ESTUDIO QUÍMICO Y DE TOXICIDAD DEL VENENO DE SERPIENTES DE LA FAMILIA VIPERIDAE *Bothrops atrox* MANTENIDAS EN CAUTIVERIO EN EL SERPENTARIO DE LA UNIVERSIDAD DE LA AMAZONIA.

JACSSON MURILLO PALACIOS

EKSON FERNEY PRADA ZARTA

UNIVERSIDAD DE LA AMAZONIA
FACULTAD DE CIENCIAS BASICAS
PROGAMA DE BIOLOGIA CON ENFASIS EN BIORRECURSOS
FLORENCIA – CAQUETA
2009

ESTUDIO QUÍMICO Y DE TOXICIDAD DEL VENENO DE SERPIENTES DE LA FAMILIA VIPERIDAE *Bothrops atrox* MANTENIDAS EN CAUTIVERIO EN EL SERPENTARIO DE LA UNIVERSIDAD DE LA AMAZONIA.

JACSSON MURILLO PALACIOS

EKSON FERNEY PRADA ZARTA

Trabajo de grado presentado como requisito parcial para optar al título de Biólogo con énfasis en Biorrecursos

DIRECTOR
WILSON RODRÍGUEZ PEREZ
QF MSc

UNIVERSIDAD DE LA AMAZONIA
FACULTAD DE CIENCIAS BASICAS
PROGAMA DE BIOLOGIA CON ENFASIS EN BIORRECURSOS
FLORENCIA – CAQUETA
2009

NOTA DE ACEPTACION

_____

_____

_____

_____

_____

PRESIDENTE JURADO

_____

JURADO

DEDICATORIA

Dedico este trabajo ante todo a Dios por permitirme realizar cada una de mis metas y objetivos propuestos hasta hoy, y por darme una excelente familia; que con gran sacrificio y esfuerzo han retribuido en mí, una base de valores y principios para forjarme una luz de esperanza en el futuro ……

También dedico este gran logro, a cada una de esas personas que estuvieron cerca, para tenderme sus manos como voz de aliento y esperanza en momentos difíciles, por aconsejarme y guiarme en un camino arduo y laborioso.

Por ultimo quiero dedicarme este triunfo como el más importante en mi vida hasta hoy, pues lo recordare como el inicio hacia un mejor futuro y desempeño como persona……

Ekson Ferney Prada Zarta

Dedico este trabajo primero que todo a Dios quien es quien nos brinda la vida a mi familia mi madre sabina palacios mena que ha sido mi fortaleza y mi guía, a mi abuela Ana dolores, mi tía maría dolores y a mi mujer Leidy Sofía y mi hija dulce samary que han sido motivo de inspiración y fuerza durante todo este tiempo.

Jacsson murillo palacios

AGRADECIMIENTOS

De ante mano le damos las gracias a Dios, por brindarnos la oportunidad de estar viviendo esta etapa en nuestras vidas.

A cada una de nuestras familias, por todo ese apoyo, esfuerzo y sacrificio que nos manifestaron para llevar a cabo este primer escalón y logro en nuestras vidas

Queremos agradecer a cada uno de los docentes de la universidad de la amazonia por su apoyo incondicional en la ejecución de este trabajo; al profesor Fernando Ignacio Ortiz, por su paciencia y constante colaboración en este proyecto; al profesor Wilson Rodríguez, por su atención, cooperación y disposición en esta propuesta; y demás profesores como: Aristo Rodríguez, Jaime E. Velásquez, Clemencia Serrato, Emy Jhoana Cruz, entre otros, que de una u otra forma contribuyeron para sacar este trabajo adelante.

También agradecemos de forma específica a Laboratorios PROBIOL; en cabeza de la Doctora Martha Gómez Cabal, por su atención y colaboración, a nuestros compañeros Dina lucia, Johana serrato, Diego morales, Handerson, Juan Carlos Iván Sandoval, y a los del grupo de semillero del serpentario.

Por ultimo, pero no menos importante, a Sergio Daniel cubides quien fue quien nos brindo confianza para empezar a labrar este camino para conseguir nuestra meta.

TABLA DE CONTENIDO

	Pág.
RESUMEN	10
ABSTRACT	11
INTRIDUCCION	12
2. PROBLEMA	14
3. JUSTIFICACION	15
4. OBJETIVOS	16
4.1 Objetivo general	*16*
4.2 Objetivos especifico	16
5. REVISION DE LITRATURA	17
5.1 Familia viperidae	17
5.1.2 Venenos de la familia viperidae	17
5.1.3 Importancia del veneno	18
5.2 Bioquímica y clasificación enzimática de los venenos de serpientes	18
5.3 Composición de venenos de otros animales	20
5.4 Métodos de separación y cuantificación de proteínas	20
5.5 Característica general, habitad y comportamiento de Bothrops atrox	23
5.5.1 Distribución de la especie en Colombia	23
5.5.2 Estudios en venenos de Bothrops atrox	24
5.6 Dosis letal media (DL50)	25
5.6.1Clasificación del veneno de Bothrops atrox de acuerdo a los aspectos biomédicos y efecto causado a los humanos.	26
6. METODOLOGIA	*27*
6.1 Área de estudio	27
6.2 Material biológico	28
6.2.1 Adecuación del animal	28
6.2.2 Clasificación taxonómica del animal	*28*
6.2.3Toma de muestra de veneno	*28*
6.2.4 Secado de la muestra	29
6.3 Análisis químico	29
6.3.1 Determinación de PH	29
6.4 Determinación de proteínas totales	29
6.4.1 Método de Biuret	29
6.4.2 Determinación del límite de detección	30
6.4.3 Limite de cuantificación	30
6.4.4 Porcentaje de recuperación	30

6.4.5 Determinación del porcentaje de humedad 30

6.5 Análisis electroforético
6.5.1 Determinación del peso molecular de las proteínas del venenos de Bothrops atrox en estado juvenil y adulto por electroforesis en geles de acrilamida 30

6.6 Análisis de toxicidad 31
6.6.1 Determinación de la DL50 del veneno de Bothrops atrox. 31
7. RESULTADOS Y DISCUSION 32
8. CONCLUSION 47
9. RECOMENDACIÓN 49
10. BIBLIOGRAFIA 50
11. ANEXOS 59

LISTA DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Curva de calibración por el método de Biuret.	29
Tabla 2. Características morfometricas de los individuos de *Bothrops atrox*	34
Tabla3. Análisis químico y físico del veneno de *Bothrops atrox*.	34
Tabla4. Pesos moleculares y abundancia relativa de proteínas en veneno de serpientes juveniles de *B. atrox.*	38
Tabla 5. Pesos moleculares y abundancia relativa de proteínas en veneno de serpientes adultas de *B. atrox.*	39
Tabla 6. Relación del estado de desarrollo de las serpientes estudiadas del género Bothrops con la abundancia relativa (%) de las distintas fracciones proteicas encontradas en el análisis electroforético.	41
Tabla 7. Dosis letal media (DL_{50}).	45

LISTA DE GRAFICAS

	Pág.
Figura 1. Ejemplar de *Bothrops atrox.*	24
Figura 2. Área de estudio y captura de los individuos en estudios.	27
Figura 3. Toma de muestra del veneno.	28
Figura 4. Electroforegrama del marcador molecular.	34
Figura 5. Electroforegrama correspondiente a la muestra de veneno de serpiente joven especie *Bothrops atrox.*	36
Figura 6. Electroforegrama correspondiente a la muestra de veneno de serpiente joven especie *Bothrops atrox.*	36
Figura 7. Electroforegrama correspondiente a la muestra de veneno de serpiente joven especie *Bothrops atrox.*	37
Figura 8. Electroforegrama correspondiente a la muestra de veneno de serpiente adultas especie *Bothrops atrox.*	37
Figura 9. Electroforegrama correspondiente a la muestra de veneno de serpiente adultas especie *Bothrops atrox*.	37
Figura 10 Electroforegrama correspondiente a la muestra de veneno de serpiente adultas especie *Bothrops atrox.*	38
Figura 11. Electroforegrama simulado virtual.	40

RESUMEN

En la Universidad de la Amazonia, en Florencia, Caquetá, se llevó a cabo un estudio con el objetivo de determinar las características físico-químicas y la dosis letal media del veneno de tres serpientes juveniles y tres adultas de la especie *Bothrops atrox* mantenidas en cautiverio en el serpentario de la Universidad. Entre las serpientes juveniles y adultas de *B. atrox* no se observó diferencia en la cantidad de veneno seco o fresco expulsado, ni en la cantidad de sólidos totales del veneno y tampoco en el valor de pH. En cuanto al contenido de proteína se observó un incremento en la cantidad de proteína producida al avanzar el estado de desarrollo del animal. Del análisis electroforético se determinó que, independientemente del estado de desarrollo de los ejemplares, hay predominio de las fracciones proteicas con peso molecular entre 21 a 40 KDa, conformando casi el 51% de la mezcla total. En el caso de juveniles, se observó predominio de fracciones proteicas de 71 a 100 KDa conformando el 25 a 35 % de la mezcla. En el caso de adultos, se observó predominio de fracciones proteicas de 101 a 120 KDa correspondientes al 29 a 34 % de la mezcla. Del pool de venenos de *B. atrox* evaluados se estableció que la dosis letal media es de 63.8 µg/ratón (3.36 mg/kg) y determinada por vía intraperitoneal en ratones *Mus musculuss.*

Palabras clave: *Bothrops, dosis letal, veneno, electroforesis capilar, Biuret*

ABSTRACT

At the University of Amazonia, in Florencia, Caquetá, a study was carried out in order to determine the physical and chemical characteristics as well as the mean letal dose of the venom from three young and three adults individuals of *Bothrops atrox* snakes kept in captivity. Amongs the adult and juvenile snakes, no diferences in the quantity of fresh or dry venom produced was observed, or in the quantity of total solids nor in the pH value. The protein content was increased with the maturity state of the snakes. The electroforehic analysis indicated that, independently of the state of maturity, the protein fractions with molecular weight between 21 and 40 KDa, were dominant, conforming about 51% of the total mixture. The venom of the younger snakes showed dominance of the protein fractions with molecualr weight between 71 and 100 Kda, conforming from 25 to 35 % of the mixture. In adults, the dominance was for the proteins with molecular weight between 101 and 120 Kda, corresponding from 29 to 34 % of the mixture. From the pool of venoms evaluated it was established that de mean letal dose of the *B. atrox* venom is 63.8 µg/mouse (3.36 $mg.kg^{-1}$) as determined intraperitoneally in *Mus musculuss* mice.

