

I. RESUMEN

El envenenamiento por mordedura de serpiente es un problema importante de salud pública en Guatemala ya que se registran anualmente entre 600 y 700 mordeduras de serpiente y cerca de 10 muertes por año, según informes del Instituto Clodomiro Picado de Costa Rica (ICP).

El principal problema del accidente ofídico es la velocidad con que se desencadena el envenenamiento. Se debe tener presente que la entrada masiva al organismo de agentes tóxicos como los venenos de serpientes, no le permiten al sistema inmune de un individuo desarrollar una respuesta rápida y protectora. Por lo que la utilización de antisueros específicos, sea la única alternativa específica para el tratamiento eficaz de las mordeduras de serpientes venenosas.

En Guatemala, las especies ofídicas responsables de la mayoría de accidentes son las representativas de la familia Viperidae las cuales son *Bothrops asper*, *Crotalus durissus durissus* y de la familia Elapidae que se incluyen especies del género *Micruridae* conocidas como corales y el género *Bothriechis*.

Bothriechis bicolor (*B. bicolor*, gushnayera, cantil loro) es una de las especies de ofidios venenosos que se encuentran en el Litoral Pacífico y se distribuye desde México a Honduras por toda la cordillera volcánica. Se han identificado cuatro subespecies dentro de éste mismo género que son: *B. aurifer*, *B. lateralis*, *B. marchi*, y *B. schlegelii* o víbora de pestañas. Estas especies se han identificado como cantil loro, ya que son de costumbres arborícolas y todas ellas poseen cola prensil y debido a su color se confunden con el follaje pudiendo ocasionar accidentes en los miembros superiores a las personas que se dedican a los trabajos agrícolas como el corte de café.

El objetivo de esta investigación fue determinar los efectos toxicológicos del veneno de *B. bicolor* de mayor importancia médica, siendo éstos la dosis letal media (DL₅₀) la actividad hemorrágica mínima, la actividad coagulante, la actividad miotóxica mínima y la actividad de la enzima fosfolipasa A₂.

Se determinó que la dosis letal media de *B. bicolor* (122.12 µg/ratón) es similar a la *Bothrops nummifer* (mano de piedra) siendo ésta de 127 µg/ratón. La actividad hemorrágica mínima es 80 µg/mL, la cual no presentó mayor relevancia, la actividad coagulante (15 µg/mL de veneno), fue de mayor importancia pues resultó ser mayor a las reportadas para las demás especies representativas. La actividad de la Fosfolipasa A₂ esta dentro de los valores reportados de las demás especies. Esta actividad es muy importante dentro del envenenamiento ofídico.

Para el tratamiento del accidente ofídico en Guatemala, como única alternativa, se encuentran disponibles tres antivenenos polivalentes siendo éstos los provenientes de México, Costa Rica y Argentina. Tales antivenenos no incluyen especies del género *Bothriechis* donde la letalidad reportada en la presente investigación es similar a la *Bothrops nummifer* (mano de piedra) realizado por Rojas *et al* (1986) en el Instituto Clodomiro Picado. La DL₅₀ reportado para la *B. bicolor* guatemalteca es de 122.7 mg/ratón. La dosis letal de *B. nummifer* (Honduras) es de 127 mg/ratón *B. asper* (barba amarilla) es de 64 mg/ratón, *Agkistrodon bilineatus* (cantil de agua) de 22 mg/ratón y la más letal es *Crotaluss durissus durissus* (cascabel) con 16 mg/ratón (24).

Este estudio demostró que la potencia del veneno de *B. bicolor* posee algunas actividades tóxicas similares a las de las especies de mayor relevancia del país y se recomienda evaluar los antisueros comercialmente disponibles contra el veneno de *B bicolor*, para estar seguro de la efectividad de éstos en el tratamiento del envenenamiento por esta serpiente. También será importante ampliar los estudios sobre la actividad de la Fosfolipasa A₂ en modelos animales, (ratones Webster).

II. INTRODUCCION

En 1981, la Organización Mundial de la Salud estimó que ocurren en el mundo de 300,000 a 400,000 mordeduras por serpiente al año causando una mortalidad del 10 por ciento, siendo Birmania y Brasil los lugares más afectados por estos accidentes ofídicos. En 1993 se reportó que a nivel mundial ocurren de 50,000 a 100,000 muertes anuales producidas por mordeduras de serpientes en todo el mundo (1).

Debido a las diversas condiciones ecológicas y climáticas que prevalecen en los países de Centroamérica, existe una gran diversidad de flora y fauna. Guatemala se encuentra ubicada en el extremo norte de la zona neotropical, con tres regiones bien marcadas: La costa pacífica plana o litoral pacífico, la zona central alta formando la Sierra de Chuacús, la Sierra de los Cuchumatanes, la Sierra de Chamá y Sierra de las Minas atravesando todo el territorio nacional y la extensa zona tropical norte (2). Es por ello que la herpetofauna es muy variada por lo que se han documentado 139 especies de serpientes de las cuales 18 son venenosas (3).

En nuestro país, se registran anualmente entre 600 y 700 mordeduras de serpiente y cerca de 10 muertes por año. El accidente ofídico es un importante problema de salud pública. La mayoría de las mordeduras son ocasionadas por vipéridos, donde más del 50 por ciento de los casos son atribuidos a la terciopelo (*Bothrops asper*) (4).

El principal problema del accidente ofídico es la velocidad con que se desencadena el envenenamiento. Se debe tener presente que la entrada masiva al organismo de agentes tóxicos como los venenos de serpientes, no le permiten al sistema inmune de un individuo desarrollar una respuesta rápida y protectora. De ahí que el tratamiento con sueros antiofídicos es la única alternativa específica para el tratamiento eficaz de las mordeduras de serpientes venenosas (4).

Botriechis bicolor es una serpiente arborícola que habita en toda la cordillera volcánica del sur de Guatemala hasta el Volcán de Agua, entre los 600 a 2,000 metros sobre el nivel del mar y cuyo veneno no ha sido evaluado toxicológicamente.

Se ha determinado que la alimentación, el clima o la distribución geográfica, entre otros, pueden alterar la composición bioquímica del veneno de las especies de ofídios, por lo que la especificidad y la capacidad neutralizante de los sueros son diferentes. En Guatemala se distribuyen sueros antiofídicos del Instituto Clodomiro Picado (ICP) y el antiveneno MYNN, elaborados con venenos costarricenses y mexicanos respectivamente. Además existe un nuevo suero antiofídico polivalente elaborado por el Instituto Biológico Argentino (Biol) (5,6).

Investigaciones realizadas por Rojas y Valdés demostraron que el antisero polivalente posee baja especificidad para neutralizar algunos de los efectos farmacológicos de los venenos de serpientes del país y consideraron conveniente producir localmente los sueros antiofídicos, utilizando veneno de las serpientes guatemaltecas, con el fin de lograr una mayor efectividad en el tratamiento (7).

Debido a que el veneno de *B bicolor* no ha sido evaluado, la presente investigación tiene como objetivo caracterizar toxicológicamente al veneno determinando la Dosis Letal Media (DL 50) , la Dosis Hemorrágica Mínima (DHM), la Dosis Coagulante Mínima (DCM), los efectos proteolíticos sobre la caseína el efecto miotóxico y la actividad de la fosfolipasa A₂ según las metodologías descritas por el Instituto Clodomiro Picado la cual es necesario para su posterior neutralización con los antiseros disponibles en el mercado (8).

III. ANTECEDENTES

A. Generalidades

El hombre tiene tendencia a ponerse en contacto con una gran variedad de animales venenosos, estos contactos ocurren con muchas especies zoológicas que comprenden víboras, saurios, animales marinos, arañas, alacranes y muchas especies de insectos. En general resultan dos tipos de lesiones: las secundarias al efecto directo del veneno en la víctima como en mordeduras de víboras y las debidas a efectos indirectos del veneno de las cuales son ejemplo las reacciones de hipersensibilidad a picaduras de abejas. Esto tiene gran significación en salud pública debido a la pérdida en productividad económica y potencial humano que resulta de los envenenamientos graves que ocurren anualmente alrededor del mundo (9).

En Guatemala las investigaciones sobre ofidios son muy pocos, algunos trabajos que se realizaron fueron de Van den Brule investigador del ofidismo en nuestro país, la mayoría de sus investigaciones inéditas y otras con la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia de la Universidad de San Carlos de Guatemala (10).

B. Características generales de los ofidios

Los ofidios se diferencian fácilmente de algunos lagartos y anfibios ápodos, por la siguiente combinación de caracteres: a) En cráneo de las serpientes, la mandíbula no esta 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 si 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 esta cubierto por escamas yuxtapuestas y no por anillos con placas o piel lisa (11).

La herpetofauna mundial es sumamente abundante y diversa, existiendo alrededor de 2,400 especies de ofidios registrándose 139 especies en Guatemala, con 18 venenosas (3,12).

1. Clasificación

Las serpientes están clasificadas en cinco grandes familias que son:

a) Familia *Hidrophidae* (serpientes de mar)

En Guatemala solo existe un representante, *Pelamis platurus* que se localiza únicamente en el Océano Pacífico. Normalmente se le encuentra a 1-3 km de la costa, pero por efecto de las mareas se sabe que puede llegar a las playas, es decir cerca de los bañistas. Las razones de la escasa incidencia de

estos accidentes se relacionan con el hecho de que estas serpientes rehuyen el contacto humano y además, sus colmillos son fijos y muy pequeños.

La serpiente de mar alcanza tamaños de hasta un metro, su coloración típica es: una banda de color negro en el dorso, una banda de color amarillo a cada lado y una banda de color gris en el vientre . La cola es plana en la punta por lo que le sirve para impulsarse en el agua (13).

b) Familia Elapidae (serpientes corales)

Se encuentran en Guatemala siete especies venenosas del género Micruridae siendo éstas *M. browni*, *M. diastema*, *M. hippocrepsis*, *M. latifasciatus*, *M nigrocintus*, *M. stuarti*. Son conocidas popularmente como coral macho o coralillo. Existen serpientes coral en todos los países de la región. El veneno es neurotóxico y estos envenenamientos son tratados con el suero anticoral (14).

c) Familia Boidae (serpientes constrictoras).

