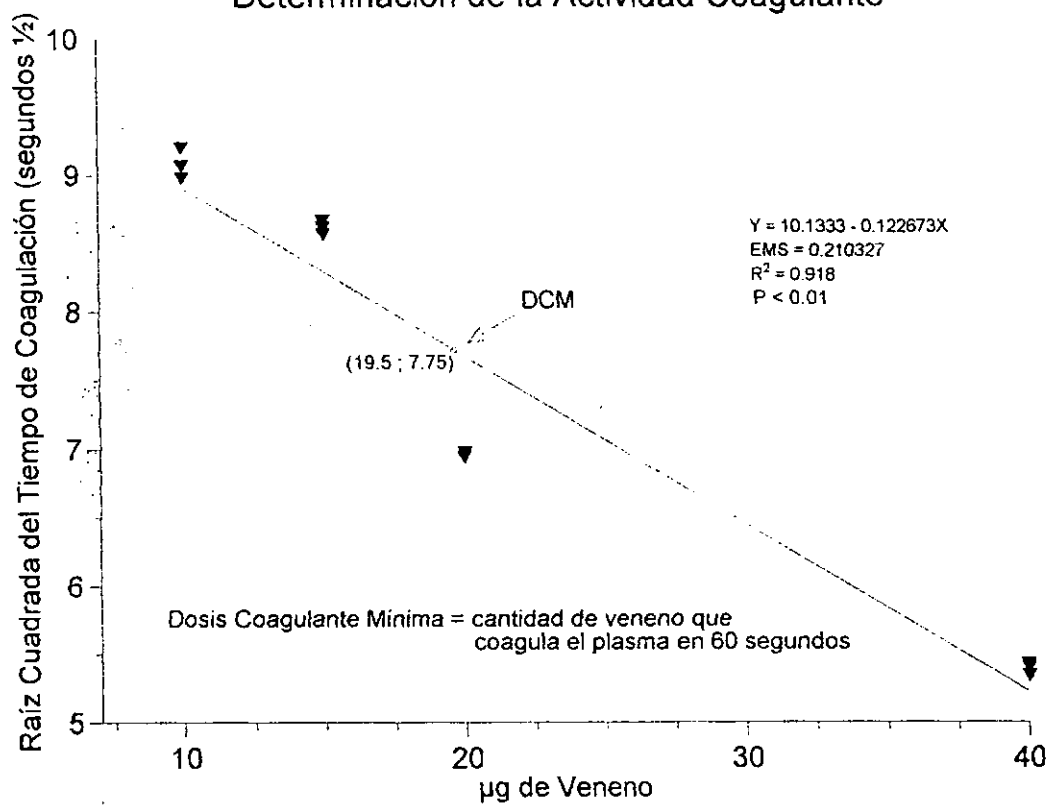
ANEXO 10b

Dosis Coagulante Mínima (DCM)