Keywords: *Bothrops*, letal dose, venom, capilar electrophoresis, Biuret

INTRODUCCION

Los venenos de las serpientes que pertenecen a la familia viperidae, están químicamente compuestos de una gran cantidad de constituyentes orgánicos (proteínas y muchos tipos de enzimas) (Klauber, 1972); Algunas de estas proteínas tienen actividad enzimática, entre las que se destacan las enzimas proteolíticas y las de tipo fosfolipasa (Pantigoso, *et al,* 1996).

Asimismo algunas de estas enzimas o proteínas provenientes del veneno de serpientes están constituidas por un grupo molecular heterogéneo con diversas propiedades físicas y bioquímicas, encontrándose así tanto proteínas como glicoproteínas con pesos moleculares que oscilan entre 5.000 y más de 10.000 de peso molecular, con presencia o ausencia de actividades enzimáticas (Kini, 1990); hasta la fecha pudiéndose aislar y clasificar ciertas enzimas en grupos de miotoxinas de bajo y alto peso molecular como las de tipo fosfolipasas A2, hemorraginas y de acuerdo a su actividad enzimática en proteasas, L- amino oxidasa, fosfodiesterasa, fosfolipasas, quinogenasa, e hialurodinasas (Gómez, *et al,* 2000).

Ciertas de estas proteínas son de carácter tóxico y característico del género *Bothrops* - causantes de necrosis, hemorragias, edema, y problemas en la coagulación sanguínea (Ohsaka *et al* 1966). En la cual Durante los últimos años, se ha observado que diversas miótoxinas han sido aisladas, habiéndose encontrado que todas son de naturaleza básica y que constituyen un grupo de proteínas estructural y antigénicamente relacionadas con las fosfolipasas, las cuales son enzimas de naturaleza ácida, pero que no producen daño al músculo esquelético, Sin embargo este grupo de toxinas difieren, estructural y funcionalmente, del grupo de miotoxinas de muchas especies (Gutiérrez & Lomonte, 1997).

Para el análisis y un estudio complejo de los componentes de los venenos de serpientes, la electroforesis es una técnica relativamente simple, rápida y de alto valor informativo. Su aplicación en la identificación de proteínas ha sido empleada en estudios de taxonomía, fisiología y genética de plantas, animales y microorganismos. La electroforesis también puede ser empleada en la determinación de pesos moleculares de proteínas y en la caracterización de moléculas como los ácidos nucleicos DNA y RNA (Alfenas y col., 1998).

Durante los últimos años se han realizado diversos estudios sobre caracterización de venenos de serpientes por electroforesis, permitiendo entender y clasificar de forma más detallada caracteres morfológicos, genéticos y moleculares, de estos animales (Stanchi, *et al.* 1999).

Dentro de la especifidad de los venenos y la variación existente en cuanto a su composición y acción a un dentro de una misma especie; Los venenos deben ser sometidos a estudios toxinológicos y farmacológicos mediante un procedimiento que permita evaluar la letalidad del veneno y la dosis en microgramos capaz de matar al 50% de los animales o comúnmente llamada dosis letal media (DL50). Esta técnica es utilizada para todas las pruebas de toxicidad y en este caso para cuantificar la potencia del veneno (OMS, 1991) citado por Sarmiento en el (2006).

2. PROBLEMA

Dado que una de las problemáticas mas concurridas en los cuadros clínicos producidos por mordeduras de serpientes es la diversa sintomatología producida por los venenos, se hace evidente que estas secreciones ofídicas causantes de tal efecto, puedan sufrir grandes variaciones - aun en individuos de la misma especie - debido a factores ambientales externos tales como: clima, altitud, humedad, tipo de presas disponibles, entre otros; así como también otros factores internos: sexo, edad, ciclo hormonal, nutrición, estado de salud y condiciones de bienestar - animales en cautiverio - (Charry-Restrepo, 2007), lo cual reafirma que las variantes en la composición química de estas sustancias son consecuencia del proceso de síntesis proteica a nivel glandular y los mecanismos que controlan dicho proceso molecular (Russell, 1983; Yarlequé, 2000).

Por consiguiente, se ha demostrado que existen variaciones en la composición química de los venenos, las cuales están sujetas a factores biogeográficos y climáticos, además de los específicos, razón por la cual, por ejemplo, los sueros antiofídicos norteamericanos son ineficaces frente al veneno de serpientes suramericanas y viceversa (Charry-Restrepo, 2007).

Silva-Haad (1981) y recientemente Otero, *et al* 2007 y (Charry-Restrepo 2007) reportan a las serpientes del género *Bothrops,* como el agente agresor de mayor importancia médica, causante del 95% de los accidentes ofídicos en la región amazónica.

Varios estudios sobre caracterización tóxica de venenos de serpientes se han realizado en el mundo (Bush 1999, Health Organization, World 1981; Theakston & Reid, 1983), sin embargo, solo se dispone de pocos estudios sobre actividades enzimáticas y tóxicas del veneno de *Bothrops atrox* en Colombia (Núñez, 2005).

A la fecha, no se cuenta con información específica sobre las características químicas y tóxicas de los venenos de esta especie en el departamento del Caquetá.

3. JUSTIFICACION

Anualmente en el mundo se presentan alrededor de 5.400.000 envenenamientos ofídicos, donde en Latinoamérica se estiman 150.000 envenenamientos ofídicos anuales y 5.000 muertes por esta causa (Ministerio de Protección Social. 2006) en la que Colombia el Sistema de Vigilancia Epidemiológica (SIVIGILA) en el 2005 reportó 2.161 casos de envenenamientos ofídicos confirmados clínicamente con mayor incidencia en las regiones de la Orinoquia, atlántica y la centro oriental (Ministerio de Protección Social. (2006); & Otero, *et al,* (1990).

La gravedad del accidente depende en gran parte de la toxicidad de los compuestos del veneno de la serpiente y su relación con el hábitat; ello explica las variaciones farmacológicas halladas para un mismo género y especie proveniente de regiones geográficas diferentes (Gutiérrez *et al*., 1980; Jiménez-Porra, 1985).

En la actualidad, los estudios de caracterización químico, molecular y de actividades toxicas y electroforéticos en los venenos de serpientes, son necesarios para el mejor entendimiento de los procesos bioquímico y fisiopatológícos que se producen posterior a su mordedura, además de ayudar a evaluar el potencial neutralizante de los sueros antiofídicos utilizados para tratar este tipo de envenenamientos (Roodt, *et al* 2005).

En la realización de este estudio se podrá contar con una información confiable sobre los contenidos de proteína, separación electroforética y un análisis detallado sobre la actividad toxica de la especie *Bothrops atrox* en etapa juvenil y adulta para el departamento del Caquetá, esta información tendrá relevancia tanto desde el punto de vista científico como médico y biológico, para el mejor entendimiento y tratamiento clínico del accidente ofídico.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

Aportar al estudio químico y tóxico de los venenos de ***Bothrops atrox*** (pelo de gato) serpiente de la familia viperidae mantenidas en cautiverio en el serpentario de la Universidad de la Amazonia

4.2 Objetivo especifico

- Determinar el pH y contenido de proteína presente en el veneno de ejemplares juveniles y adultos de *Bothrops atrox.*

- Determinar el peso molecular aproximado de las fracciones proteicas del veneno de la especie *Bothrops atrox* en estado juvenil y adulto.

- Determinar la dosis letal media (DL 50) a un pool de venenos.

5. REVISION DE LITERATURA

5.1 FAMILIA *VIPERIDAE*

Según Patiño, *et al* 2002. Las serpientes en Colombia poseen una amplia distribución y se encuentran desde los 0 hasta 3000 msnm. En áreas de diversa vegetación, ubicándose especialmente en zonas cálidas y algunas zonas selváticas. Para Colombia se han identificado aproximadamente 224 especies de serpientes de las cuales 43 son venenosas pertenecientes a las familias elapidae, Hidrophidae y Viperidae; Donde Charry en el 2006 reporta para la familia Viperidae seis géneros con 17 especies y 5 subespecies. (Maldonado & Silva Haad, 2007) reportan siete géneros con 18 especies.

Dentro de las características generales encontramos qué poseen cabeza de forma triangular con múltiples escamas pequeñas, presencia de fosetas termorreceptoras, dentición de tipo solenoglifa, ojos con pupila elíptica vertical, escamas quilladas y rugosas, cuerpo de forma semi – triangular, cola corta y reproducción ovivípara y ovípara (*Lachesis muta)* (Charry, 2006).

Silva-Haad (1981); y Otero, *et al*, (2007) reportan que el genero Bothrops es el principal causante del accidente ofídico en Colombia, dentro de los cuales están presentes las siguientes especies: *Bothrops asper, B. atrox, B. microphtalmus, B. brazili, B. pulche, B.venezuelensis, B. colombiana, B. xanthogrammus* (Charry, 2006).

5.1.2 Los venenos de la familia Viperidae

Durante los últimos años varios autores han hecho un aporte en cuanto a la definición del veneno como es el caso de (Vidal 1976. Mebs 1989) Los venenos de serpientes son las secreciones más ricas en enzimas y toxinas en la naturaleza y están compuestos por múltiples moléculas tóxicas; los venenos de las serpientes que pertenecen a la familia Viperidae tienen una composición química muy compleja, con presencia de diversas toxinas y enzimas que afectan múltiples procesos fisiológicos (Rojas et al. 2001).

Los envenenamientos provocados por estas serpientes se caracterizan por sus efectos locales y manifestaciones sistémicas. Los primeros se caracterizan por la aparición de edema, el cual constituye el efecto más común en envenenamientos por serpientes de la familia Viperidae. (Lomonte 1994, Lomonte et al. 1993, Rojas et al. 2001).

Los efectos generales se manifiestan mediante cuadros hemorrágicos sistémicos, coagulopatías, choque cardiovascular e insuficiencia renal (Rojas, *et al,* 2001). Citados por Araya en el 2004.

Los cuales Según Kochva (1987)**;** El veneno tiene tres efectos principales que pueden variar en intensidad según la especie, edad y ubicación geográfica de la serpiente.

Necrosante: se produce por la acción de miotoxinas.
Coagulante: se debe a la acción de enzimas procoagulantes sobre la protrombina y el factor X.
Hemorrágico: se ocasiona por daño en el endotelio vascular.