En nuestro país existe la *Boa Constrictor Imperatus* (mazacuata) la cual llega a medir hasta metro y medio. Esta serpiente se alimenta enrollando a su presa asfixiándola por lo que carece de colmillos y foseta loreal y no es venenosa. Posee boca en forma de pico y manchas oscuras a lo largo de su cuerpo y habitan las regiones cálidas de la costa Pacífica en Guatemala (14).

d) Familia Colubridae

La mayoría de serpientes son no venenosas. Existen en nuestro país aproximadamente 100 especies y poseen el mismo tipo de colorido. Algunos del género *Pliocercus* y *Lampropeltis* (14).

C. Familia Viperidae

1. Generalidades.

Son serpientes ponzoñosas que se caracterizan por tener huesos faciales móviles, maxilar muy corto, perpendicularmente eréctil y soportando un par de enormes colmillos curvados, huecos e inoculadores de veneno, pero sin surco externo seneloglífas. Esta familia incluye serpientes en su mayoría ovovíparas y de hábitos diversos. Hay más de 80 especies distribuidas por América, Europa, Asia y Africa (14).

Estas serpientes son conocidas en Centroamérica como tabobas venenosas y se han clasificado tradicionalmente en los géneros *Lachesis*, *Bothrops* y *Crotalus*. Sin embargo, estudios taxonómicos recientes han culminado con la ubicación de algunas especies clasificadas anteriormente en el género *Bothrops* en los nuevos géneros *Atropoides*, *Bothriechis*, *Cerrophidion*, *Porthidium* y *Agkistrodon* las cuales son conocidas como la mano de piedra, cantil de árbol o cantil loro, tamagás o sheta, devanadora y cantil de agua correspondientemente.

Es importante aclarar que no se trata de nuevas especies sino de la nueva reclasificación de las especies ya conocidas, por lo que dicho en otras palabras, existen ahora ocho géneros de los tres anteriormente conocidos (14).

Esta familia incluye 17 especies que se distribuyen en diferentes zonas de Centroamérica. El género *Agkistrodon* está únicamente representado por la especie *Agkistrodon bilineatus*, conocida popularmente como cantil de agua y se distribuye desde Guatemala hasta Costa Rica en la región semiárida del Litoral Pacífico. Este género incluye muchas especies en Norteamérica, pero sólo una en Centroamérica (14).

El género *Lachesis* es común en Panamá y Costa Rica, habita zonas selváticas de condición húmeda. Dentro de los vipéridos de Centroamérica esta serpiente es la única ovípara cuyo nombre es *Lachesis muta stenophrys* (14).

El género *Bothriechis* incluye a las serpientes arborícolas que se encuentran en los bosques nubosos de la región Centroamericana (14) la cual se incluye a la serpiente de estudio *Bothriechis bicolor* donde se caracterizan por poseer colmillos largos los cuales emplea para inocular veneno a especies pequeñas como aves y reptiles de los cuales se alimenta (ver sección 4).

2. Especies venenosas en Guatemala

Agkistrodon bilineatus, *Crotalus durissus durissus*, *Bothrops asper*, *Bothriechis bicolor*, *Bothriechis schlegelii*, *Cerrophidion godmani*, *Porthidium nasatum*, *Porthidium ophryomegas* y *Atropoides nummifer* son las 10 especies de ofidios venenosos distribuidas en Guatemala de la familia *Viperidae*. Las tres primeras y la última de estas especies son las involucradas comúnmente en el accidente ofídico (15).

3. Distribución geográfica en Guatemala

Agkistrodon bilineatus habita en zonas húmedas de baja altura, a orillas de ríos, pantanos o campos de cañas de azúcar. Se distribuye en las vertientes Pacífica y Atlántica, entre 0 y 600 metros sobre nivel del mar, en los departamentos de Escuintla, Suchitepéquez, Retalhuleu y San Marcos. Se le conoce comúnmente como cantil de agua o mocasín (15).

Crotalus durissus durissus habita en zonas terrestres áridas, bosques de pino de altura, sabana de coníferas y de palmas. Se distribuye en la vertiente Pacífico entre 0 y 1500 metros sobre el nivel del mar en Escuintla, Santa Rosa, Guatemala, Suchitepéquez y Petén. Se le conoce comúnmente como cascabel o crótalo (15).

Bothrops asper habita en zonas terrestres húmedas y se distribuye en la parte sur y norte, entre 0 y 1500 metros sobre el nivel del mar, en Alta Verapaz, Baja Verapaz, Izabal, Retalhuleu, Escuintla y Santa Rosa. Se le conoce comúnmente como barba amarilla o terciopelo. *Bothriechis aurifer* es una especie arborícola de bosques nubosos y bosques subtrópicos húmedos, se distribuye en la vertiente Atlántica entre 1,200 y 2,300 metros sobre el nivel del mar. *Bothriechis bicolor* se distribuye en la vertiente del Pacífico, entre 600 y 2,700 metros sobre el nivel del mar en Sololá y Escuintla. Se le conoce como cotorra o cantil loro. *Bothriechis schlegelii* es arborícola y habita en selvas húmedas. Se distribuye en la vertiente Atlántica entre 0 y 1,500 metros sobre nivel del mar (15).

En Alta Verapaz *Cerrophidion godmani* es terrestre y habita en lugares con rocas, bosques de coníferas y a orillas de riachuelos. Se distribuye en la vertiente Caribe y algunas llanuras Pacíficas del sur occidente entre 0 y 600 metros sobre el nivel del mar en Alta Verapaz, Baja Verapaz, Petén y Escuintla. Se le conoce como cantil tamagás o cantil sapo(15).

Porthidium ophryomega habita en zonas terrestres, se distribuye en la vertiente Pacífica entre 0 y 1,500 metros sobre el nivel del mar 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 o niatas (16).

4. Género Bothriechis (Peters 1859)

El género *Bothriechis* comprende siete especies de serpientes de costumbres arborícolas las cuales llegan a medir entre 600-800 mm. Se sabe que *B. aurifer*, *B. bicolor* y *B. lateralis* llegan alcanzar 1 metro de longitud. Se les designa como pitviper debido a que se encuentran en vegetaciones de pequeñas palmas y por tener foseta loreal lo que les permite percibir el calor. *B. bicolor* y *B. marchi* son similares con la diferencia del color del iris (16).

Seis de las siete especies de éste género están confinadas en las regiones montañosas habitando entre México (Tehuantepec) hasta el centro de Panamá. *Bothriechis schlegelii* habita en las regiones más bajas pues se le ha encontrado en arbustos o matorrales, lo que da lugar a que sus mordeduras ocurran en la cara, cuello y otros puntos superiores del cuerpo, lo que siempre es de mayor gravedad (16).

a. **Bothriechis bicolor (Bocourt)**

i. **Nombres locales:** En Guatemala se denomina: guashnayera, víbora romana y víbora verde. En México se denomina nauyaca bicolor y nauyaca verde.

ii. **Distribución:** *Bothriechis bicolor* habita en las elevaciones moderadas e intermedias de la vertiente Pacífica y sur de la Cordillera Volcánica de Guatemala desde el Volcán de Agua hasta el cerro Ovando al Suroeste de Chiapas México. También ha sido vista en algunas localidades en Honduras, incluyendo la Sierra Merendón y el Cerro Santa Bárbara. La distribución vertical de la serpiente está entre los 500 metros a 2,000 sobre el nivel del mar. También habita en las espesuras de las lomas de la Sierra Madre en la zona de Soconusco, vive entre el ramaje y se oculta en las ramas y palmas, casi por lo general a unos dos metros del suelo (17).

iii. **Habitat :** Montañas de follaje húmedo y bosques nubosos entre los 500 a 2,000 metros sobre el nivel del mar.

iv. **Descripción:** Es relativamente delgada, verde de cola prensil pudiendo alcanzar un metro de su largo total, pero generalmente es de 60 a 70 centímetros. La parte superior de la cabeza es uniformemente verde y su dorso es verde o tonos de color azul. Algunos ejemplares de México y Honduras pueden tener en el dorso manchas negras en forma de puntos o manchas azules. La piel intersticial y bordes de algunas escamas son generalmente azules. El iris es verde con algunas reticulaciones negras y el extremo de la cola puede ser negro o gris especialmente en ejemplares jóvenes (17).

Esta especie posee de 7 a 11 escamas intersupraoculares de 9 a 12 supralabiales, de 10 a 13 infralabiales, 21 escamas dorsales, e 160 a 175 ventrales y 58 a 72 subcaudales individuales. Esta serpiente posee hábitos nocturnos y rara vez se le observa activa durante el día, su reproducción es vivípara y se alimenta de pequeños vertebrados como roedores, ranas y lagartijas. También se alimenta de lagartos anolis y ranas trepadoras. Sus costumbres son poco conocidas pero en lo general se parecen a las de otras nauyacac arborícolas (17).

v. **Especies similares:** *Bothriechis bicolor* se puede distinguir de *B. aurifer*, *B. marchi* y *B. rowleyi* por tener pequeñas quillas intersupraoculares (17).

D. **Características 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 (15). 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 (16). Los venenos son producidos por glándulas especiales que filogenéticamente son equivalentes a las parótidas (18).

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 (18).

Los venenos de las serpientes contienen alrededor de un 25 por ciento de sólidos totales de los cuales entre un 70 a 90 por ciento están constituidos por proteínas y polipéptidos de alta masa molecular, responsables de la mayoría de los efectos farmacológicos.

El resto de los componentes (10 a 30 por ciento) 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 (19).

E. Enzimas

Los venenos contienen una gran variedad de enzimas principalmente hidrolíticas, debido a la función en su digestión externa de las presas. La mayoría de enzimas no tienen un efecto letal y tampoco participan en los efectos fisiopatológicos del envenenamiento. Existe un grupo de enzimas que poseen importancia médica, tales como la fosfolipasa A₂ y algunas enzimas proteolíticas (17).