ANEXO 10c

Determinación de la Actividad Coagulante



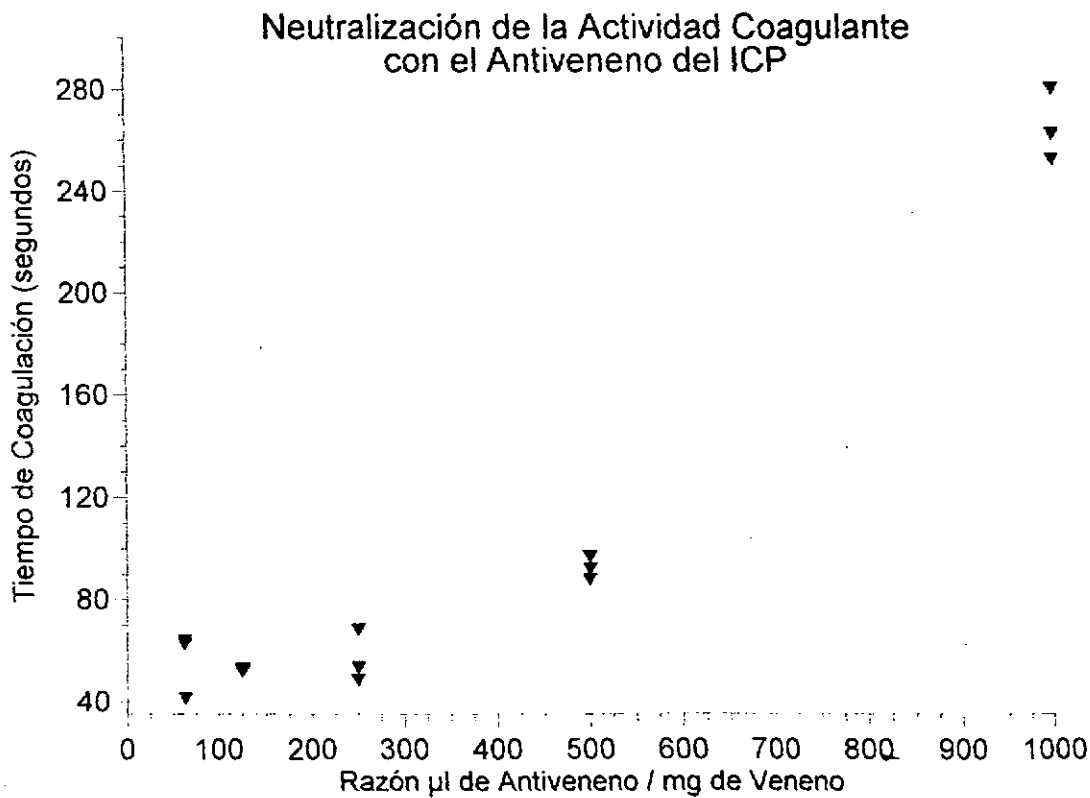
ANEXO 11a

NEUTRALIZACIÓN DE LA ACTIVIDAD COAGULANTE CON EL ANTIVENENO DEL ICP		
Razón μ L de antiveno/ mg de veneno	Tiempo (segundos)	Raíz cuadrada del tiempo
1000	253.3	15.9
1000	281.1	16.8
1000	263.2	16.2
500	97.7	9.9
500	93.0	9.6
500	88.7	9.4
250	54.4	7.4
250	69.0	8.3
250	49.3	7.0
125	53.9	7.3
125	52.6	7.3
125	53.3	7.3
62.5	63.4	8.0
62.5	64.8	8.0
62.5	42.1	6.5

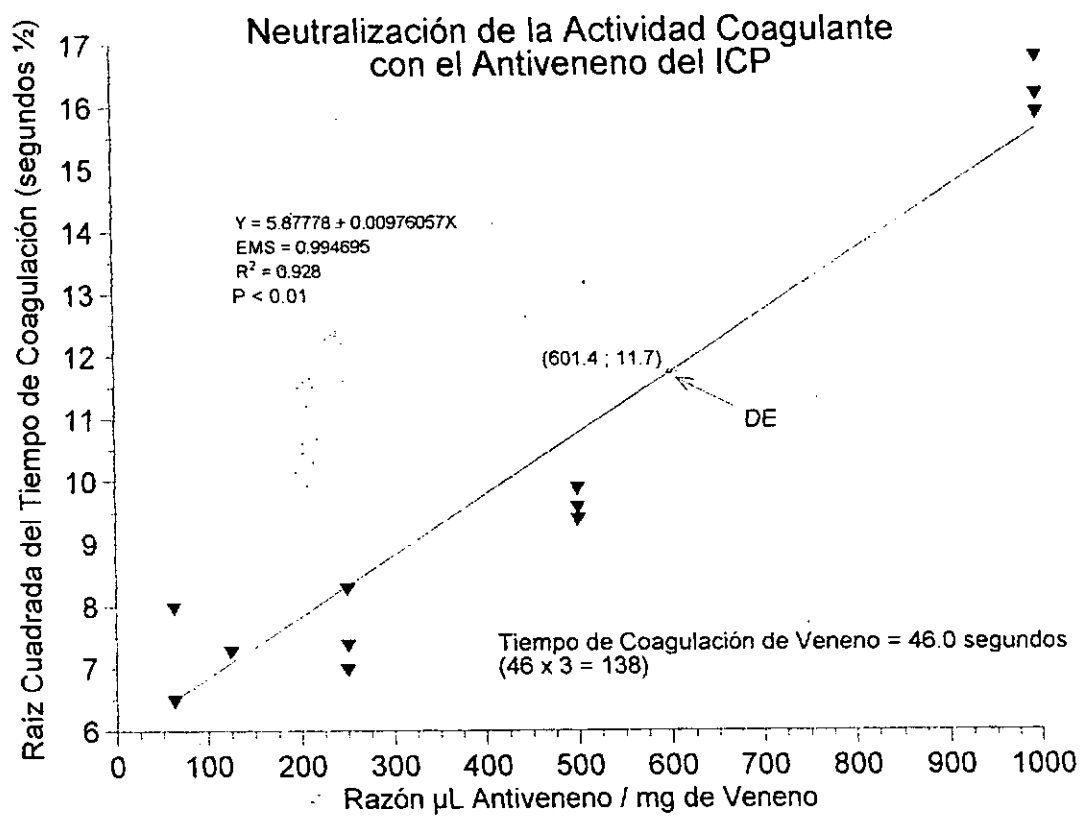
Tiempo (segundos)	
Veneno	48.0
Veneno	41.2
Veneno	48.9
Promedio	46.0