Según Ownby (1982); en sus estudios ha demostrado que la inestabilidad química de los venenos se debe a factores como la localización geográfica, edad de la serpiente, letalidad, cantidad, época del año y la composición del veneno dependiendo de la especie.

5.1.3 Importancia del veneno de serpientes

Las serpientes son importantes por varias razones: son responsables de una efectiva limitación de las poblaciones de roedores silvestres y diversos invertebrados incluyendo insectos (Sánchez, 1998). Otro aspecto importante es que se ha demostrado que su veneno es útil en medicina por sus propiedades antibacteriales o en el tratamiento de algunas hemorragias graves (Flores Villela, 1980; Blaylock, 1999). En la parte económica se destaca que la obtención de su veneno es útil en la producción de antivenenos además de los beneficios económicos derivados de su venta (Zertuche, 1981; Burelos, 1994).

El veneno de serpiente tiene atributos beneficiosos en el trato de varias condiciones fisiopatológicas. Las enzimas del veneno de cobra son una promesa en el tratamiento y/o prevención de las enfermedades de Parkinson's y Alzheimer (Barker, *et al*, 2000; Zhao & Yeh, 2001) y el veneno de las serpientes de la familia Viperidae ha sido demostrado en la reducción de tumores (Marcinkiewicz, *et al,* 2003). Por lo tanto, los perfiles de proteínas específicas del veneno de serpientes pueden tener implicaciones enormes para la medicina.

5.2 BIOQUÍMICA Y CLASIFICACIÓN ENZIMÁTICA DE LOS VENENOS DE SERPIENTES

Chippaux & Gyffton, (1998); Pérez & Sánchez, (1999) en su investigación reportan que los venenos atendiendo criterios fármaco-cinéticos se pueden clasificar en toxinas o enzimas, dados estos criterios hay componentes de venenos que muestran ambos tipos de actividad; (Pineda, 2002; & Klaasen, *et al*, 1996) el veneno de las serpientes está compuesto de proteínas, polipéptidos y sustancias tanto proteicas como no proteicas, dentro de las proteicas encontramos las

fosfolipasas que son polipeptidos o proteínas heterogéneas, las cuales estas moléculas se componen de 118 a 124 aminoácidos con un peso molecular aproximado de 10.000 a 50.000 Dalton, y son responsables del aumento de permeabilidad celular incrementando los edemas e hipotensión (Rosemberg, 1979).

Las proteasas están constituidas en grupos de péptidos dentro de las proteínas, que actúan de forma enzimática en los venenos de los Vipéridos, a su vez estas se clasifican según el lugar donde se encuentre el péptido:

- Las endopeptidasas, las cuales son Glicoproteínas de peso molecular que oscila entre los 21.000 a los 95.000 Dalton, y son los causantes de la hidrólisis de un gran número de substratos como la caseína, hemoglobina, elastina, el colágeno, fibrinógeno entre otros.

- Las exopeptidasas, son de tipo péptido altamente tóxicas, los cuales se encargan de la hidrólisis de los oligopeptidos; e intervienen en procesos hemostáticos.

- Arginina – Ester hidrolasas, son glicoproteínas que producen hipotensión aumentando la permeabilidad capilar, ayudando a la formación de edemas.

- Las Kinogenasas, propias de la familia Viperidae y Crotalinae; provocan hipotensión, permeabilidad vascular; Las cuales son responsables del dolor (Detrait, 1987)

Otro grupo son las hialurodinasas aislada de *lachesis muta* lo cual se trata de una glicoproteína de estructura unicatenaria con un peso molecular de 65 kilodalton y corresponde a una proteína básica el cual facilitan la difusión de los principios bioactivos, desde su lugar de inoculación hasta los órganos o sitios diana (Hurtado, *et al* 2007).

Desintegrinas componen una familia de inhibidores de la agregación plaquetaría (Blobel y White, 1992; McLane, *et al,* 1998) según (McLane, *et al*, 1998) ellas son proteínas de bajo peso molecular y formada de 49-84 aminoácidos. Así Gould (1990) propone un sistema de clasificación de las desintegrinas en tres sub familias según su longitud; Desintegrinas cortas con una longitud de 48 o 49 residuos aminoacídicos, desintegrinas medias entre 70 a 73 residuos aminoacídicos, desintegrinas largas de 83 u 84 residuos aminoacídicos.

Según (McLane, *et al,* 1998) Existen otros tipos de desintegrinas en venenos de serpientes, las diméricas cuyo peso molecular oscila entre 13 y 15 kDa, y la monomérica en la que cada cual actúa farmacológicamente de forma diferente.

Otra familia son las L-amino-acido-oxidasa las cuales son oxidoreductasas de naturaleza glicoproteica con un peso molecular aproximado de 100.000 Dalton compuesta de sub unidades y un grupo prostético de flavin- adenin-dinucleotido ellos hidrolizan los aminoácidos y los transforman en o-cetonico por esta razón son utilizados para la identificación de isómeros ópticos y los aminoácidos de tipo L-ácidos-amino (Detrait 1987).

Encontramos otra familia de enzimas como las metaloproteasas que han sido divididas en cuatro clases (PI a PIV) de acuerdo a sus masas moleculares y organización de dominios estructurales (Bjarnason and Fox, 1994).

(Gay *et al* 2004). Aisló del veneno de *Bothrops alternatus* del nordeste argentino una hemorragina acídica correspondiente a una metaloproteasa ácida perteneciente probablemente al grupo P-III (55 KDa); compatible con una alternagina, aislada por Souza y col (2000) del veneno de *Bothrops alternatus* de Brasil.

5.3 COMPOSICIÓN DE VENENOS EN OTROS ANIMALES

La mayoría de los venenos de las arañas tienen funciones químicas bien definidas, siendo sus principales componentes las proteínas de tipo hidrolasas, lipasas e hialurodinasas (Lévano & Fernández 2004) asimismo el veneno de los ápidos (abejas) contiene fosfolipasas A_{2-1}, hialuronidasa, apamina, melitina y cininas. En el caso de véspidos (avispas), su veneno contiene fosfolipasas, hialurodinasa y una proteína que se denomina antígeno5. En cuanto a los lagartos, como *Heloderma suspectum*, su veneno se parece al de algunos crótalos y contiene serotonina, arginina esterasa, hialuronidasa, fosfolipasa A2 y una o dos calicreínas salivales (Secretaria de higiene y seguridad laboral, 2005).

La mayoría de las toxinas del veneno de escorpiones son componentes derivados de proteínas pequeñas (Loret & Hammock, 2001). Estos poseen un alto contenido de cisteina, glicina, tirosina, y lisina, así como aminoácidos carboxílicos y sus aminas derivadas (Flores, 2001).

5.4 MÉTODOS DE SEPARACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS

En cuanto a las formas de separar proteínas existen métodos por:

Cromatografía de filtración en gel o tamiz molecular: es un método de separación de diferentes componentes de una muestra en función del tamaño, la **cromatografía de afinidad**, basado en la interacción selectiva antígeno-anticuerpo. **Cromatografía de intercambio iónico** que se basa en las diferencias en carga y magnitud de la carga eléctrica neta de las proteínas a un valor de pH determinado. Estas técnicas se han optimizado con la automatización, a través de

la **Cromatografía Liquida de alta eficiencia o rendimiento (HPLC)** tanto en fase normal como en la fase reversa.(http://www.javeriana.edu.co/Facultades/Ciencias/neurobioquimica/libros/celular/cromatografia.htm)

La electroforesis es la migración de solutos iónicos bajo la influencia de un campo eléctrico; Estas partículas migran hacia el cátodo o ánodo (electrodos negativos y positivos, en dependencia de una combinación de su carga, peso molecular y estructura tridimensional. Estas técnicas son de alta sensibilidad, poder de resolución y versatilidad, y sirven como método de separación de mezclas complejas de ácidos nucleicos, proteínas y otras biomoléculas, donde aportan un potente criterio de pureza. (García, 2000).

La electroforesis en geles de poliacrilamida (PAGE) es una de las técnicas más utilizadas y atractivas para la determinación de sustancias complejas por permitir un mayor poder de resolución, amplia variación en el diámetro de los poros, cuantificación de la concentración proteica, determinación del peso molecular y de la actividad enzimática, a través de las técnicas de densitometría (Gontijo y Césare, 1995). Sin embargo, estos monómeros son compuestos extremadamente tóxicos en solución, y requieren de un manejo muy cuidadoso por parte del usuario (Salazar, 2000) encontramos también la **electroforesis bidimensional** Dicha técnica permite la separación de cientos o miles de proteínas ("spots") en un único gel, mostrando un patrón característico. (www.proteored.org)

La determinación del peso molecular (PM) de proteínas mediante SDS-PAGE es válida cuando se analizan cadenas proteicas individuales (subunidades), en donde se han reducido todos los enlaces disulfuro y por ende, se ha distendido toda la cadena proteica para su interacción con el SDS. Bajo estas condiciones, la migración de las moléculas obedece fundamentalmente a su PM.

Ultra centrifugación: separa proteínas por fuerza centrifuga. (Martz, 1971),

De otro lado, con respecto a los métodos para cuantificar proteínas tenemos varias opciones dependiendo de la solubilidad de los distintos tipos de proteína:

Biuret: se basa en la formación de un complejo coloreado entre el cobre y los grupos NH de los enlaces peptídico en medio alcalino. **Bradford:** se basa en la unión de un colorante, commassie blue a las proteínas. **BCA:** el acido bicinconinico, sal sódica, es un compuesto capaz de formar un complejo púrpura intenso con iones Cu. **Lowry**: esta depende de la reacción de tirosina y triptófano de la muestra el cual consiste en dos reacciones; primero en la reacción de biuret, y después la reacción de follin que junto con los complejos Cu^{+2} reducen el reactivo de folin generando un color azul. **Kjendhal** es un método que determina proteína total en una muestra luego de digestión de la muestra, destilación y absorción del amoniaco y valoración (Fernández & Galván 2001).

Se puede hacer una determinación directa de proteína en **ultravioleta** con lectura a 280 nm, aunque es una metodología generalmente usada para monitorear la separación y purificación de proteínas (Yarlequé, 2008).