1. Fosfolipasa A₂

Esta enzima ha sido encontrada en todos los venenos hasta hoy estudiados. Antiguamente se le conocía como lecitinasa, por la lecitina, uno de sus principales sustratos. Hoy en día se han reportado numerosos sustratos sobre las 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 por lo que la acción de esta enzima es de tipo hemolítico indirecto (17).

La fosfolipasa puede actuar también sobre los fosfolípidos del sistema nervioso y se cree que interfiere en la conducción axónica. La acción sobre fosfolípidos de membranas celulares produce alteraciones que se evidencian en aumento de su permeabilidad, induciendo la liberación de enzimas intracelulares. Sobre las mitocondrias es capaz de provocar tumefacción y destrucción y por lo tanto, afecta 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 (17,20). Las masas moleculares de las fosfolipasa A₂ que han sido investigadas varían entre un mínimo de 8,500 daltons hasta un máximo de 36,000 daltons ubicándose la mayoría entre 10,000 y 16,000 daltons (17).

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 enzimática o ninguna actividad fosfolipasa A₂, pero con actividad miotóxica (20).

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* (20).

2. 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 pasado. Pronto se llegó a observar que el fenómeno era complejo, interviniendo una serie considerable de enzimas con diferentes mecanismos de acción (17). 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 (21).

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 (21) 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 (21).

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 (17). Las exopeptidasas actúan en el extremo terminal de las cadenas peptídicas (21).

c. Proteasas específicas

Estas enzimas solamente actúan sobre un sustrato específico y su efecto tiene gran importancia en la patología del envenenamiento (17).

d. Quinógenos

El quinógeno o bradiquinógeno, es una globulina plasmática cuyo sustrato específico es la bradiquinina. La bradiquinina es un polipéptido que tiene un drástico efecto vasopresor y además, aumenta la permeabilidad capilar. La actividad de bradiquinógeno produce una brusca caída de la presión arterial y del edema que se manifiesta en el envenenamiento por vipéridos. El mecanismo de acción del bradiquinógeno 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 este 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 (17).

3. 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 produciendo alteraciones en la cascada de coagulación (17), y son las responsables del sangramiento del paciente.

4. Otras Enzimas

Dentro de las enzimas hidrolíticas se encuentran las 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 (16).

Dentro de las enzimas no hidrolíticas, se pueden encontrar aminotransaminasas, 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 (22).

5. 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 (17).

a. Neurotoxinas

Son típicas de las familias *Hydrophidae* y *Elapidae* y se caracterizan por interferir con la transmisión nerviosa (23).

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 subunidad del receptor colinérgico. Como consecuencia de esto, no es posible sostener la contracción del músculo. Ellos causan que los músculos del sistema respiratorio no realicen la transmisión postsináptica por lo que pueden causar la muerte por parálisis respiratoria (23).

b. Hemorraginas

El fenómeno hemorrágico provocado por venenos de serpientes es uno de los eventos más importantes en la patología del envenenamiento.

Los venenos por vipéridos son extremadamente hemorrágicos. Su acción depende de cationes bivalentes (Ca^+ , Mg^{+2} y 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 (17,20).

El sangrado se produce como consecuencia de la acción de las hemorraginas sobre los vasos sanguíneos al degradar los componentes 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 (20).

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* mas importante en su patología. La necrosis es el mayor agente de secuelas permanentes en el accidente ofídico (17,20).

d. Aminas biogénicas

Clínicamente los accidentes ocasionados por mordedura de serpientes de la familia *Viperidae* se caracterizan, entre otras cosas, por un dolor intenso inmediato a la mordedura, a diferencia de las serpientes de la familia *Elapidae*, quienes presentan dolor paulativamente. Este hecho es importante, ya que se ha relacionado con la presencia de aminas biogénicas en los venenos, los cuales están presentes en todos los vipéridos pero prácticamente ausentes en los elápidos. Las aminas biogénicas están relacionadas con la formación de edema y alteraciones en la presión arterial ocasionando dilatación capilar y aumento de la permeabilidad con extravasación de líquidos (24).

F. Características de los envenenamientos producidos por vipéridos

En el caso de mordeduras de serpientes de la familia *Viperidae* (géneros *Bothrops*, *Crotalus*, *Porthidium* y *Agkistrodon*), los venenos poseen una composición química muy compleja, con presencia de toxinas y enzimas que afectan múltiples procesos fisiológicos. El cuadro de envenenamientos en este caso esta caracterizado por efectos locales inmediatos y en casos moderados y severos por alteraciones sistémicas diversas (2). La severidad de estos envenenamientos es muy variable y su evaluación es fundamental para el diseño de un adecuado tratamiento, esta severidad depende de los siguientes factores:

1. Cantidad de veneno inoculado

En el caso de ejemplares adultos o de especies más grandes (por ejemplo la terciopelo o cascabel) el volumen de veneno inyectado es mayor provocando por lo tanto accidentes de mayor riesgo (6).

1. El sitio anatómico de la mordedura

La severidad de la mordedura depende del sitio anatómico de inoculación del veneno, siendo mayor en el tronco y/o cabeza que en las extremidades superiores o inferiores. La severidad de la mordedura también depende del peso de la persona de tal manera que en niños hay complicaciones y deterioro rápido de su estado fisiológico (2).

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 (2).

3. Edema

Este es el efecto más común en el envenenamiento por serpientes de esta familia. Este fenómeno es producido por múltiples factores, como consecuencia que la toxinas afectan directamente el endotelio, originando la exudación del plasma (14,15).

Los venenos liberan además una serie de compuestos mediadores en funciones inmunológicas, como lo son histamina, kininas prostaglandinas y anafilatoxinas, que actúan en el proceso inflamatorio (15).

4. Mionecrosis

Se debe a la acción directa de las miotóxicas que laceran la membrana plasmática de las células musculares y al efecto de isquemia (obstrucción de la oxigenación del tejido) sobre el tejido muscular, como consecuencia de la hemorragia y el edema.

Además de los fenómenos estudiados, estos accidentes cursan frecuentemente con infecciones debido a que los venenos y la cavidad bucal de las serpientes están altamente contaminados con gran cantidad de bacterias. Mas aún, las lesiones cutáneas que se producen favorecen la entrada de microorganismos en los tejidos (25).

5. Hemorragia

La hemorragia local se produce como consecuencia de la acción de las hemorraginas del veneno sobre la microvasculatura. Estas hemorraginas son metaloproteinasas dependientes de zinc, los cuales degradan los componentes de la lamina basal de los capilares y vénulas, originando como consecuencia que los capilares se colapsen y se produzca la extravasación. Como consecuencia de esta acción hay un profuso sangrado tanto local como sistémico. A nivel local, las alteraciones en la vasculatura contribuyen a la necrosis tisular, al afectar drásticamente la perfusión, originando isquemia. (25).

G. Estudios realizados sobre venenos de serpientes

La especie *Bothrops neuwiedi* Wagler ocupa principalmente las áreas abiertas de América del Sur, ocurriendo en Brasil, Bolivia, Paraguay, Argentina y Uruguay, existiendo cerca de 31 especies dentro de éste género con diferentes patrones de coloración y diseño.

Se han estudiado las actividades tóxicas de algunas de éstas serpientes empleando patrones electroforéticos en SDS-PAGE, llegando a concluir que existen variaciones marcadas entre dichas especies al ser evaluados sobre las actividades proteolíticas, tóxicas y coagulantes(26).

En Guatemala, se han desarrollado trabajos de investigación sobre la capacidad neutralizante de los antivenenos disponibles en Guatemala llegando a concluir que el antisuero ICP (Instituto Clodomiro Picado) es más efectivo que el suero antiofídico mexicano (MYN) para neutralizar los efectos letal, hemorrágico, miotóxico y coagulante del veneno de *Crotalus durissus durissus* y que la neutralización para la actividad de fosfolipasa A₂ fue similar para ambos antisueros. Estudios sobre el veneno de la *Atropoides nummifer* (mano de piedra), han demostrado poseer una actividad de la Fosfolipasa A₂ mas importante que para las especies *Bothrops asper* y *Crotalus durissus durissus* por lo que producen edemas a nivel muscular más severas (26).

El estudio epidemiológico retrospectivo realizado en el Hospital de Cobán en los años de 1993-1995, evidenció que en el mes de octubre la incidencia de accidente ofídico por barba amarilla es del 14 por ciento y para la cascabel es el 7 por ciento , 1 por ciento para la mano de piedra y 7 por ciento para la cantil de agua. El género *Botriechis* habita en los bosques nubosos de la parte norte de la República pudiendo encontrarse el resto dentro del porcentaje antes mencionado (27).

Otros estudios se han realizado sobre la neutralización de las actividades tóxicas de tres venenos de serpientes: *Agkistrodon bilineatus*, *Potridium nummifer* y *Crótalus durissus durissus* por el suero antiofídico producido en México, llegando a concluir que únicamente el veneno de cascabel se neutraliza efectivamente y no se observó una neutralización adecuada de la

letalidad de los venenos de mano de piedra (*P. nummifer*) y mocasín de agua (*A. bilineatus*) (28).

H. Tratamiento del accidente ofídico:

El tratamiento del accidente ofídico debe partir de una comprensión adecuada de la fisiopatología de estos envenenamientos. En primer lugar, el médico debe identificar el grupo al que pertenece la serpiente que causó la mordedura, para lo cual debe basarse en la observación directa de la serpiente o en los signos y síntomas que presenta el paciente. Debe tenerse precaución con la descripción de la serpiente que dan los pacientes o sus familiares, ya que muchas veces las mismas no responden a la realidad (15,20).

En esta observación existen cuatro opciones fundamentales: a) la serpiente que mordió no es venenosa, b) la serpiente es venenosa pero no inculó veneno, c) la serpiente sí inculó veneno y pertenece a la familia Viperidae. En los casos (a) y (b) no se debe administrar suero antiofídico y el paciente debe permanecer en observación durante 12 horas. En el caso (c) se debe administrar suero anticoral y en el caso (d) se debe emplear suero polivalente (15).