Tiempo (segundos)	
PBS	0
PBS	0
PBS	0

ANEXO 11b



ANEXO 11c



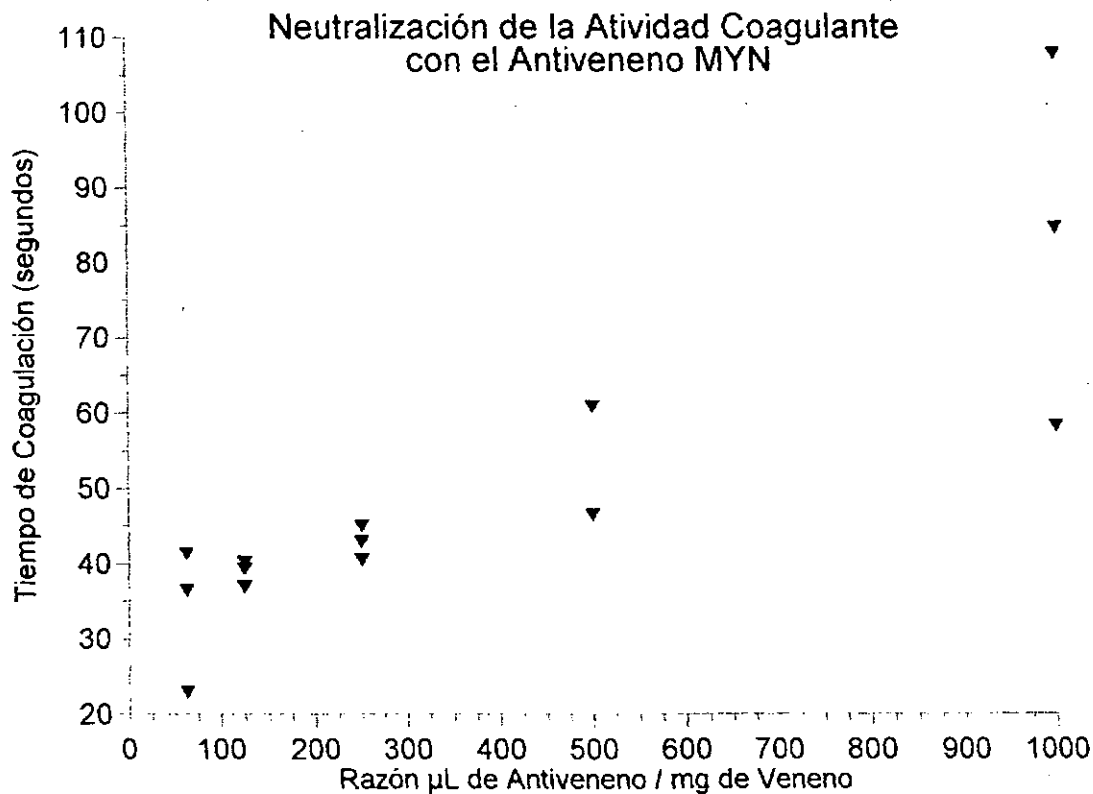
ANEXO 12a

NEUTRALIZACIÓN DE LA ACTIVIDAD COAGULANTE CON EL ANTIVENENO MYN		
Razón μ L de antiveneno/mg de veneno	Tiempo (segundos)	Raíz cuadrada del tiempo
1000	84.9	9.2
1000	58.5	7.6
1000	108.1	10.4
500	61.2	7.8
500	46.8	6.8
500	61.1	7.8
250	45.3	6.7
250	40.8	6.4
250	43.2	6.6
125	40.5	6.4
125	37.2	6.1
125	39.6	6.3
62.5	41.6	6.4
62.5	23.2	4.8
62.5	36.7	6.1