López, *et al*, (1999). Realizaron un estudio cromatográfico, electroforético, y enzimático del veneno total de *Bothrops venezuelensis.* Donde por medio de la cromatografía de exclusión molecular se observaron cuatro fracciones diferenciadas, en la cual la fracción I y II, presentan la mayor concentración de proteínas y peso molecular, en tanto al perfil electroforético el veneno presento un total de 12 bandas proteicas, con pesos moleculares entre 10.000 y 61.500 dalton.

Un estudio comparativo de la composición bioquímica del veneno en serpientes venenosas de Aguascalientes, realizado por Gómez, *et al,* (2000). Determino bajo un análisis de electroforesis en SDS – PAGE el peso molecular y actividad biológica de los grupos enzimáticos comunes en los Crotálidos, en 25 muestras de veneno, en la cual los pesos moleculares oscilaban entre 5 y 70 KDa; pertenecientes a grupos enzimáticos como Miotoxinas de bajo peso molecular que van desde los 5 a 8KDa, miótoxinas con actividad fosfolipasa A_2 entre los 10 a 25 KDa, y por ultimo las hemorraginas que se encuentran entre 30 a 70 KDa.

Isla, *et al,* (2003). Mediante un estudio se caracterizo bioquímicamente y se determino la acción biológica de una hemorragina del veneno de *B: brazili.* En donde Se purifico una hemorragina del veneno a través de dos pasos cromatográficos en Sephadex G-100 y CM Sephadex C- 50, usando buffer acetato de amonio 0,05M pH 7. En este último sistema, la proteína fue eluida con NaCl 0,3M y el análisis electroforético en PAGE-SDS mostró una sola banda proteica.

Investigaciones como la de Acosta de Pérez, *et al,* en el (2004). Con el aislamiento y caracterización parcial de fosfolipasa A_2 del veneno de *Bothrops alternatus*. Para el aislamiento y purificación de la fosfolipasa se empleo el método de cromatografía de filtración molecular en tres etapas, el primero a través de una columna de Sephadex G-75 0.8 x 36 cm, para la segunda una cromatografía de filtración en gel, en una columna de Sephadex G25 0,8 x 20 cm, y para la ultima etapa se empleó una columna de DEAE-Celulosa de 1.0 x 5.0 cm.

Estudios como el de Gay, *et al,* en el (2004). Aislaron y caracterizaron una hemorragina acídica del veneno de *Bothrops alternatus*, en donde se logro el aislamiento de la enzima mediante el método de cromatografía de intercambio aniónico; para la detección de proteínas eluídas y el análisis de actividad proteolítica y hemorrágica se realiza bajo la técnica de espectrofotometría, la caracterización y purificación de la enzima con mayor actividad hemorrágica fue determinada por el método de electroforesis SDS-PAGE con un peso molecular de 55 KDa aproximadamente.

Otros análisis como el de Roodt, *et al.* (2004). Permitieron la caracterización de actividades toxicas de venenos de serpientes correspondientes a los géneros *Micrurus, Crotalus y Bothrops*. En donde se realizaron estudios de electroforesis *SDS* para la determinación de peso molecular, en donde los venenos de los vipéridos presentaron componentes desde los 83 KDa a 6.5 KDa. En condiciones reductoras, En Micrurus mostró un patrón muy diferente al de los vipéridos, observándose la mayor cantidad de material por entre los 16.5 y 6.5 KDa. La potencia letal de los venenos fue de 2.3 + 0.5 µg/g para *Micrurus*. Para los *Crotalus* fue de 2.3 + 0.5 µg/g *a* 10.6 + 2.8 µg/ y de 2.9 + 0.2 µg/g para *Bothrops*. Todos los venenos mostraron actividad de fosfolipasa $A_{2.}$

Nuevos estudios realizados por Barona, *et al.* (2004) frente a venenos de escorpiones, analizando aspectos toxicológicos e inmunoquimicos del veneno del escorpión de *Tityus pachyrus* de Colombia. Donde por electroforesis (SDS-PAGE) se demostró que el veneno contiene proteínas desde menos de 14 KDa hasta 97 KDa

5.5 CARACTERÍSTICA GENERAL, HABITAD Y COMPORTAMIENTO DE *BOTHROPS ATROX*

La especie *Bothrops atrox* es la más importante en Varias regiones, debido a su abundancia es de color café variando la tonalidad de acuerdo a la región de donde provenga, con manchas en forma de triángulos divergentes hacia la región ventral La cola es corta y la escama terminal es puntiaguda (Patiño & Blanca 2002) esta serpiente puede llegar a medir hasta 2 metros de longitud, Su hábitat habitualmente son bosques tropicales, pluviales trópicos y premontanos. En su estado natural es casi invisible camuflada en la hojarasca y Su actividad es crepuscular y nocturna (Maldonado & silva-haad, 2007) la clasificación taxonómica se encuentra en el (anexo 4)

5.5.1 Distribución geográfica

Según Maldonado & silva-haad, (2007) la espacie *Bothrops atrox* en Colombia se encuentra distribuida en las regiones de la Orinoquia y Amazonia. Son conocidas con los nombres de talla x, veinticuatro, cuatro narices, pudridora, pelo de gato, en el Perú como jergón y en la Argentina como cabeza de lanza en Brasil como macagua, en ecuador como rabo de hueso y pitalala. (Figura 1).

Figura 1 Ejemplar de *Bothrops atrox* Tomada del serpentario de la Universidad de la Amazonia

5.5.2 Estudios químicos en venenos de *Bothrops atrox.*

Trabajos como el de Lazo, *et al (*2007); en el cual aislaron una flavoproteína del veneno de *B. atrox* con actividad antimicrobiana que produjo un marcado halo de inhibición en el crecimiento de *Staphylococcus aureus, Streptococcus faecalis* (Gram positivas), así como en *Vibrio cholerae* bacteria (Gram negativa); otro aporte importante es la acción de esta enzima in vitro sobre promastigotes de *L. braziliensis*, y contra epimastigotes de *T. cruzi*.

Asimismo lazo et al (2007) determinaron las propiedades bioquímica de una L-aminoacido-oxidasa de la misma especie anterior en la cual la enzima se aisló por dos pasos cromatograficos, una por columna de filtración molecular y la otra por intercambio cationico estableciéndose que la enzima es homodimérica, y por electroforesis que tiene un peso molecular aproximado de 127 KDa, constituida por dos subunidades de 63 KDa, las cuales tienen al menos un enlace disulfuro, y con un pH en el rango acido de 5, aparecen otras determinaciones como termoestabilidad, donde la enzima soporto una temperatura hasta de 55^0C. Y de carbohidratos asociados con un 17% de azucares totales.

Oviedo (2000) determinó un nuevo ensayo para la detección del anticoagulante lúpico (AL) con veneno de *Bothrops atrox* diluido (d*Bat*), comparado con cuatro ensayos de coagulación fosfolípidodependientes; logrando evidenciar un diagnóstico más detallado en las reacciones de la coagulación y detección de

patologías como el síndrome antifosfolípido (SAF) ya sea éste primario o secundario a lupus eritematoso sistémico (LES) principalmente.

Otros trabajos de aislamiento y caracterización parcial de una miotoxina del veneno de *Bothrops atrox* realizada por Huatuco, *et al,* 2004. La determina como una proteína básica con un peso molecular de 27 KDa, estando formada por dos cadenas polipeptídicas, además esta miotoxina presento algunas actividades de tipo fosfolipasa, anticoagulante y edemática, pero no hemolítica.

5.6 DOSIS LETAL MEDIA (DL50)

Según Charry en l (2006), muchas veces se ha comprobado experimentalmente que los productos biológicos de origen animal como lo son los venenos de las serpientes son mucho menos estables que los productos biológicos de origen vegetal; debido a que se trata de productos de excreción o exudación de glándulas, que están sometidas a cambios metabólicos que sufre el animal en el medio en que vive (clima, humedad, alimentación, entre otros.). Así mismo los venenos de la serpiente están también sometidas a variaciones sometidas significativas en su poder toxico. Donde Trethewie & Thomas, (1969). Afirman que el modo de desecación y condiciones de conservación del veneno son factores a tener en consideración a la hora de evaluar la toxicidad de un veneno.

Según Detrait & Saint Girons, (1986). En la variabilidad en la dosis letal puede llevar a la creación de especie y subespecie.

Cuando se trata de producir suero antiofídico es necesario obtener los venenos de las serpientes que causan accidentes con mayor frecuencia en la zona geográfica donde éste será utilizado y determinar la toxicidad de su veneno mediante el cálculo de la Dosis Letal media (DL_{50}) (Bouchot, 1994; Ferri, 1992), la cual es expresada como la cantidad de veneno que es capaz de matar el 50% de la población, dentro de un periodo de observación de 24 a 48 horas. Donde Según la OMS, en (1981) es necesario que cada país establezca sus propios parámetros para la producción y regulación de los antivenenos donde se compruebe el estado letal de cada lote de veneno utilizado y posteriormente se confirme el potencial neutralizante de cada lote de antivenenos.

Según Gómez, (2003) estas mismas variaciones hacen que determinar la dosis efectiva (DE50) o el volumen de suero antiofídico que neutraliza el 50% del efecto toxico del veneno de una especie en particular sea muy difícil, por esto en la práctica se debe determinar la dosis letal de cada lote de veneno, incluso luego de haber determinado muchos lotes y siempre bajo el mismo método ya que es la única forma en que se puede confiar totalmente en la capacidad neutralizante de un suero antiofídico.

5.6.1 clasificación del veneno de *Bothrops atrox* de acuerdo a los aspectos biomédicos y efecto causado a los humanos.

Clasificación local sistémica.

Leve

• Edema que compromete hasta dos segmentos de la extremidad y que no compromete el tronco
• Incremento en el diámetro de la extremidad < 4 cms
• No necrosis, • No hemorragia, • No hay sangrados, • No hay compromiso hemodinámica, • No hay complicaciones

Moderado

• Edema que de 3 o más segmentos que no comprometen el tronco, • Incremento en el perímetro de la extremidad > 4 cms, • Hemorragia local activa, • No hay necrosis, • Gingivorragia, hematuria u otro tipo de sangrado (que no comprometa SNC), • No hay compromiso hemodinámico.