Una vez que se ha establecido que el paciente fue mordido por una serpiente venenosa y que la serpiente inculó veneno, se debe evaluar la severidad del envenenamiento con el fin de determinar el volumen de suero antiofídico que recibirá el paciente. El envenenamiento se califica como leve, moderado o severo. Posteriormente, una vez que se ha iniciado el tratamiento, es fundamental la vigilancia de la evolución del caso, en la que debe incluirse tanto la evaluación clínica como las pruebas de laboratorio. Esta vigilancia permite decidir si el paciente debe recibir dosis adicionales de suero antiofídico (15).

1. Medidas recomendadas para evitar complicaciones en el paciente.

Las recomendaciones básicas relativas para personas con mordedura de serpiente son las siguientes

- a) No utilizar torniquetes, ya que el tejido está siendo afectado por hemorragia, necrosis y edema. El torniquete complica aún más la irrigación a zonas distales, aumentando la isquemia y la lesión tisular.
- b) No efectuar ningún tipo de incisión, ya que se aumenta el riesgo de infección y se favorece el sangrado.
- c) No efectuar succión con la boca, ya que se favorece la infección y, de todas maneras, es muy poco el veneno que se puede retirar con ese procedimiento. En cuanto al uso de aparatos de succión, no se ha demostrado su utilidad, por lo que tampoco se recomiendan.

- d) No aplicar compresas de hielo, ya que pueden empeorar las lesiones originadas por el veneno, causando isquemia y necrosis.
- e) No administrar sustancias químicas ni extractos de plantas o animales ni aplicar emplastos de ningún tipo. No existe ningún tipo de evidencia científica que apoye el uso de este tipo de productos en los envenenamientos por mordedura de serpiente (15).

2. Uso del suero antiofídico fuera del hospital

En general, no se recomienda la aplicación del suero antiofídico por la vía intramuscular, por las siguientes razones: a) Existe el riesgo de una reacción adversa luego de aplicado el suero, la cual puede llegar incluso a un choque anafiláctico. b) Los anticuerpos equinos del suero antiofídico se absorben muy lentamente y de manera incompleta cuando se inoculan por vía intramuscular: por ello, los anticuerpos del suero llegan a la circulación al cabo de varias horas de inoculado. c) Las inyecciones intramusculares introducen el riesgo de hematomas ya que el veneno de las serpientes de la familia Viperidae producen coagulopatías. El tratamiento intramuscular debe circunscribirse en casos en que se imposibilite hacerlo intravenosamente como el caso de niños o personas obesas cuya identificación de venas sea difícil y se tenga la certeza del envenenamiento donde el centro de salud más cercano está a más de cuatro horas de distancia(15).

En casos de emergencia, y por situaciones antes mencionadas, antes de aplicar el suero por la vía intramuscular, se debe efectuar una prueba intradérmica inyectando 0.1 ml del suero. Si la prueba es negativa (no existe reacción adversa), se debe administrar como máximo hasta cuatro frascos del suero antiofídico por vía intramuscular previo al tratamiento del hospital (15).

3. Tratamiento hospitalario con suero antiofídico

El suero antiofídico o antiveneno, constituye el principal elemento en la terapia del accidente ofídico. Este producto está compuesto por anticuerpos de origen equino capaces de neutralizar las toxinas presentes en los venenos. En Centroamérica se producen principalmente dos tipos de sueros antiofídicos: el centroamericano de la familia Viperidae y el anticoral, efectivo contra los venenos de todas las especies de las principales serpientes del género *Micrurus* del área Centroamericana (20).

a. Indicaciones de uso del suero antiofídico

Las indicaciones para el uso del suero antiofídico según el Instituto Clodomiro Picado son las siguientes:

i) En condiciones hospitalarias, el suero antiofídico debe ser administrado por la vía intravenosa. La vía intramuscular es inconveniente ya que la absorción de los anticuerpos es muy lenta e incompleta, existiendo además es riesgo de infecciones.

ii) Repetidamente se ha demostrado que las pruebas intradérmicas para predecir la hipersensibilidad al suero no son confiables, por lo que no se efectúan en los hospitales .

iii) Se debe canalizar una vía venosa.

iv) Con base a los signos y síntomas del paciente, así como en la observación de las características de la serpiente que originó el accidente, se debe determinar si se trata de una mordedura por serpiente coral, por vipérido o serpiente coral, por vipérido o serpiente no venenosa.

v) Establecer la dosis inicial de suero antiofídico que se va a utilizar. En el caso del suero polivalente se recomienda cinco frascos para casos leves y diez para casos moderados y severos. En casos excepcionalmente críticos, así como en envenenamientos causados por las especies *Lachesis muta* (matabuey o verrugosa), se recomienda una dosis inicial de quince frascos de suero polivalente.

Es importante enfatizar que las mordeduras en niños son generalmente de mayor severidad, por lo que la dosis de suero antiofídico debe ser igual que en los adultos. En los envenenamientos de serpientes de coral, se recomienda una dosis inicial de cinco frascos de suero anticoral para casos leves y de diez frascos para casos moderados y severos . El criterio clínico es esencial a la hora de determinar si se debe administrar suero antiofídico o no, ya que un cierto número de mordeduras cursan con envenenamiento muy leve que, no amerita la administración del suero. La observación meticulosa de la evolución de cada caso es el principal recurso para la toma de una decisión correcta (20).

b) Administración del suero antiofídico

i) Ya establecida la dosis inicial a administrar, agregar el suero antiofídico a 500 mL de solución salina estéril (200 mL en el caso de niños para evitar sobrecarga de flúidos) e iniciar la infusión a goteo lento. Se debe observar con cuidado la aparición de reacciones adversas (urticaria, hipotensión cefalea, náusea, broncoespasmo) (20).

ii) Si no hay reacciones adversas en quince minutos, se incrementa el flujo para que todo el suero pase en una hora.

iii) Si se produce una reacción adversa, se suspende inmediatamente la infusión del suero antiofídico y se administra adrenalina 1:1000 por vía subcutánea, así como un antihistamínico y un esteroide por la vía intravenosa. Cuando el paciente mejora la reacción adversa, en el transcurso de unos 15 minutos, se reinicia el goteo del suero antiofídico y se termina de pasarlo en 1-2 horas. Se debe tener a mano equipo de resucitación cardiopulmonar ante la eventualidad de una reacción severa (20).

iv) Algunos casos requerirán de dosis adicionales del suero antiofídico, esto dependerá de la evolución de cada caso en particular. Si la dosis inicial de antiveneno es adecuada, los signos y síntomas del envenenamiento deben estar debidamente controlados 12 horas después de aplicado el suero. Por ello, si al cabo de 12 horas mantienen las alteraciones de la coagulación, o persiste el sangrado o la hipotensión, se debe de adicionar una dosis adicional de cinco o diez frascos de suero antiofídico, de acuerdo a la severidad del caso.

v) Por otra parte, hay descripciones de casos en los que, una vez controlado el envenenamiento, reaparecen signos y síntomas al cabo de 12 ó 24 horas, posiblemente como consecuencia de la liberación tardía de veneno de sitios en los que se había acumulado en los tejidos. En estos casos se recomienda administrar cinco frascos adicionales de suero polivalente (20).

4. Tratamiento de la infección y profilaxis del tétano

Los venenos de serpientes son flúidos biológicos muy contaminados con enterobacterias, bacilos anaerobios del género *Clostridium* y cocos Gram positivo, las cuales pueden originar infección local e incluso sepsis. Por lo tanto, se recomienda la antibioticoterapia en las fases tempranas del tratamiento hospitalario. Se debe utilizar penicilina y un antibiótico de amplio espectro (aminoglucósido por ejemplo). Cuando se tenga sospecha de sepsis, se deben efectuar hemocultivos. Por otra parte, se debe administrar toxoide tetánico de acuerdo al historial de vacunaciones del paciente (20).

5. Tratamiento del sangrado y las alteraciones cardiovasculares

Los envenenamientos severos por serpientes de la familia *Viperidae* se caracterizan por el sangrado local y sistémico, lo que puede desembocar en un choque cardiovascular. Se debe mantener la volemia mediante infusión de solución salina, vigilando la recuperación de la presión arterial. Se recomienda la medición de la presión venosa para evitar sobrecarga de fluidos (20).

Es importante enfatizar que estos tratamientos complementarios deben ser precedidos por el suero antiofídico, ya que es necesario neutralizar las toxinas circulantes como primera medida.

En el tratamiento de la coagulopatía y las alteraciones cardiovasculares está contraindicado el uso de esteroides y de heparina (20).

6. Tratamiento de alteraciones renales

Es muy importante mantener en el paciente una volemia adecuada para prevenir la aparición de alteraciones renales en accidentes por vipéridos. Se debe vigilar la diuresis y mediante pruebas de laboratorio, efectuar urianálisis y determinación de los niveles séricos de urea y creatinina. Si la diuresis no se recupera con la infusión de solución salina, se debe administrar manitol o furosemida. En caso de que estas medidas sean insuficientes, se debe considerar la necesidad de la diálisis (20).

7. Tratamiento de las lesiones locales

Es conveniente lavar el sitio de la mordedura con agua estéril y jabón. Por otra parte, en caso de que se formen ampollas, el contenido de las mismas debe aspirarse con una jeringa estéril. Los abscesos deben ser drenados y se debe desbridar el tejido necrótico. En casos severos se puede presentar un síndrome compartimental, el cual debe ser valorado rigurosamente mediante la medición de la presión (20).

8. Tratamiento del dolor

Dado que el dolor en el sitio de la mordedura se presenta en la mayoría de los casos de los vipéridos, es recomendable el uso rutinario de analgésicos (20).

IV. JUSTIFICACIONES

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 del accidente ofídico producidos por *Bothriechis bicolor* son inexactos e incompletos haciendo difícil el seguimiento de este tipo de accidente.

En un país como el nuestro, la agricultura es el principal medio de producción de alimento y de actividad económica para la mayoría de la población que vive en el área rural, encontrándose también el habitat de serpientes venenosas que ocasionan accidentes graves. Es por ello que el ofidismo es un problema real y es responsable de la incapacidad física-parcial o total de las personas que son mordidas. Esto conlleva a un alto costo por el tratamiento en sueros polivalentes y estancia hospitalaria.