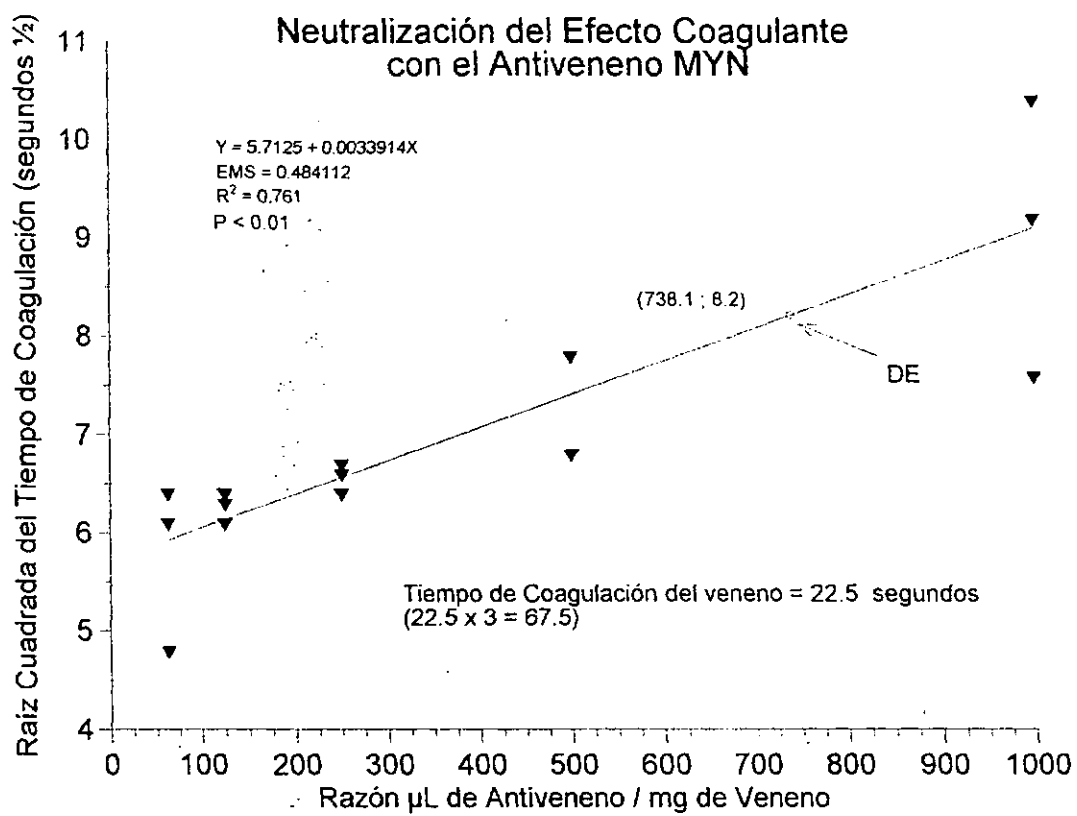
Tiempo (segundos)	
Veneno	20.7
Veneno	24.2
Promedio	22.5