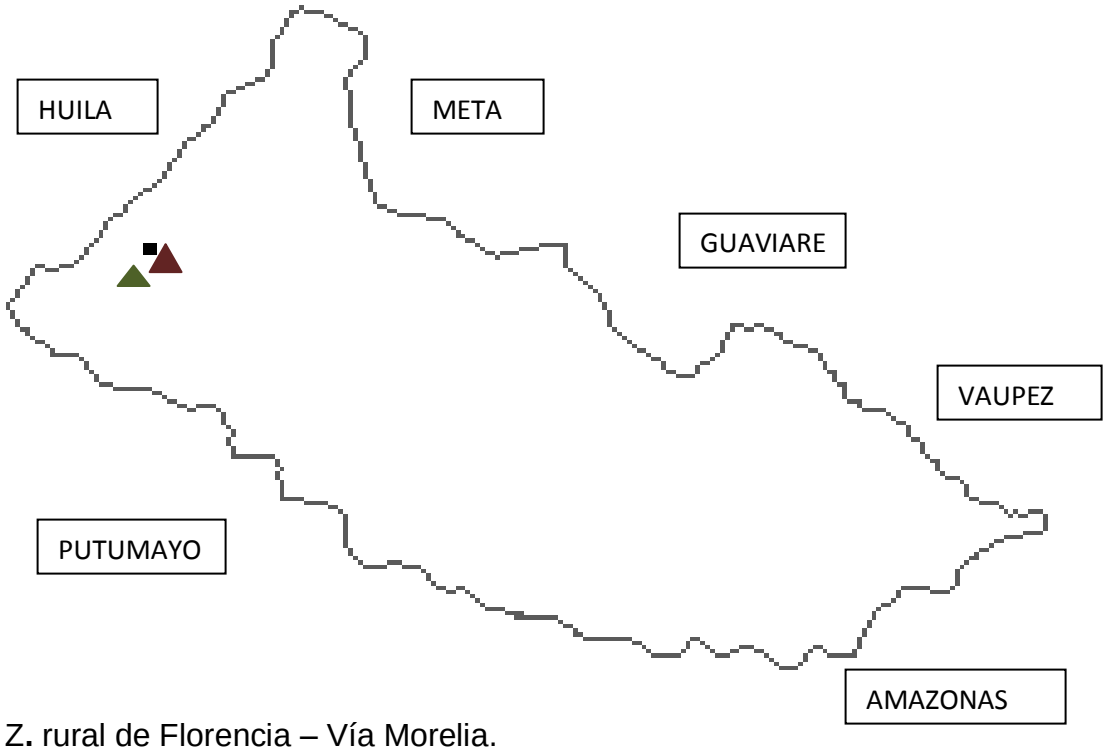
Grave

• Edema de toda la extremidad, con extensión al tronco, cara o cuello, • Mordeduras en cara o cuello, • Necrosis, • Ofidios mayores de 1 metro o por viboreznos (recién nacidos), • Compromiso hemodinámica, • Presencia de complicaciones como coagulación intravascular diseminada, insuficiencia renal aguda, sangrado del SNC, • Convulsiones tempranas (Dirección Seccional de Salud de Antioquia, 2005).

6. RECURSOS Y METODOLOGIA

6.1 AREA DE ESTUDIO

Los ejemplares utilizados son provenientes de distintos zonas rurales del municipio de Florencia (Ver figura 2), mantenidos en cautiverio en el serpentario de la UNIAMAZONIA sede centro, donde se realizó la clasificación taxonómica, adecuación de los ejemplares, toma de la muestra de veneno y secado de la misma. En el laboratorio de Nutrición, de la sede principal de la UNIAMAZONIA, se llevó a cabo la determinación de proteína. El análisis de electroforesis se realizó en el Departamento de Farmacia de la Universidad Nacional sede Bogotá y los estudios de dosis letal 50 (DL_{50}) se llevaron a cabo en el Laboratorio PROBIOL sede Bogotá.



▲ Z. rural de Florencia – Vía Morelia.
(1) Juvenil y (2) adultos.

▲ Cofema Florencia
(1) Juvenil

Figura 2. Ubicación de los sitios de origen y/o captura de las serpientes estudiadas del género *Bothrops*.

6.2 MATERIAL BIOLOGICO

6.2.1 Adecuación del animal

Los ejemplares de *Bothrops atrox* tanto juveniles como adultos permanecen en cautiverio en el serpentario de la Universidad de la Amazonia (SUA) procedentes de varias localidades del municipio de Florencia bajo estricto control en estantes con vidrio y mantenidas con una dieta adecuada cada 25 días, bajo la responsabilidad del profesor Fernando Ignacio Ortiz; Los biomodelos utilizados para dosis letal, fueron ratones de laboratorio de la especie *Mus musculus*, los cuales fueron tratados bajo la supervisión de la Bióloga Martha Gómez gerente de laboratorios PROBIOL sede Bogotá.

6.2.2 Clasificación taxonómica de animal

La clasificación taxonómica se establece bajo algunos parámetros que establecen las claves taxonómicas de serpientes (Cambell & Lamar 2004) con ayuda del Biólogo Sergio Daniel Cubides.

6.2.3 Toma de muestra de veneno

La obtención del veneno se hizo por el método de ordeño manual como se muestra en la figura 3 cada 27-30 días de cada mes por compresión de las glándulas de veneno (Maruñak, et, al 2006); en el serpentario de la Universidad de la Amazonia sede centro, en recipiente de vidrio previamente esterilizados y pesados en una balanza analítica KERN 770 d: 0.0001g – 220g. Estas muestras fueron utilizadas para electroforesis, contenido de proteínas y dosis letal 50 (DL_{50}).

Figura 3. Toma de la muestra de veneno mediante ordeño manual de la serpiente en el serpentario de la Universidad de la Amazonia

6.2.4 Secado de la muestra

La muestra de veneno se somete a secado en una estufa WTB binder de 30 – 150^0 C, a 37ºC durante 24h a 36 horas usando vaso de precipitado de 50 mL previamente esterilizado.

6.3 ANÁLISIS QUÍMICO

6.3.1 Determinación de pH

Se utilizó una tira de color marca Merck para determinación de pH (rango de 0-14) la cual se introdujo a la muestra disuelta (primera dilución) para posteriormente tomar su lectura.

6.4 DETERMINACIÓN DE PROTEÍNAS TOTALES

6.4.2 cuantificación de proteína

6.4.3 Método de Biuret

Se utilizo solución patrón de albúmina de 5 mg/ml con Cloruro de sodio al 0.9% un Volumen final de 50 ml en donde la tabla 1 se observan las soluciones de trabajo para hallar la curva de calibración, y posteriormente se leyó la absorbancia a 540nm en un espectrofotómetro Milton Roy Company spectronic 20D. (http://www.binasss.sa.cr/revistas/rccm/v15n3-4/art4.pdf).

Tabla 1. Soluciones de trabajo para la curva de calibración

Muestra/tubo	B^1	1	2	3	4	5	6	7
	ml	ml	ml	ml	ml	ml	ml	ml
Patrón de albúmina	0.0	0.2	0.4	0.6	0.8	1.0	0.0	0.0
Muestra	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.0	1.5
Agua destilada	2.0	1.8	1.6	1.4	1.2	1.0	1.0	0.5
Biuret	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0

La muestra fue secada y disuelta en solución de NaCl 0.9%, filtrada en papel filtro cualitativo whatman tamaño de poro de 8 micras. Luego llevada a volumen para tener concentraciones de alrededor de 1 mg/ml.

6.4.4 Determinación del límite de detección

Se manejó un rango de baja concentración de 0, 0.001, 0.002, 0.004, 0.005, 0.010, 0.020, 0.040, 0.060 y 0.083 mg / ml de albumina sérica bovina (BSA)**.**

6.4.5 Limite de cuantificación

Se manejo un rango de 0, 042, 0.083, 0.167, 0.333, 0.500, 0.667, 0.833, 1.00, 1.167, 1.333 y 1.667mg / ml de albumina sérica bovina (BSA)**.**

6.4.6 Porcentaje de recuperación

Se realizaron ensayos con muestras adicionadas al 20 y al 80%, del valor experimental encontrado, en los venenos analizados.

6.4.7 Determinación del porcentaje de humedad

Se determino por diferencia de peso del vaso de precipitado pesado más muestra líquida y vaso de precipitado más muestra secada en una en una estufa WTB binder de 30 – 150^0 C, a 37ºC durante 24h a 36 horas.

6.5 ANALISIS ELECTROFORETICO

6.5.1 Determinación del peso molecular de las proteínas del venenos de *Bothrops atrox* en estado juvenil y adulto por electroforesis en geles de acrilamida

Muestra: Se utilizaron seis muestras en total del veneno de serpientes *Bothrops atrox* las cuales correspondieron a tres para los juveniles y tres para los adultos.

Cada muestra se disolvió empleando una solución de buffer fosfato de concentración 100 nanogramos de sólido por microlitro. Para cada una de las muestras se colocaron aproximadamente 400 nanogramos por carril. Se usaron en condiciones reductoras utilizando beta mercapto etanol (BME). El equipo usado para la separación electroforética realiza de manera automática el cálculo del tamaño de las bandas presentes en las muestras de veneno (1 a 6), usando como referencia las bandas del marcador (L), que tiene pesos moleculares entre 1.2, 10.0, 20.0, 25.0, 37.0, 50.0, 75.0, 100.0 y 150.0 Kda.

Condiciones de la corrida**:** La corrida se realizó en el chip Pro260 del sistema de electroforesis ultracapilar experion de Bio-rad. El rango de separación del sistema en cuanto al tamaño fue de 10 a 250 KDa empleando como referencia de respuesta lineal concentraciones de 2.5 a 2000 nanogramos por microlitro. Se empleo como referencia a la medición de concentración de proteína por azul de commassie.

6.6 ANALISIS DE TOXICIDAD

6.6.1 Determinación de la DL50 en un pool de venenos de *Bothrops atrox.*

Se pesaron 20 mg del veneno de la especie a evaluar (B*othrops atrox)* y se diluyeron en 20ml de cloruro de sodio (NaCl) al 0.9%, luego se realizaron seis niveles de concentración que se encuentran cerca de la dosis letal teórica y de la solución anterior se midió con una micropipeta el volumen correspondiente a la cantidad de microgramos de veneno suficientes para inocular 10 ratones. Completando con solución salina (NaCl) estéril hasta un volumen final de 5 ml.

Para cada dilución se tomaron cuatro ratones de la especie *Mus musculus* de peso entre 17-20 gramos de peso, y se inyectaron vía intraperitoneal 0.5 ml de cada una de las concentraciones, Los ratones inoculados de cada dilución fueron mantenidos en cajas separadas debidamente marcadas con comida y agua y con la siguiente información: Nombre de la prueba, nombre del veneno, dilución, fecha y elaborado por. Con lectura a las 48 horas a partir de la inoculación.