Es importante caracterizar toxicológicamente el veneno de *Bothriechis bicolor* debido a que esta serpiente pertenece a la familia Viperidae y según estudios a nivel mundial, es la que se encuentra con mayor frecuencia involucrado en el accidente ofídico.

V. OBJETIVOS

A. Objetivo general

Caracterizar toxicológicamente el veneno de *Bothriechis bicolor* en cautiverio de Guatemala

B. Objetivos específicos

1. Determinar el efecto letal del veneno de *B. bicolor* expresado como la dosis letal media (DL₅₀)
2. Determinar la actividad miotóxica del veneno de *B. bicolor* expresada como la dosis miotóxica mínima (DMM).
3. Determinar la actividad hemorrágica del veneno de *B. bicolor* expresada como la dosis hemorrágica mínima (DHM).
4. Determinar la actividad coagulante del veneno de *B. bicolor* expresada como la dosis coagulante mínima (DCM)
5. Determinar la actividad fosfolipasa A₂ del veneno de *B. bicolor*.

VI. HIPOTESIS

Por tratarse de una investigación descriptiva no es necesario plantear hipótesis.

VII Materiales y Métodos.

- A. Universo de Trabajo.
Veneno liofilizado de serpientes adultas en cautiverio de la especie *B. bicolor* en Guatemala.
- B. Muestra.
Veneno obtenido de al menos 4 ejemplares de la especie *B. bicolor* procedentes de las regiones de San Marcos y parte de Escuintla y que se encuentran en el Herpetario del Museo de Historia Natural.
- C. Materiales
1. Recursos humanos:
Tesisista: Br. Werner Soto
Asesora: Licda. Alba Marina Valdés de García. QB.
Colaborador: Lic Nils Santos del Serpentario del Zoológico La Aurora.
Dra. Amarillis Saravia: Bioterio de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia.
 2. Recursos Institucionales.
 - a. Laboratorio de Bioquímica, Escuela de Química Biológica. Facultad de CCQQ y Farmacia USAC.
 - b. Laboratorio del Instituto Nacional de Nutrición de Centroamérica y Panamá.
 - c. Serpentario Museo de Historia Natural.
 - d. Bioterio de la Facultad de C.C.Q. Q y Farmacia .
 3. Equipo
Cronómetro
Baño de maría.
Equipo de disección
Vortex
Espectrofotómetro Spectronic 21
Centrífuga para capilares
Balanza analítica.
Liofilizador de vacío Fisher (INCAP)
 4. Material

Gradillas para tubos
Jeringas desechables para insulina 25g x 16mm
Micropipetas de volumen variable
Papel parafilm
Probeta de vidrio
Tapones de hule para tubos
Tubos capilares con heparina
Tubos capilares sin anticoagulante

5. Modelos Experimentales

Ratones Webster de 18-20 gramos de peso

6. Reactivos

Azul de Timol 0.01%
 Buffer 0.1M tris-HCl, 10m CaCl₂ pH 8.5
 Etanol al 90%
 Agua destilada
 NaOH 0.018 N
 Plasma humano anticoagulado con citrato de sodio (3.8gr/dl)
 Solución salina amortiguada con fosfatos pH 7.2 (PBS)
 Titrón X-100 al 1%
 Yema de huevo
 Veneno liofilizado de *Bothriechis bicolor*
 Acido sulfúrico concentrado G.R.
 Mezcla extracción Isopropanol (160 mL) Heptano (40mL) y H₂SO₄ concentrado (110 mL)
 Eter

D. Procedimientos

1. Obtención del veneno de *B. bicolor*

- a) Se localizaron varios ejemplares de *B. bicolor* para hacer una mezcla de sus venenos.
- b) Se ordeñaron las serpientes por personal capacitado para garantizar el mínimo de pérdida de la actividad biológica de la proteína y toxinas del veneno.
- c) Se centrifugó en frío a 7 °C para eliminar el material en suspensión.
- d) Se liofilizó la mezcla de veneno de 6 ejemplares hasta un punto residual (no mayor de 5% de humedad en el liofilizador Fisher)) y se conservó a 7°C hasta su utilización.

2. Condiciones de los modelos experimentales

Previo inicio del trabajo de laboratorio, se aparearon ratones Webster para obtener camada de ratones de 16 a 20 gramos de masa corporal para realizar los trabajos toxicológicos.

Para caracterizar el veneno de *B. bicolor* según protocolo del Instituto Clodomiro Picado se estandarizaron las técnicas de trabajo tomando en cuenta ratones de 21 días de nacidos de ambos sexos.

2. Caracterización toxicológica del veneno

a. Dosis letal media (DL 50)

La DL_{50} está definida como μg de veneno por gramo de masa corporal con la que se asegura la muerte del 50% de ratones en 48 horas calculado por el método estadístico de Spearman-Karber (28).

Procedimiento

- i A partir del liofilizado de *B. bicolor* se preparó una solución de veneno de 1 mg/mL, con solución salina amortiguada con fosfatos a pH 7.2 (PBS).
- ii Se establecieron 5 niveles de concentración de veneno para calcular la dosis letal media en μg de acuerdo a Theakson H.A (30) siendo éstos de 43.2 μg , 51.8 μg , 62.2 μg , 74.6 μg y 89.6 μg (30)..
- iii Una vez efectuadas las diluciones, se inyectaron intraperitonealmente 0,5 mL de cada dilución de veneno a grupos de ratones Swiss- Webster (6 ratones por cada nivel de toxicidad de los 5 niveles realizados anteriormente con un peso de 18-20 gramos).
- iv Se anotó las muertes que ocurrieron en el transcurso de las 48 horas posteriores a la inoculación.
- v Se calculó la dosis letal (DL_{50}) mediante el método de Spearman-Karber (WHO 1981) o el método de probitos, empleando los programas de cómputo elaborados para éstos procedimientos. Estos métodos dan el valor de la dosis letal media del 50% y los límites de confianza del 95%(29).

b) Dosis Coagulante Mínima (D.C.M.)

La actividad coagulante del veneno se determinó en plasma humano citratado, como se encuentra descrito por Theakson y Reid (1983) con las modificaciones de Gené *et al* (1989) (29,30).

La actividad desfibrinante de los venenos es consecuencia de la acción de los componentes coagulantes, particularmente de su enzima trombina. Cuando venenos con actividad coagulante se administran en animales experimentales por vía intravenosa, se consume el fibrinógeno y se prolongan los tiempos de coagulación como consecuencia de la desfibrinación. Esta actividad se puede detectar mediante la cuantificación de los niveles de fibrinógeno o, más fácilmente, mediante la determinación de las dosis de veneno que inducen incoagulabilidad en la sangre.

Procedimiento

i A partir del liofilizado se prepararon soluciones de veneno, a diferentes concentraciones o a probar, utilizando PBS como diluyente. Se trabajó en un rango de 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

ii Se inyectó 0.2 mL de cada solución por vía intravenosa a grupos de 4 ratones. Un grupo adicional de 4 ratones inocular con 0.2 mL de PBS como control.

iii Esperar una hora después de las inyecciones, y bajo anestesia con éter, obtener aproximadamente 200 μL de sangre, ya sea mediante punción cardíaca o del plexo venoso ocular. Utilizar en este caso capilares no heparinizados ya que afectan la coagulación. Colocar las muestras de sangre en tubos de ensayo pequeños, limpios y secos. Incubar los tubos a temperatura ambiente, por término de una hora. Se observaron los tubos cada media hora.

iv Elaborar una curva dosis-respuesta (μg de veneno vs tiempo de coagulación en segundos) empleando escala logarítmica para la dosis y escala milimétrica para la respuesta. Extrapolar la cantidad de veneno que coagula el plasma en 60 segundos, la cual corresponde a la Dosis Coagulante Mínima (DCM).

c) Dosis Hemorrágica Mínima (DHM)

La dosis hemorrágica mínima es 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 (31).

Procedimiento

i Se prepararon varias soluciones conteniendo diferentes concentraciones del veneno a probar, utilizando PBS como diluyente. Se trabajó en un rango de 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

ii Se inyectaron 0.1 mL de cada solución por vía intradérmica, en la región abdominal, a grupos de 4 ratones. Un grupo adicional de 4 ratones se inoculó con 0.1 mL de PBS sin veneno como control.

iii Dos horas después de la inyección, se sacrificaron los animales mediante inhalación de éter y se removió la piel para medir el área hemorrágica que queda después de las dos horas de la inyección.

iv Se midió el área hemorrágica en la región interna de la piel y determinar el diámetro de la región hemorrágica mediante el siguiente cálculo:

$$\text{Diámetro} = 2X \sqrt{\text{área}/\pi}$$

en donde: $\pi = 3.14$

Elaborar una curva dosis-respuesta (μg de veneno vs mm del diámetro de la lesión hemorrágica) empleando una escala logarítmica para la dosis y una escala milimétrica para la respuesta. Extrapolar la dosis de veneno que corresponde al diámetro de 10 mm, la cual corresponde a la Dosis Hemorrágica Mínima (DHM) (32).

d. Actividad Fosfolipasa A₂

Es un método titrimétrico o de titulación que permite medir la actividad enzimática de las fosfolipasas A₂, de los venenos de serpientes, por la medición de la cantidad de base (NaOH) consumida para neutralizar los ácidos grasos liberados de un sustrato de fosfatidilcolina (lecitina) obtenida de la yema de huevo por la acción de la fosfolipasa A₂. Este método está basado en la extracción de Dole (33).