Tiempo (segundos)	
PBS	0
PBS	0
PBS	0

ANEXO 12b



ANEXO 12c



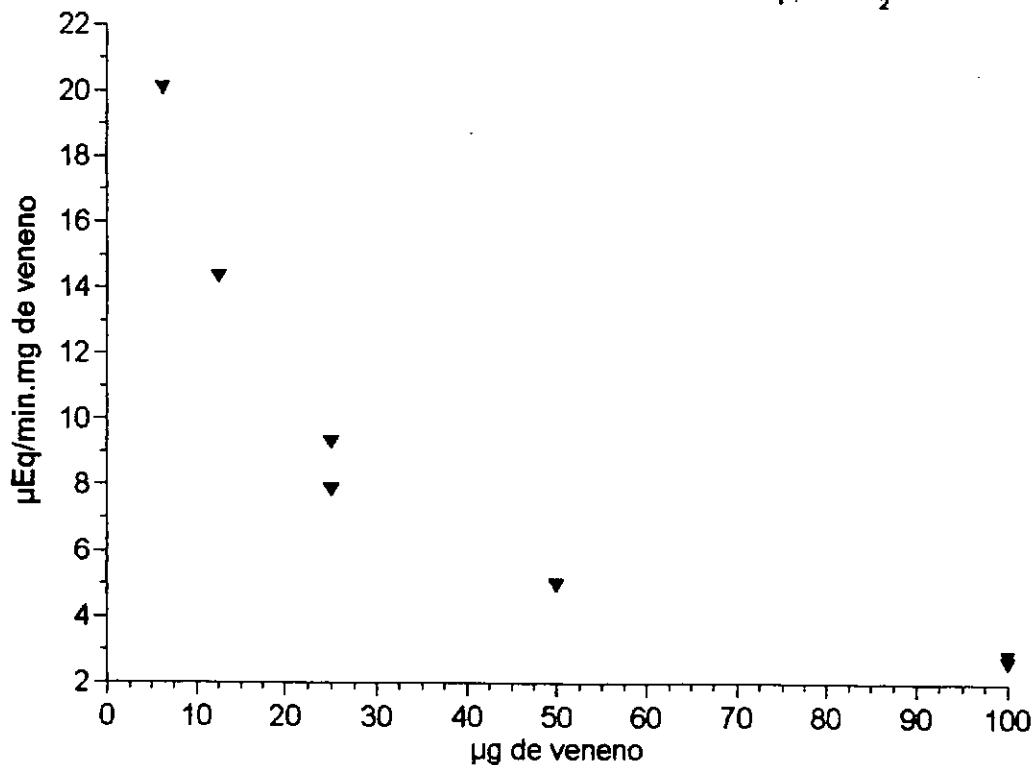
DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD FOSFOLIPASA A₂

μg de Veneno	μL de NaOH	μL de NaOH - μL de PBS	μeq/min.mg de veneno
100	400	320	2.88
100	380	300	2.70
100	380	300	2.70
50	360	280	5.04
50	360	280	5.04
50	360	280	5.04
25	340	260	9.36
25	340	260	9.36
25	300	220	7.92
12.5	280	200	14.40
12.5	280	200	14.40
12.5	280	200	14.40
6.25	220	140	20.16
6.25	220	140	20.16
6.25	220	140	20.16

	μL de NaOH
PBS	80
PBS	80
PBS	80
Promedio	80

ANEXO 13b

Determinación de la Actividad Fosfolipasa A₂



ANEXO 14a

NEUTRALIZACIÓN DE LA ACTIVIDAD FOSFOLIPASA A₂ CON EL ANTIVENENO DEL ICP

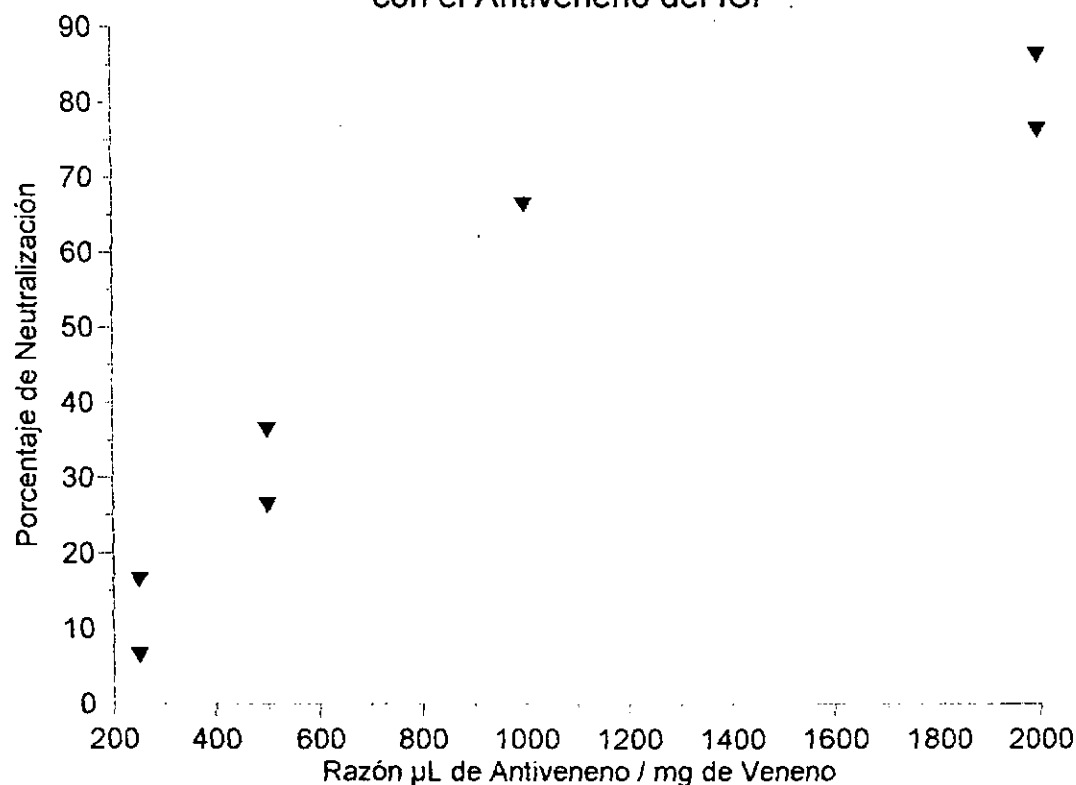
Razón μL de antiveneno/mg de veneno	μL de NaOH	μL de NaOH - μL de PBS	% Neut
2000	160	46.7	76.7
2000	140	26.7	86.7
2000	160	46.7	76.7
1000	180	66.7	66.7
1000	180	66.7	66.7
1000	180	66.7	66.7
500	240	126.7	36.7
500	240	126.7	36.7
500	260	146.7	26.7
250	300	186.7	6.7
250	300	186.7	6.7
250	280	166.7	16.7