Los resultados se anotaron en números fraccionarios, donde el numerador es el número de ratones muertos y el denominador el numero de ratones inoculados por dilución.

A los resultados obtenidos se les aplico la formula estadística para dosis letal 50, Sperman Karber utilizados por los laboratorios probiol (Ver anexo 3).

7. RESULTADOS Y DISCUSION

En la tabla 2. Se muestran los caracteres morfometricos de los individuos utilizados

Tabla 2. Carácter morfometrico de los individuos

Individuo	sexo	Peso (gr)	Longitud total (mm)	Longitud cola (mm)	Cabeza (mm)	Radio (mm)
Juvenil	Macho	370	1050	128	33	32
Juvenil	Hembra	334	1145	132	32	33
Adulto	Hembra	453	1154	128	33	34
Adulto	Hembra	378	1170	135	35	34

En la tabla 3 se presentan los resultados de los análisis físicos y químicos obtenidos en los venenos estudiados, tales como: fecha de colecta, peso fresco y seco obtenido, pH de la primera dilución, % sólidos totales, % humedad, % proteína soluble en solución salina en base seca y húmeda y los % recuperación del método cuando se adicionó 20 y 80% de albúmina sérica bovina a las muestras previamente evaluadas.

Como se observa en la tabla 3, las serpientes juveniles de *B. atrox* estudiadas expulsan entre 10.1 a 89.1 mg de sólidos (42.53±31.07) y las serpientes adultas de la misma especie expulsan entre 8.6 a 76.0 mg de sólidos (50.45±27.00) (peso seco) en una eyección de veneno, mostrando que no hay diferencia notoria en cuanto al estado de desarrollo del animal y la masa de sólidos expulsada.

Estos intervalos son inferiores a los reportados para *B. atrox* (100 a 180 mg) de otras latitudes pero se incluyen en el intervalo general para muchas de las serpientes de las familias Viperidae y Colubridae (8 a 1000 mg peso seco) (Porges, 1953). Otras serpientes del mismo género *Bothrops* tales como (*B. alternatus*, *B. cotiara*, *B. jararacá*, *B. jararacussu*, *B. neuwiedi*) liberan sólidos entre 100 a 830 mg. Es un valor mayor comparado con *Bungarus candidus* que expulsa entre 13.6 a 30.45 mg.

Con respecto al peso fresco de veneno liberado las serpientes juveniles de *B. atrox* expulsan entre 46 a 195.1 mg, mientras que las adultas expulsan entre 35.7 y 199.8 mg. Estos resultados son similares con la serpiente *Bungarus candidus* de Tailandia que libera entre 5.8 a 255 mg de veneno fresco (Chanhome et al. 2009)

De otro lado, el valor de pH de los venenos de *B. atrox*, tienen un carácter neutro (tabla 3) independiente del estado desarrollo de las serpientes estudiadas y el cual es similar al reportado en otras especies (Porges, 1953, Hurtado, L. *et al*, 2007, Isla, M. *et al,* en el (2003).

Con respecto a los porcentajes de sólidos totales presentes en los venenos, en las serpientes juveniles oscilan entre 11.29 a 61.3% (35.18± 22.56%) y en las serpientes adultas entre 21.95 a 44.52% (31.04±10.31), lo cual evidencia poca variabilidad entre los valores promedio y el estado de desarrollo de los animales estudiados. Estos valores de sólidos son un poco mayores con respecto a otras serpientes (25%) (http://tartaret.galeon.com/album712215.html), (Chanhome et al. 2009).

En cuanto al contenido de proteína registrado (tabla 3), en las serpientes juveniles, los valores oscilan entre 37.68 a 93.30 % (base seca, 65.19±21.58%) mientras que en las serpientes adultas vario entre 39.76 a 90.54% (base seca, 72.43±18.72) evidenciando un incremento en la cantidad de proteína producida a avanzar el estado de desarrollo del animal. Estos resultados son similares a los reportados por Malaga et al, 2000, en el cual las serpientes juveniles registraron un promedio de 70.7±10.4% y las adultas de 93.0±5.0% proteína en base seca y cuya determinación se hizo por el método de lowry y en una sola fecha.

Un estudio de Yarleque et al 2008 sobre venenos y antivenenos de serpientes del género *Bothrops* en Peru, usando tres métodos diferentes de cuantificación de proteína evidencio que los métodos de lowry y Biuret (usado en este trabajo) arrojaron valores cercanos a un 35% y 25%, respectivamente, por debajo de los que reporto el método directo a 280 nm. En un estudio comparativo de venenos de serpientes peruanas del género *bothrops* se reportaron contenidos de proteína, tales como: 78% (*B. atrox*), 74% (*B. barnetti*), 83% (*B. brazili*), 93% (*B. hyoprora*) y 69% (*B. pictus*), los cuales son ligeramente superiores a los aquí reportados (Mendoza et al 2008).

Los valores de proteína, aquí encontrados, son bajos respecto de *B. jararacá* (93.9±5%, base seca) míriam camargo guarnieri. 1992**.** Son similares al contenido de proteína del veneno total de *C. durissus terrificus* (68,6%, método de lowry) y similar al encontrado en otras serpientes peruanas de la subfamilia Crotalinae

como *Bothrops pictus* (63,8%) y *Bothrops atrox* (69,2%). Sin embargo, es menor con respecto a *C. durissus terrificus* de Argentina (81,4%) y de Brasil (76,9%) (Remuzgo 2000)

En cuanto al método de Biuret se encontró un límite de detección de 0.020mg/ml de proteína, expresado como albumina sérica bovina (BSA). Un limite de cuantificación de 1.33 mg/ml de BSA en solución salina al 0.9%. Los porcentajes de recuperación de proteína estuvieron entre el 61.8 a 90.83 % cuando se adiciono un 20% más de estándar a las muestras y entre 73.64 a 87.98 % cuando se adicionó un 80% de BSA.

Electroforesis en gel de acrilamida

La figura 4 muestra el electroforegrama obtenido de la mezcla patrón de proteínas que tiene pesos moleculares: 1.2, 10.0, 20.0, 25.0, 37.0, 50.0, 75.0, 100.0 y 150.0 KDa y en el cual se grafica unidades de fluorescencia contra tiempo en segundos. Las descripciones correspondientes al número de carril se relacionan con la figura 12.

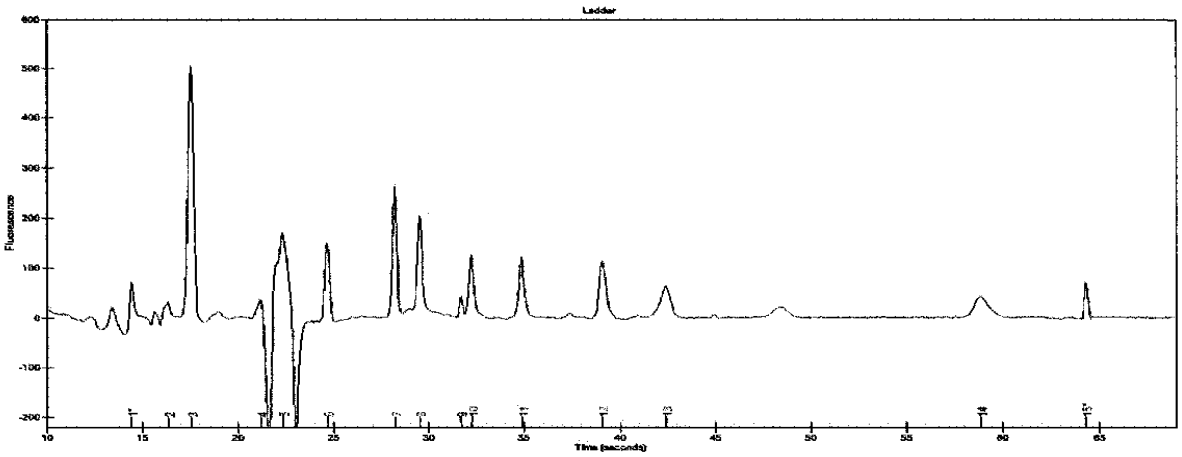


Figura 4. Electroforegrama correspondiente al marcador de peso molecular (patrones, carril L)

Tabla 3. Determinación de peso fresco, seco, pH, sólidos totales, humedad, proteína, y % recuperación de venenos de *B. atrox*

Serpiente	Fecha de colecta del veneno	Peso fresco veneno (mg)	Peso seco veneno (mg)	Peso seco veneno (mg) media ± (d.e.)	pH (primera dilución)	Sólidos totales %	Humedad %	Proteína soluble en solución salina % (b.s.)	Proteína soluble en solución salina % (Media ± d.e., b.s.)	Proteína soluble en solución salina % (b.h.)	Recuperación %	Recuperación %
											20% BSA	80% BSA
04 juvenil	04-Feb -09	---	31.8	43.76	7	---	---	93.30	67.35	---	69.71	78.96
	27- Feb-09	195.1	89.1	(46.69)	---	45.70	54.30	51.37	(22.67)	23.48		
	20-Marz-09	46.4	10.4		---	22.42	77.58	57.39		12.87		
05juvenil	04-Feb -09	---	52.1	41.3	7	---	---	63.30	67.04	---	69.7	77.8
	27- Feb-09	100.7	61.7	(27.44)	---	61.30	38.70	37.68	(25.23)	23.10		
	20-Marz-09	89.5	10.1		---	11.29	88.71	88.15		9.95		
07adulto	04-Feb -09	---	57.8	50.2	7	---	---	61.20	78.38	---	61.8	73.64
	27- Feb-09	199.8	67.2	(21.81)	---	33.63	66.37	83.42	(15.30)	28.05		
	20-Marz-09	116.6	25.6		---	21.95	78.05	90.54		19.87		
08adulto	04-Feb -09	---	67.5	50.7	---	---	---	80.76	66.46	---	90.63	87.96
	27- Feb-09	170.7	76.0	(36.70)	---	44.52	55.48	39.76	(23.14)	17.70		
	20-Marz-09	35.7	8.6		---	24.09	75.91	78.87		19.00		
M1adulto	27- Feb-09	34.4	26.9		---	78.20	21.80	28.19		22.04		

A continuación se presentan los electroforegramas obtenidos para cada una de las muestras de veneno evaluadas (Figuras 5 a 10)

Como se observa, los perfiles electroforéticos son muy similares entre serpientes y varían muy poco con respecto al estado de desarrollo del animal.