Procedimiento

- i Se colocó en un tubo limpio 1 mL de sustrato (lecitina) con 0.1 mL de muestra (veneno, toxina etc).(anexo 2)
- ii Se incubó el sustrato con la muestra por 10 minutos a 37 °C.
- iii Se agregó 5 mL de mezcla de extracción (ver anexo 2).
- iv Se agitó fuerte el tubo y se dejó en reposo por 10 minutos a temperatura ambiente.
- v Se tomó 2 mL de heptano con 3 mL de agua destilada y se invirtieron los tubos
- vi Se tomó 2 mL de la fase superior con 1 mL de la mezcla de titulación.
- vii Se tituló con NaOH 0.018 N hasta la aparición de un color amarillo verdoso.
- viii Se anotaron la cantidades de NaOH consumido por la titulación.
- ix Se calculó el número de miliequivalentes de NaOH 0.018 N. así:

$$\text{Volumen de NaOH} \times \text{concentración NaOH} = \text{meq}$$

$$\text{meq}(\mu\text{eq}) \times 1/20 \text{ min} \times (1000 \mu\text{g de toxina utilizado}) = \mu\text{eq/mg ácido graso/min.}$$
 X La actividad enzimática convierte un sustrato a un producto en una razón de tiempo.

e) Determinación de la actividad miotóxica

La actividad miotóxica se determinó cuantificando la actividad de la enzima creatina Kinasa (CK) en plasma de ratones previamente inyectados. La CK es una enzima que se encuentra en altas concentraciones en el citoplasma de células musculares, liberándose al fluido intersticial y a la sangre luego de la lesión celular. Para la mayoría de venenos, los niveles de CK se determinan a las tres horas debido a que se ha demostrado que es el tiempo en el que dicha actividad se encuentra más elevada en mionecrosis inducida por venenos y miotoxinas en ratones.

Procedimiento

i Se prepararon diferentes concentraciones de veneno dentro de un rango de 00 μ g/ mL a 1000 μ g/mL utilizando PBS como diluyente.

ii. Se inyectó 0.1 mL de cada solución por vía intraperitoneal a grupos de 4 ratones. A Un grupo adicional de 4 ratones se inyectó 0.1 mL de PBS como control.

iii. Tres horas después de la inyección, se obtuvo muestra de 25 μ L de sangre de cada ratón mediante corte de la porción distal de la cola. Alternativamente, la sangre puede obtenerse del plexo ocular. Se colectó la sangre en tubos heparinizados y se procedió a sellar un extremo del tubo con plasticina.

iv. Se centrifugó los tubos capilares en una microcentrífuga y se obtuvo el plasma de cada tubo.

v. Se determinó la actividad de CK en el plasma, de acuerdo al procedimiento del juego de reactivos utilizado

vi Se preparó una curva dosis-respuesta (μ g de veneno /actividad de CK en plasma) empleando la escala logarítmica para la dosis y la milimétrica para la respuesta. Extrapolar la dosis de veneno en la que la actividad de CK plasmática corresponde a 4 veces la actividad de CK de los ratones inyectados con PBS. Esta dosis de veneno corresponde a la Dosis Miotóxica Mínima (DMM).

E. Diseño de la investigación

El presente estudio es descriptivo por lo que se efectuó un estudio de la relación dosis-respuesta con el veneno, lo que permitió obtener la dosis mínima de veneno o dosis-reto, necesaria para inducir un efecto en particular.

F. Análisis de datos

Para determinar el efecto letal DL_{50} se empleó el programa de Spermán Karber, el cual reporta los intervalos de confianza al 95%. El grado de significancia utilizado en cada prueba fue de 0.05 (Rojas, 1987) (WHO, 1981).

Para las actividades mitotóxica, hemorrágica, coagulante y fosfolipasa A_2 del veneno, se utilizó un análisis de regresión en función de la concentración del veneno en estudio.

VIII. RESULTADOS

La caracterización toxicológica del veneno de *Bothriechis bicolor* abarcó la determinación de los efectos letal, miotóxico, hemorrágico, coagulante y la actividad Fosfolipasa A₂.

En la tabla 1 se presentan los resultados obtenidos de la dosis letal media DL₅₀ con cinco niveles de toxicidad, los cuales fueron ajustados hasta lograr los valores significativos. La DL₅₀ se observa en el nivel de 120 µl de veneno/ratón y el cálculo estadístico utilizando el método de probitos (Spearman Karber) es de 122.12 µg/ratón con intervalo de 95% de confianza (113.57-131.32).

Tabla 1 Determinación de la dosis letal media (n= 36)

Nivel (µg/0.5mL)	Veneno (mL)	PBS (mL)	Muertes 48horas	Vivos 48 horas
100 µg	1.00	4.0	0	6
110 µg	1.10	3.9	1	5
120 µg	1.20	3.80	3	3
130 µg	1.30	3.70	4	2
140 µg	1.40	3.60	5	1
Control	0	0.5	0	6

Fuente : Datos experimentales.

La actividad miotóxica del veneno se describe en la tabla 2, utilizando los mismos niveles encontrados para la dosis letal media DL₅₀. La dosis miotóxica mínima es de 272 UI. Se utilizó el protocolo del Instituto Clodomiro Picado en que se indica la DMM es 4 veces el valor obtenido al medir espectrofotométricamente la concentración de CK en suero por lo que el valor al emplear solamente PBS al ratón es de 68 UI, siendo la DMM=272 UI. Las lecturas se determinaron en un Microlab-200 a una longitud de onda de 340 nm y a 37 C.

Tabla 2. Determinación de la actividad miotóxica (n=6)

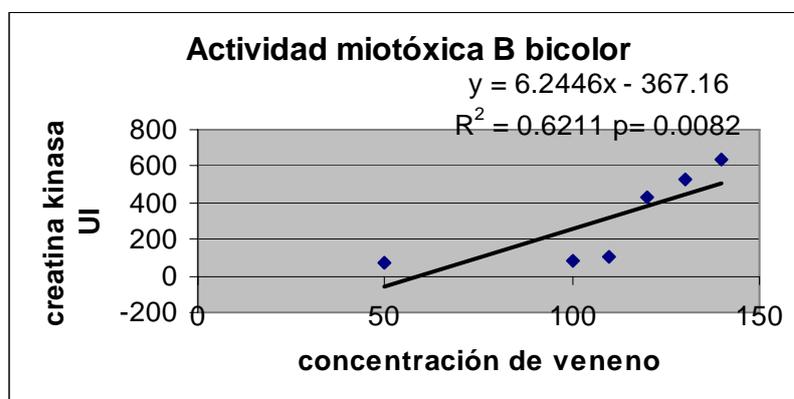
Concentración veneno µg/mL	Ln concentración de veneno	Actividad creatina kinasa U/L
100	4.60	88
110	4.70	99
120	4.80	427
130	4.86	525
140	4.94	642
PBS 0.1 mL	0	68

Fuente : Datos experimentales.

Dosis Miotóxica Mínima 68UI X 4= 272UI.

Ecuación de la recta $y = 0.06x + 98.43$

Gráfica 1



La gráfica 1 describe la actividad de la creatina kinasa plasmática, utilizando el análisis de regresión y su valor crítico de significancia, que debe ser menor de 0.05.

Tabla 3. Actividad Hemorrágica del Veneno (n=16)

μg de veneno	Logaritmo natural de μg de veneno	Diámetro de la lesión (mm)
20	3.00	4
20	3.00	4
20	3.00	5
20	3.00	6
40	3.69	6
40	3.69	7
40	3.69	7
40	3.69	8
80	4.38	10
80	4.38	9
80	4.38	9
80	4.38	10
160	5.08	12
160	5.08	13
160	5.08	13
160	5.08	12

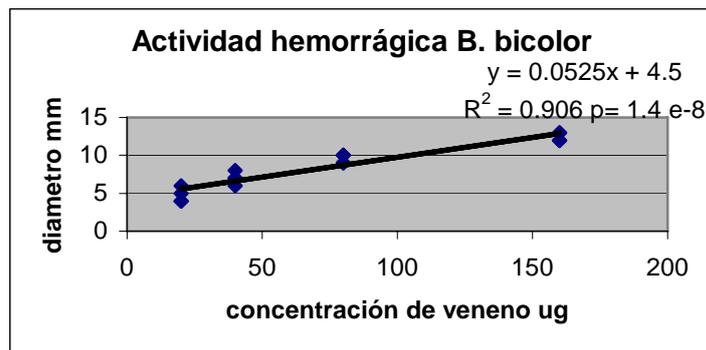
Fuente : Datos experimentales.

La tabla 3 describe la actividad hemorrágica del veneno con cuatro determinaciones por nivel encontrándose la dosis hemorrágica mínima en el nivel de 80 μg de veneno la cual induce un diámetro de 10 mm sobre la piel del ratón. Las otras determinaciones se encuentran por encima y por debajo a dicha aproximación con diferentes concentraciones del veneno.

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

DHM= Dosis Hemorrágica Mínima que provoca una lesión hemorrágica de 10mm de diámetro. DHM=80 +/-0.5

Gráfica 2



En la gráfica 2 se presenta la concentración de veneno versus diámetro (mm) en la piel de ratón.

La Tabla 4 describe la actividad coagulante del veneno en plasma humano con anticoagulante de citrato de sodio. La dosis coagulante mínima está en 15 μg de veneno la cual coagula el plasma en 60 segundos.