	μL de NaOH
pbs / AV	120
pbs / AV	100
pbs / AV	120
Promedio	113.3

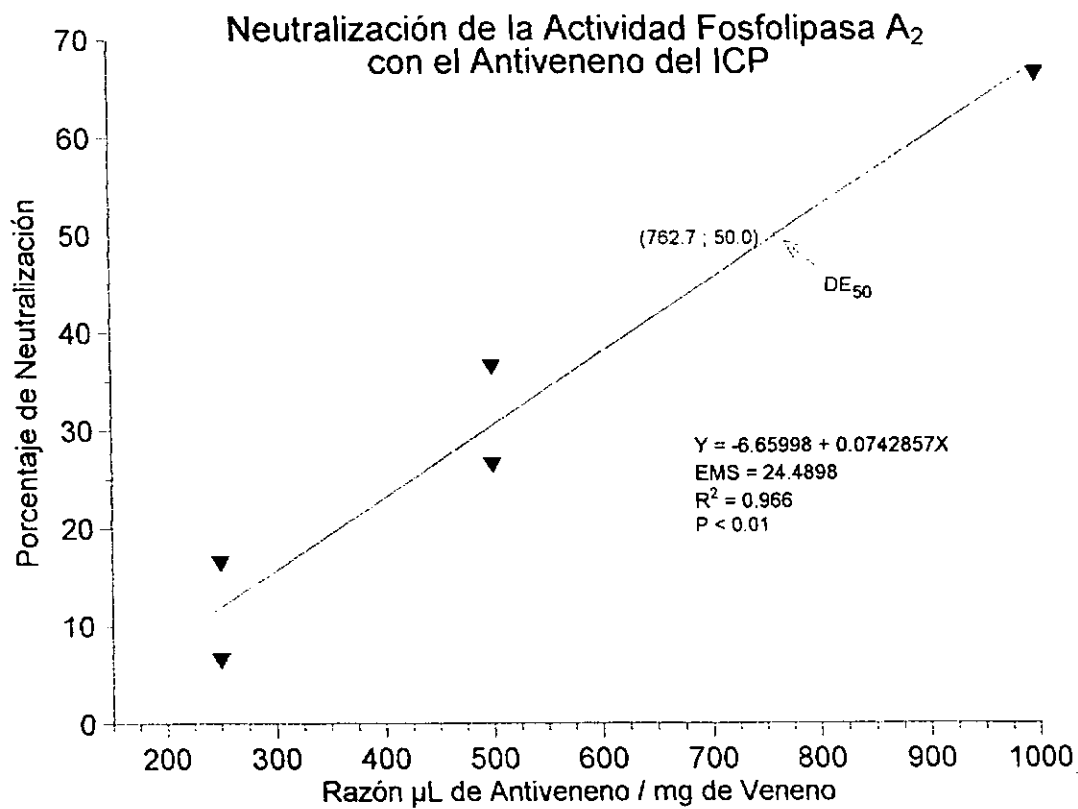
	μL de NaOH	μL de NaOH - μL de PBS
Veneno	320	206.7
Veneno	320	206.7
Veneno	300	186.7
Promedio	113	200.0