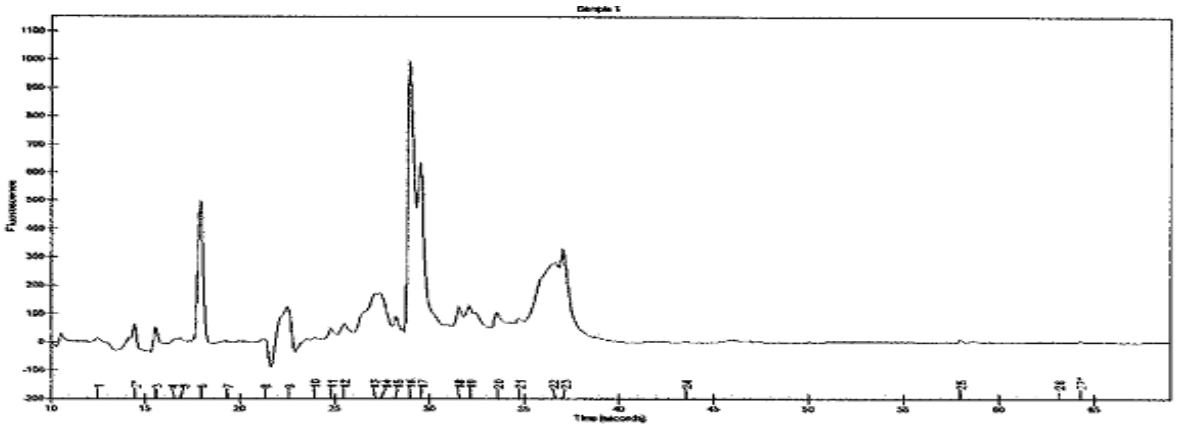


Figura 5. Electroforegrama correspondiente a la muestra de veneno de serpiente joven especie *Bothrops atrox* (carril 1)

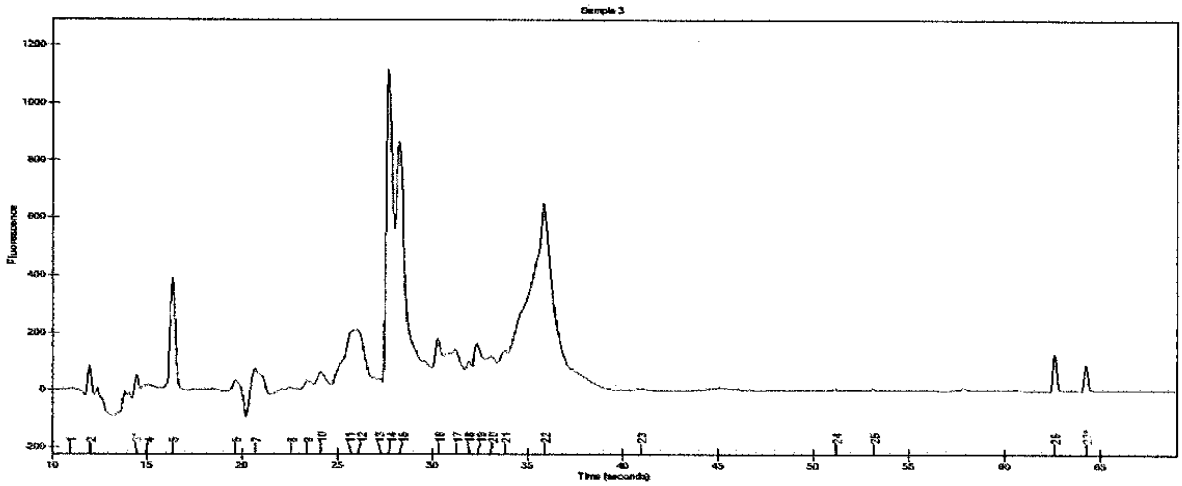


Figura 6. Electroforegrama correspondiente a la muestra veneno de serpiente joven especie *Bothrops atrox* (carril 3)

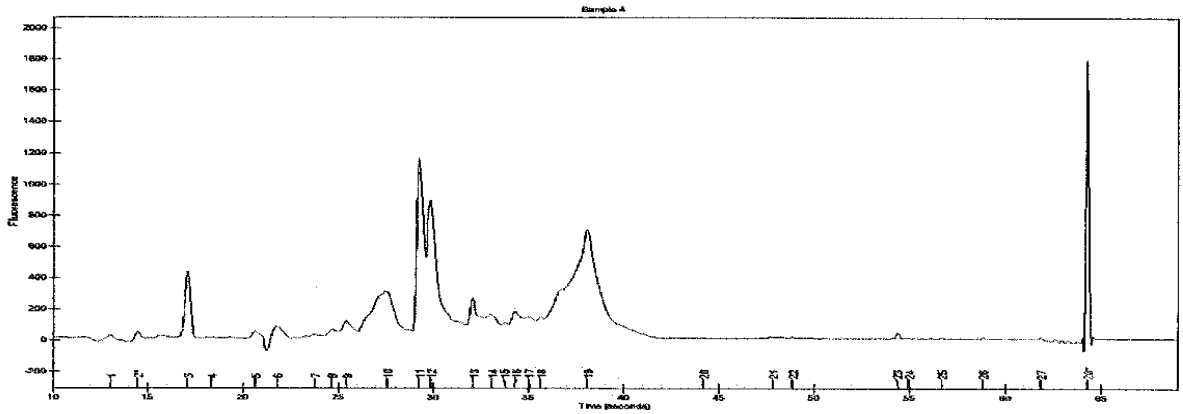


Figura 7. Electroforegrama correspondiente a la muestra de veneno de serpiente joven especie *Bothrops atrox* (carril 4)

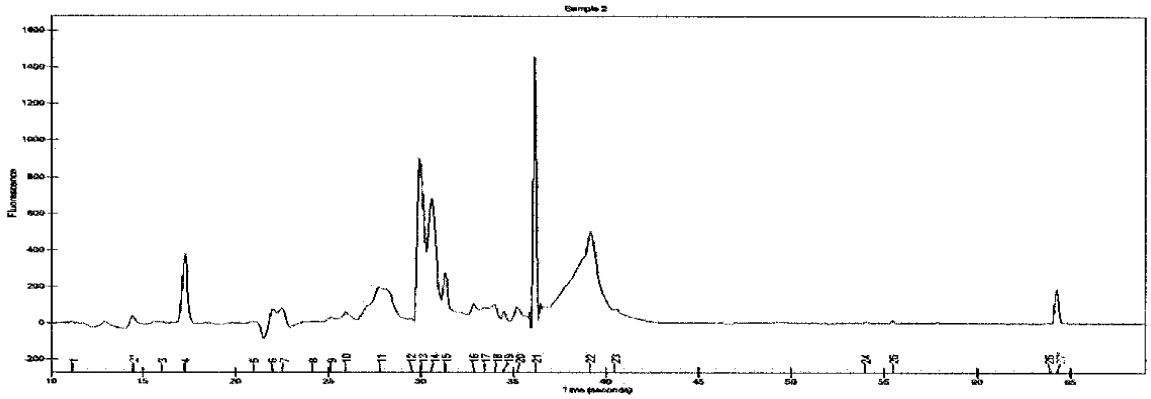


Figura 8. Electroforegrama correspondiente a la muestra de veneno de serpiente adulta especie *Bothrops atrox*-(carril 2)

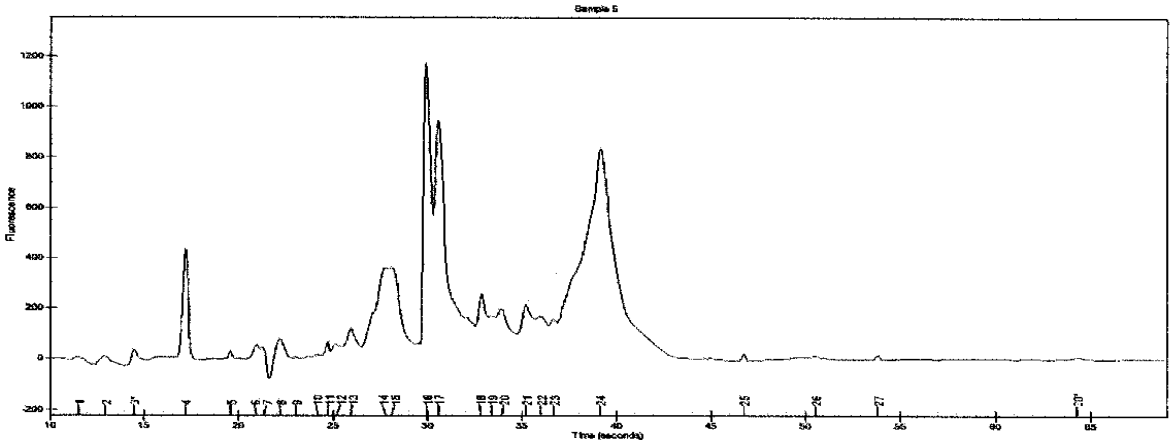


Figura 9. Electroforegrama correspondiente a la muestra veneno de serpiente adulta especie *Bothrops atrox* (muestra 5)

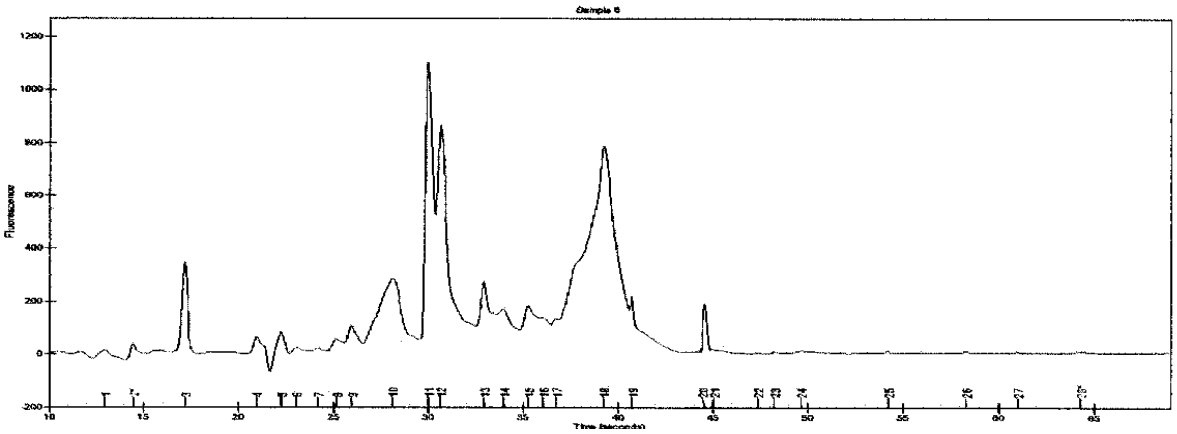


Figura 10. Electroforegrama correspondiente a la muestra de veneno de serpiente adulta especie *Bothrops atrox* (carril 6)

Cada electroforegrama anterior obtenido para cada veneno de serpiente juvenil y adulta analizado permite determinar el número de fracciones proteicas, peso molecular (KDa) respectivo y abundancia relativa (%) como se ve en las tablas 3, 4, y 5.