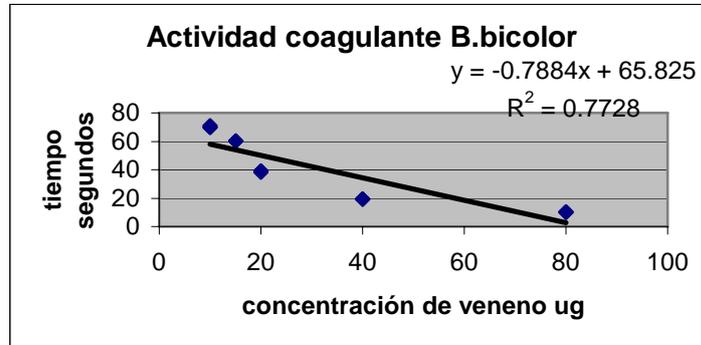
Tabla 4. Determinación de la Actividad Coagulante (n=15)

Veneno $\mu\text{g}/\text{mL}$	Tiempo (segundos)
80	10.1
80	10.5
80	10.3
40	19.5
40	19.4
40	19.3
20	38.4
20	39.0
20	38.9
15	60.2
15	60.3
15	60.1
10	70.1
10	69.8
10	71.2

Fuente: Datos experimentales

DCM=Dosis Coagulante Mínima, cantidad de veneno que coagula el plasma en 60 segundos. DCM= 15 $\mu\text{g}/\text{mL}$

Gráfica 3



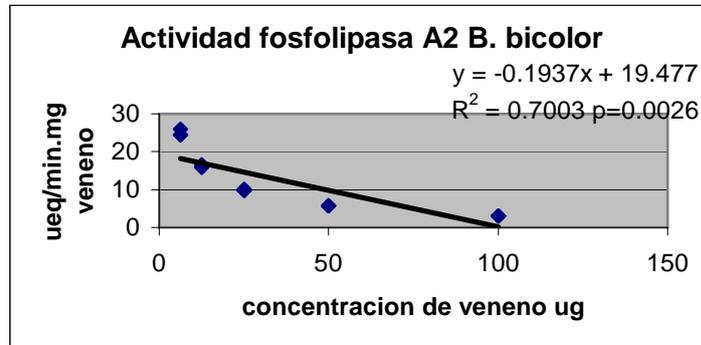
La gráfica 3 describe el comportamiento de la actividad coagulante

Tabla 5. Determinación de la actividad Fosfolipasa A₂ (n=15)

μg de veneno	μL de NaOH	μL de NaOH-μL de PBS	μeq/min.mg veneno
100	430	340	3.06
100	420	330	2.97
100	420	330	2.97
50	410	320	5.76
50	410	320	5.76
50	400	310	5.58
25	370	280	10.08
25	360	270	9.72
25	360	270	9.72
12.5	320	230	16.56
12.5	320	230	16.56
12.5	310	220	15.84
6.25	270	180	25.92*
6.25	260	170	24.45*
6.25	260	170	24.45*

Fuente : Datos experimentales

* Para la interpretación de la tabla 5, la fosfolipasa A₂ se reporta como la dosis de veneno que provoca la mayor actividad enzimática en el sustrato de fosfatidilcolina. El rango comprendido en 6.25μg de veneno es la menor dosis con la mayor actividad promedio del rango dando como resultado 24.94 μEq/min.mg de veneno como promedio de las tres últimas determinaciones.

Gráfica 4

La actividad de la Fosfolipasa A₂ se describe en la tabla 5 con tres determinaciones por nivel encontrándose que la actividad enzimática es alta cuando el nivel de toxicidad del veneno es baja dentro de un rango de 100 a 6.25 μg de veneno (gráfica 4).

IX. DISCUSION DE RESULTADOS

B. bicolor es una de las especies de ofídios venenosos que se encuentran en el Litoral Pacífico y se distribuye desde México a Honduras por toda la cordillera volcánica. Se han identificado cuatro subespecies dentro de este mismo género las cuales son: *B. aurifer*, *B. lateralis*, *B. marchi* y *B. schlegelii* o víbora de pestañas. Estas especies de han identificado como cantil loro por sus costumbre arborícolas además poseen cola prensil y debido a su color se confunden con el follaje, pudiendo ocasionar accidentes en los miembros superiores las personas que se dedican a los trabajos agrícolas como corte de café.

Para el tratamiento del accidente ofídico en Guatemala, como única alternativa, se encuentran disponibles tres antivenenos polivalentes siendo éstos los provenientes de México, Costa Rica y Argentina. Tales antivenenos no incluyen especies del género *Bothriechis* donde la letalidad reportada en la presente investigación es similar a la *Bothrops nummifer* (mano de piedra) realizado por Rojas *et al* (1986) en el Instituto Clodomiro Picado. La DL_{50} reportado para la *B. bicolor* guatemalteca es de 122.7 mg/ratón, donde el veneno se inoculó por vía intraperitoneal y se observaron las muertes por 48 horas. La dosis letal de *B.nummifer* (Honduras) es de 127 mg/ratón *B. asper* (barba amarilla) es de 64 mg/ratón, *Agkistrodon bilineatus* (cantil de agua) de 22 mg/ratón y la más letal es *Crotaluss durissus durissus* (cascabel) con 16 mg/ratón (24).

Para la determinación de la actividad miotóxica los animales control fueron inyectados solamente con PBS y se determinó el valor de la CK para luego calcular la Dosis Miotóxica Mínima que es cuatro veces el valor reportado en las determinaciones donde se utilizó únicamente PBS. La Dosis Miotóxica Mínima (DMM) para *B. bicolor* es de 272 UI. El daño tisular fue evidente en ratones Webster observándose el sangrado de los animales por nariz, boca y oídos.

La obtención de sangre de los ratones para efectuar la DMM, se realizó a través del corte de cola (extremo final)

La dosis hemorrágica para *B. bicolor* es de 80 $\mu\text{g/mL}$, 7 veces menos potente que el de *B. asper* (barba amarilla) con 11 $\mu\text{g/mL}$ (Saravia *et al.* 2,000) que es una de las serpientes más venenosas de Centroamérica y la que tiene mayor incidencia en accidentes ofídicos por año en nuestro país (9). *Crotaluss durissus durissus* (cascabel) posee una actividad hemorrágica de 5.08 $\mu\text{g/mL}$ (Guevara *et al.*2,000) siendo 16 veces más potente que *B. bicolor*.

La actividad coagulante del veneno de *B. bicolor* determinado en éste estudio es de 15 $\mu\text{g/mL}$ en tanto que para *B. nummifer* (mano de piedra) es de 19.5 $\mu\text{g/mL}$ (16).

Para la *Crotaluss d.d.* (cascabel) la actividad coagulante reportada es de 19.58 $\mu\text{g/mL}$ (Guevara *et al.* 2000) resultando muy similar a la mano de piedra. De lo anterior puede decirse que *B. bicolor* posee una mayor actividad coagulante de los dos especies mencionadas por lo que resulta ser una característica para ésta especie. Solamente *B. asper* (barba amarilla) posee una mayor actividad coagulante con 3.9 $\mu\text{g/mL}$ (Saravia *et al.*, 2000).

La actividad Fosfolipasa A_2 determinada para *B. bicolor* es de 24.94 meq/min.mg, en tanto *B. nummifer* es de 20 meq/min.mg, *Crotaluss d.d.* es de 11.52 meq/min.mg, *B. asper* de 24 meq/min.mg . La actividad de ésta enzima se vincula con los efectos miotóxico, cardiotoxico, hemorrágico, hemolítico, edematígeno y agregación de plaquetas entre otros (16). El veneno de *B. bicolor* resultó tener una actividad de Fosfolipasa A_2 , muy similar a las especies más representativas del país, con excepción a la cascabel (11.52 meq/min.mg).

Este estudio demostró que la potencia del veneno de *B. bicolor* posee algunas actividades tóxicas similares a las de las especies de mayor relevancia del país.

X. CONCLUSIONES

A. El efecto letal del veneno de *B. bicolor* expresado como la dosis letal media (DL₅₀) es de 122.12µg/ratón con I. C. del 95% de (113-131.32).

B. La actividad mitotóxica del veneno de *B. bicolor* expresada como la dosis mitotóxica mínima (DMM) es de 272 UI.

C. La actividad hemorrágica del veneno de *B. bicolor* expresada como la dosis hemorrágica mínima (DHM) es de 80 µg de veneno.

D. La actividad coagulante del veneno de *B. bicolor* expresada como la dosis coagulante (DCM) es de 15µg/mL .

F. La actividad Fosfolipasa A₂ de *B. bicolor* es de 24.94µEq/min.mg

XI. RECOMENDACIONES

- A. Evaluar los antisueros comercialmente disponibles en el país contra el veneno de *B bicolor*, para estar seguro de la efectividad de éstos en el tratamiento del envenenamiento por esta serpiente.
- B. Ampliar los estudios sobre la actividad de la Fosfolipasa A₂ en modelos animales, (ratones Webster).