ANEXO 14b

Neutralización de la Actividad Fosfolipasa A₂ con el Antiveneno del ICP



ANEXO 14c



ANEXO 15a

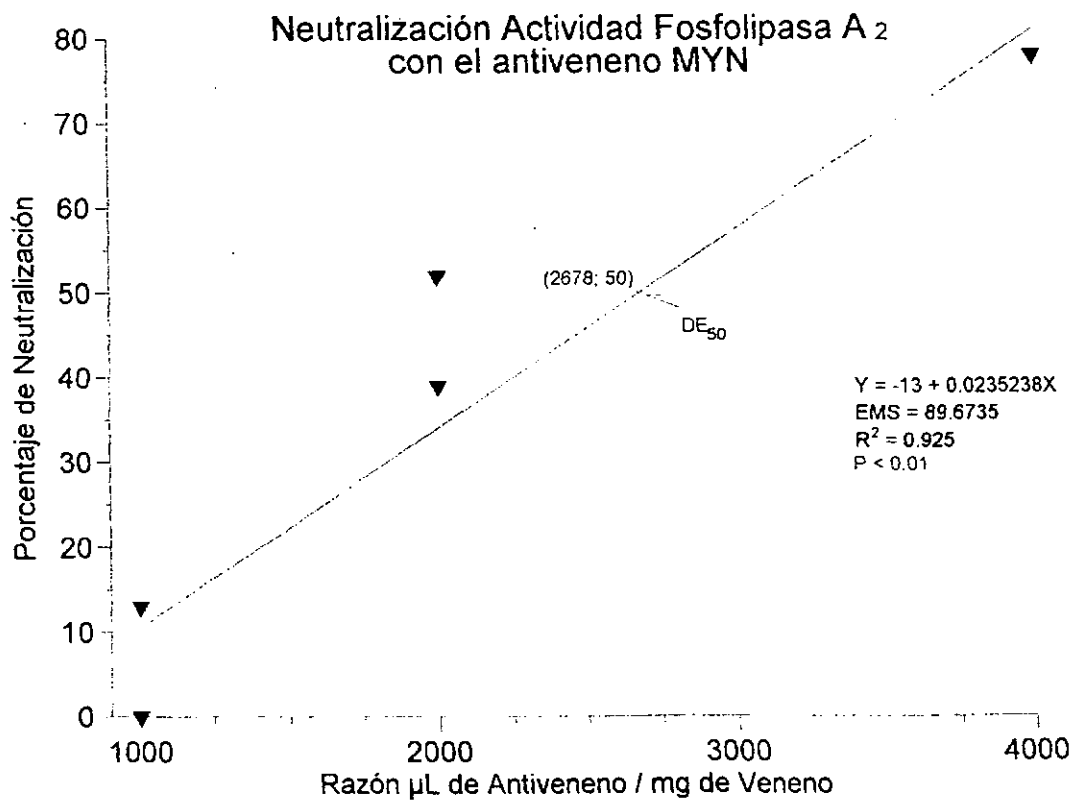
NEUTRALIZACIÓN DE LA ACTIVIDAD FOSFOLIPASA A₂ CON EL ANTIVENENO MYN

Razón μL de antiveneno/mg de veneno	μL de NaOH	μL de NaOH - μL de PBS	% Neut
4000	140	33.0	78
4000	140	33.0	78
4000	140	33.0	78
2000	180	73.0	52
2000	200	93.0	39
2000	200	93.0	39
1000	240	133.0	13
1000	260	153.0	0
1000	260	153.0	0

	μL de NaOH
pbs / AV	120
pbs / AV	100
pbs / AV	100
Promedio	106.7

	μL de NaOH	μL de NaOH - μL de PBS
Veneno	260	153.0
Veneno	260	153.0
Veneno	260	153.0
Promedio	260	153.0

ANEXO 15b



ANEXO 16

ACTIVIDADES TÓXICAS INDUCIDAS POR EL VENENO DE *Crotalus durissus durissus* DE GUATEMALA Y SU NEUTRALIZACIÓN POR DOS ANTIVENENOS (Guevara et al. 2000)

Efecto	Actividad	Neutralización (Dosis Efectiva 50%) μL de antiveneno/mg de Veneno ^a	
		Antiveneno ICP	Antiveneno MYN
Letal (DL ₅₀ ; μg/g) ^b	22.7 (8.24-60.19)	1781.8 (659.3-4815.44)	353.55 (152.62-819.02)
Hemorrágico (DHM; μg) ^c	5.08 ± 0.68	2166.61 ± 461.31	539.87 ± 16.10
Fosfolipasa A ₂ (μEq/mg.min)	11.52 ± 1.66	627.6 ± 139	678.5 ± 0
Coagulante (DCM; μg) ^d	19.58 ± 0.62	445.31 ± 18.92	157.03 ± 0.26

^a Dosis Efectiva 50%. definida como el radio de μL de antisuero/mg veneno en el que el efecto se reduce en un 50%. En el caso del coagulante la neutralización es expresada como Dosis Efectiva (Gené et al. 1989)

^b Letalidad fue determinada en ratones de 16-18 gramos por vía intraperitoneal; se incluyen los límites de confianza al 95%.

^c DHM: Dosis hemorrágica mínima: La cantidad de veneno que se necesita para inducir un área hemorrágica de 10 mm de diámetro, dos horas después de la inyección intradérmica en el ratón.

^d DCM: Dosis coagulante mínima: Cantidad de veneno que induce coagulación en plasma humano citratado en 60 segundos.

Excepto para el efecto letal, los resultados están dados en Promedio ± DE (n=3)

ANEXO 17

ACTIVIDADES TÓXICAS INDUCIDAS POR EL VENENO DE *Bothrops asper* DE GUATEMALA Y SU NEUTRALIZACIÓN POR DOS ANTIVENENOS (Saravia et al. 2000)

Efecto	Actividad	Neutralización (Dosis Efectiva 50%) μL de antiveneno/mg de Veneno ^a	
		Antiveneno ICP	Antiveneno MYN
Letal (DL ₅₀ ; μg/g) ^b	56.8 (44.5-72.4)	342 (224-465)	934 (448-1053)
Hemorrágico (DHM; μg) ^c	11.0 ± 3	175 ± 37	272 ± 38
Coagulante (DCM; μg) ^d	3.9 ± 0.08	133 ± 8	723 ± 14
Fosfolipasa A ₂ (μEq/mg.min)	24 ± 2	1268 ± 182	2352 ± 225

^a Dosis Efectiva 50%. definida como el radio de μL de antisuero/mg veneno en el que el efecto se reduce en un 50%. En el caso del coagulante la neutralización es expresada como Dosis Efectiva (Gene et al. 1989)

^b Letalidad fue determinada en ratones de 16-18 gramos por vía intraperitoneal; se incluyen los límites de confianza al 95%.

^c DHM: Dosis hemorrágica mínima: La cantidad de veneno que se necesita para inducir un área hemorrágica de 10 mm de diámetro, dos horas después de la inyección intradérmica en el ratón.

^d DCM: Dosis coagulante mínima: Cantidad de veneno que induce coagulación en plasma humano citratado en 60 segundos.

ANEXO 18

Neutralización de las actividades tóxicas y enzimáticas de cuatro venenos de serpientes de Guatemala y Honduras por el antiveneno polivalente producido en Costa Rica (Rojas 1987)

Efecto Letal de los veneno y su neutralización por el antiveneno polivalente del ICP		
	Dosis Letal 50% (μg /ratón)*	Neutralización (DE_{50}) (μL de antiveneno / mg de Veneno)**
<i>Crotalus durissus durissus</i> (Guatemala)	16	917
<i>Agkistrodon bilineatus</i> (Guatemala)	22	1075
<i>Bothrops asper</i> (Honduras)	64	333
<i>Bothrops nummifer</i> (Honduras)	128	769
* El veneno se inoculó por la vía intraperitoneal y se observaron las muertes durante 48 h. ** Razón antiveneno/veneno en la que se protege al 50% de la población de ratones inoculados		
Efecto Hemorrágico de los veneno y su neutralización por el antiveneno polivalente del ICP		
	Dosis Hemorrágica Mínima 8 μg)*	Neutralización (DE_{50}) (μL de antiveneno / mg de Veneno)**
<i>Crotalus durissus durissus</i> (Guatemala)	7.5	350
<i>Agkistrodon bilineatus</i> (Guatemala)	0.25	2650
<i>Bothrops asper</i> (Honduras)	6	57
<i>Bothrops nummifer</i> (Honduras)	18	157
* Cantidad de veneno que induce un área hemorrágica de 10mm de diámetro 2horas después de la inoculación. ** Razón antiveneno/veneno en la que el efecto hemorrágico es reducido en un 50%		

Juan José Chávez
Autor

MSc. Patricia Saravia
Asesora

MSc. Oscar Lara
Director

Lieda. Hada Marieta Alvarado Beteta
Decana