VIII. REFERENCIAS

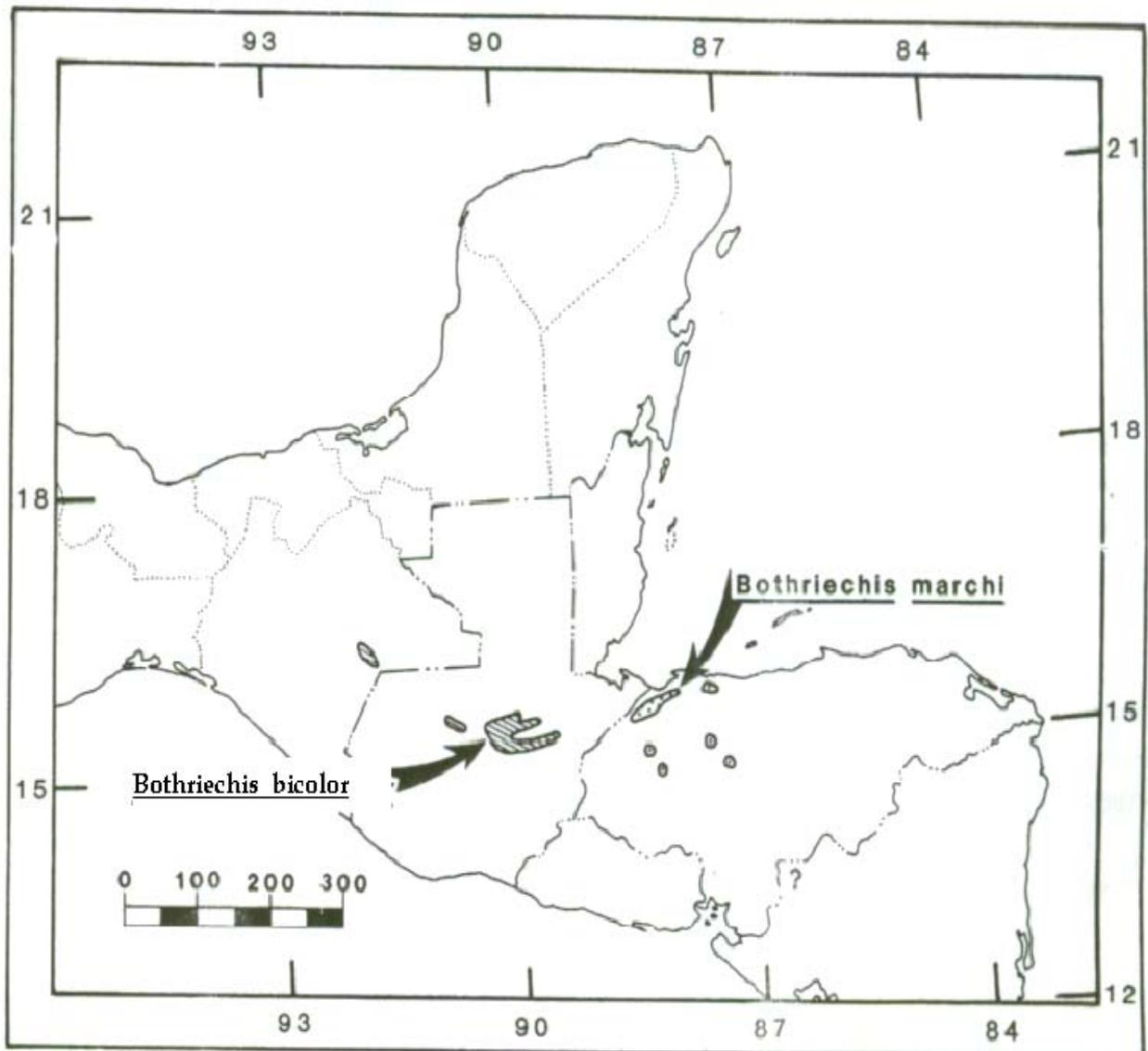
1. Campbell J W. Amphibians and reptiles of northern Guatemala, the Yucatan and Belize. 2.ed. Oklahoma: University of Oklahoma Press 1998. (p.41-45) 340 pp.
2. Web site : Instituto Clodomiro Picado. Universidad de Costa Rica . Facultad de Microbiología. Consultado 2 Junio 2002. Disponible en [http// cariari.ucr.ac.cr](http://cariari.ucr.ac.cr).
3. Warrel DA, Fenner PJ. Venemous bites and stings. 2.ed. USA: Med Bull Press, 1993. (p.423-439) 450 pp.
4. Hardy DL. *Bothrops asper* (Viperidae) snakebite and field researches in middle America . USA: Bothropica Press, 1994. (p.26-29) 40 pp.
5. Diaz CA *et al.* Isolation and characterization of basic myotoxic hospholipasas A2 from *Bothrops godmani* snake venom. 3. Ed USA: Arch, of Bioch Biophy, 1992; Vol 1(p.135-142) 145 pp..
6. Meir J. Individual and age-dependent variations in the venom of the ferdelance (*Bothrops atrox*) ,Toxicon ,1986.(p. 24- 395) 400 pp.
7. Taborska E, Kornalik F. Individual variability of *Bothrops asper* venom. 3 ed USA: Prince Press,1985. (23-26) 55 pp. .
8. Rojas Gustavo *et al.* Neutralización de las actividades tóxicas y enzimáticas de cuatro venenos de las serpientes de Guatemala y Honduras por el antiveneno polivalente producido en Costa Rica . Revista de Biología Tropical , 1987;Vol 1:(p. 59-67) 109pp.
9. Valdés de García AM. Estudio de la calidad de los sueros antiofídicos disponibles comercialmente en Guatemala. Memorias IV Congreso Nacional del Colegio de Farmacéuticos y Químicos de Guatemala ,1999.
10. Campbell JW. A las nuevas del pitviper arboreo Versant de America Central Norteña , Revista de Biologia Tropical 2000;vol 48: (p. 1001-1013) 1200 pp..
11. Alvarez del Toro MJ. Los reptiles de Chiapas. 3 ed. México: Colección de libros de Chiapas, 1984.
12. Sabiston DC. Tratado de Patología Quirúrgica 13 ed. México: Editorial Internacional , 1986.(p.229-230) 250 pp..
13. Van den Brule. Ofidios Venenosos de Guatemala. Centro de estudios conservasionistas (CECON) Serie documentos ocasionales N. 2 1982.

14. Gutiérrez *et al.* Mionecrosis, hemorragia y edema inducidos por el veneno de *Bothrops asper* en raton blanco. *Toxicon*, 1980 ;(p. 603-610) 660 pp..
15. Gutiérrez J, Rojas G, Aymerich R. El envenenamiento ofídico en Centroamérica Fisiopatología y tratamiento . Instituto Clodomiro Picado Universidad de Costa Rica C.A. (p.89) 120 pp.
16. Chávez JJ. Caracterización farmacopatológica del veneno de Mano de Piedra , *Atropoides nummifer* (Rupell, 1845, squamata, Viperidae) y evaluación de la capacidad neutralizante de dos sueros antiofídicos polivalentes distribuidos en Guatemala:Universidad de San Carlos de Guatemala (tesis de graduación, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia) 2001. 67 p.
17. Bolaños R. Serpientes, venenos y ofidismo en Centroamerica . Editorial Universidad de Costa Rica, Costa Rica, 1984.
18. Kochva E, Groves JD. The venom gland of *Vipera palestinae* with comments of the gland of some other viperines, *Acta. Anat.*, 1966 (p. 62-365).
19. Beiber AL . Metal and nonprotein constituents in snake venoms 3.Ed.USA: Berlin Springer , 1979.
20. Gutiérrez J M. Clinical Toxicology of snake bite in Central America in hand book of clinical toxicology of animal venoms and poisons. 2ed USA: . Meier Eds. CRC Press , 1995;(p. 645-665) 700 pp..
21. Barret AJ. The clases of proteolytic enzymes, plant proteolitic enzymes, dalling MJ. Ed. Boca Raon, CRC Press 1, USA 1986.
22. Thomas R , Pough H. The effect of the rattle snake venom on digestion of prey, *Toxicon* , 1979; p221
23. Low BW, Corfied PW. Acetylcholine receptor a toxin bindin site-theoretical and model studies., *Asia PacificJ. Pharmacol* 1990, pp 115.
24. Guevara C I. Caracterización toxicológica del veneno de la serpiente de cascabel (*Crotaluss durissus durissus* Lineaus, 1758, Viperidae) y evaluación de la potencia neutralizante de los sueros antiofídicos disponibles en Guatemala. Universidad de San Carlos de Guatemala (tesis de graduación, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia.) 2,000. 51 p.
25. Reippel O *et al.*. A review of the origin of snakes *Evolutionary Biology*.2.ed USA: Plenum Press, New York 1988
26. MartinsThais V. Caracterización de las actividades bioquímicas y biológicas de los venenos de algunas subespecies de *Bothorps neuwedi* Wagler. Trabajo Científico Instituto Butantán Sao Paulo Brazil. 1999.

27. Castañeda P, Valdés de García AM. Ofidismo en Guatemala. Estudio Epidemiológico de la incidencia por mordeduras de serpientes reportados en el Hospital Regional de Cobán en los años 1993, 1994 y 1995. Guatemala: Colegio Valle Verde (tesis de graduación) 1995. 58p.
28. Gené JA., Robles A. Determinación de la dosis letal media por el método de Sperman Karber. Revista Médica del Hospital Nacional de Niños. Costa Rica 1987; 22, 35-40.
29. Gutiérrez JM, Arroyo O, Bolaños, R. Mionecrosis, hemorragia y edema inducidos por el veneno de *Bothrops asper* en ratón blanco. Toxicon, 1980; 18: 603-610.
30. Theakston Reid HA. Development of simple standard assay procedures for the characterization of snake venoms. World Health Organization 1983; 61: 949-956.
31. Gené JA, Roy A, Rojas G. Comparative study on coagulant, defibrinating fibrinolytic and fibrinogenolytic activities of Costa Rican crotalinae snake venoms and their neutralization by a polyvalent antivenom. Toxicon 1989; 27: 841-848.
32. Kondo *et al.* Studies on the quantitative method for the determination of hemorrhagic activity of Habu snake venom. Japan J. Med. Sci. Biol. 1960; 13: 43-51.
33. Dole VP. A relation between non-esterified fatty acids in plasma and the metabolism of glucose. Journal of Clinical Investigation 1956; 35: 150-154.

Anexo 1

Distribución de *Bothriechis bicolor* en Guatemala



(Campbell J A, Lamar W. The venomous reptiles of latin America Cornell University Press , USA 1989)

Anexo 2

Preparación de reactivos

1. Solución salina amortiguada con fosfatos pH 7.2 (PBS)

Na₂ HPO₄ 2H₂O.....0.31 g

Na₂ HPO₄ 12 H₂O.....2.86 g

NaCl..... 7.65 g

Ajustar a 1 Litro

Ajustar pH a 7.2

Autoclavear 20 minutos a 15 lb/pulg

2. Sustrato para determinar la actividad fosfolipasa A₂

Colocar 10 mL de yema de huevo sin burbujas en una probeta con 50 mL de Buffer Tris HCL CaCl₂ y tritron X-100 al 1%.

Homogenizar bien el sustrato.

3. Mezcla de extracción para determinar la actividad fosfolipasa A₂

Isopropanol (2 propanol).....40 partes

Heptano.....10 partes

H₂SO₄ concentrado.....55µL/100 mL.

4. Mezcla de titulación para determinar la actividad fosfolipasa A₂

a) Etanol 90% en agua destilada + Azul de Timol (0.01%).

b) Guardar en frasco ámbar cubierto con papel aluminio.

Anexo 3

Preparación de niveles veneno/ antiveneno para la neutralización de la actividad letal de los venenos (prueba de potencia)

Nivel (mg/ mL)	Antiveneno (mL)	PBS (mL)	veneno (mL)	ratones por dosis
2.0	1.05	1.65	1.50	6
3.0	0.70	2.00	1.50	6
4.5	0.47	2.23	1.50	6
controles	-----	2.70	1.50	6