Tabla 4. Pesos moleculares y abundancia relativa de proteínas en veneno de serpientes juveniles de *B. atrox*

Juvenil1		Juvenil3		Juvenil4	
Peso molecular (KDa)	%total	Peso molecular (KDa)	%total	Peso molecular (KDa)	%total
10.73	5.15	10.70	0.10	9.35	1.58
20.12	1.28	14.44	0.62	19.74	1.04
21.10	2.05	17.35	1.50	21.03	2.37
23.42	7.18	21.49	5.94	24.02	14.28
23.85	5.22	21.90	5.38	34.10	14.84
24.97	1.69	24.21	16.64	38.51	19.24
32.08	20.05	25.30	22.56	49.32	4.27
37.04	19.15	40.78	2.62	58.04	2.82
46.75	2.43	45.25	2.87	64.94	0.78
49.60	5.62	48.54	1.05	69.38	2.69
63.14	4.00	51.30	2.92	76.11	2.03
73.82	1.47	58.21	2.09	79.49	1.31
85.55	15.03	65.13	2.10	93.93	32.14
87.87	9.15	80.92	32.72		

Como se observa en la tabla 4 las serpientes juveniles de *B. atrox* muestran fracciones de proteínas con peso molecular comprendido entre 9.35 a 93.93 KDa. En las serpientes juveniles 1, 3 y 4 se detectaron 14, 14 y 13 bandas, respectivamente. En juvenil 1 sobresalen las bandas 32.08 KDa (20.05%), 37.04

KDa (19.15%) y 85.55 KDa (15.03) que corresponden a mas de la mitad de la muestra. En juvenil 3 sobresalen las bandas 24.21 KDa (16.64%), 25.30 KDa (22.56%) y 80.92 KDa (32.72 %) correspondientes al 70% de la muestra. En juvenil 4 sobresalen las bandas 24.02 KDa (14.28%), 34.10 (14.84%), 38.51 (19.24%) y 93.93 KDa (32.14%).

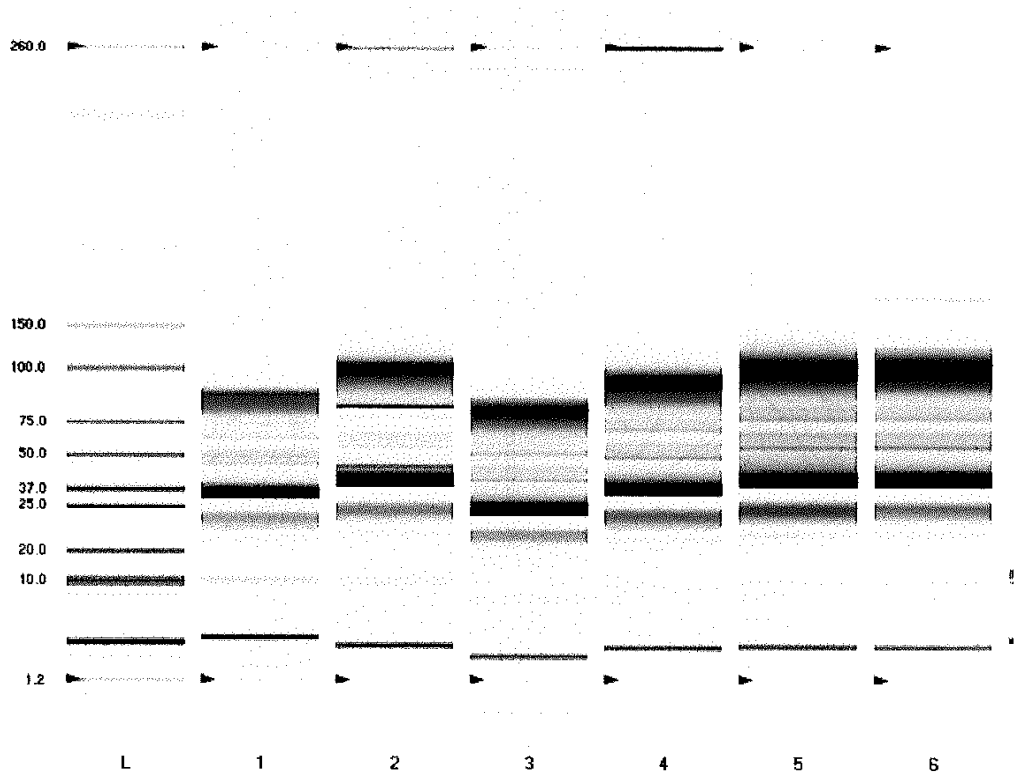
Tabla 5 Pesos moleculares y abundancia relativa de proteínas en veneno de serpientes adultas de *B. atrox*

Adulto2		Adulto5		Adulto6	
Peso molecular (KDa)	%total	Peso molecular (KDa)	%total	Peso molecular (KDa)	%total
9.59	1.47	9.78	1.34	9.85	1.21
10.59	1.61	19.96	0.55	12.89	0.36
20.59	0.79	20.60	0.88	17.75	0.27
21.71	1.77	21.68	2.23	20.64	0.93
24.34	13.00	24.37	8.23	21.73	2.02
38.99	15.78	24.84	7.19	24.83	12.45
41.95	14.40	39.01	12.81	39.31	13.92
45.71	5.65	42.12	17.72	42.45	18.34
56.34	1.58	55.92	2.69	56.73	4.43
61.60	1.56	61.00	1.43	66.46	3.72
66.87	1.80	66.08	3.61	77.34	3.30
71.08	0.69	77.05	3.10	81.81	1.42
77.15	1.54	81.80	2.32	85.97	0.92
82.74	8.33	85.61	1.15	101.70	32.09
100.36	27.03	100.49	34.42	124.74	3.35
120.66	2.32			160.99	0.91

Como se observa en la tabla 5 las serpientes adultas de *B. atrox* muestran fracciones de proteína con peso molecular comprendido entre 9.59 a 160.99 KDa. En las serpientes adultas 2, 5 y 6 se detectaron 16, 15 y 16 bandas, respectivamente. En adulto 2 sobresalen las bandas 24.34 KDa (13.00%), 38.99 KDa (15.78%) y 41.95 KDa (14.40) y 100.36 KDa (27.03%) que corresponden a casi el 70% de la muestra. En adulto 5 sobresalen las bandas 39.01KDa (12.81%), 42.12 KDa (17.72%) y 100.49 KDa (34.42%) correspondientes al 65% de la muestra. En adulto 6 sobresalen las bandas 24.83 KDa (12.45%), 39.31 (13.92%), 42.45 (18.34%) y 101.70 KDa (32.09%).

La figura 11 muestra el electroforegrama simulado automáticamente con base al cálculo del tamaño de las bandas presentes en las muestras de veneno de serpientes juveniles y adultas de B. atrox (Figuras 5, 6, 7, 8, 9, 10). Como se

indico arriba se relaciona el peso molecular de los patrones de proteína con el número de bandas de cada muestra de veneno correspondientes a un carril determinado. Así, carril L (patrones), Carril 1, 3 y 4 (veneno serpiente juvenil) y carril 4, 5 y 6 (veneno serpiente adulta)



Carril

Figura 11 electroforegrama simulado (virtual) de forma automática por el equipo Experion de Bio-Rad. Los valores dados a la izquierda del electroforegrama corresponden a los pesos moleculares en kiloDaltons (KDa).

Con el fin de visualizar mejor los datos del electroforegrama virtual (Figura 11) se presenta la tabla 5 donde se relacionan los pesos moleculares de las fracciones proteicas y el estado de desarrollo de las serpientes del genero Bothrops.

Tabla 6. Relación del estado de desarrollo de las serpientes estudiadas del género Bothrops con la abundancia relativa (%) de las distintas fracciones proteicas encontradas en el análisis electroforético

Estado	Juvenil1	Juvenil3	Juvenil4	Adulto2	Adulto5	Adulto6
Peso molecular (KDa)	Abundancia relativa (%)					
<10	0	0	1,58	1,47	1,34	1,21
10 a 20	6,43	2,22	1,04	2,4	1,43	1,56
21 a 30	16,14	50,52	16,65	14,77	17,65	14,47
31 a 40	39,2	2,62	34,08	15,78	12,81	13,92
41 a 50	8,05	3,92	4,27	20,05	17,72	18,34
51 a 60	0	5,01	2,82	1,58	2,69	4,43
61 a 70	4	2,1	3,47	3,36	5,04	3,72
71 a 80	1,47	32,72	3,34	2,23	3,1	3,3
81 a 90	24,18	0	0	8,33	3,47	2,34
91 a 100	0	0	32,14	0	0	0
101 a 110	0	0	0	27,03	34,42	32,09
111 a 120	0	0	0	2,32	0	0
>120	0	0	0	0	0	0,91

Respecto de las similitudes entre venenos, se observa en la tabla 6, que independientemente del estado de desarrollo del ejemplar de B. atrox (juvenil o adulto) hay predominio de las fracciones proteicas con peso molecular entre 21 a 40 KDa, conformando casi el 51% de la mezcla total. En cuanto a diferencias, en el caso de juveniles, se observa predominio de fracciones proteicas de 71 a 100 KDa conformando el 25 a 35 % de la mezcla. En el caso de adultos, se observa predominio de fracciones proteicas de 101 a 120 KDa correspondientes al 29 a 34 % de la mezcla.

Los resultados de la figura 11 son diferentes a los análisis electroforéticos (SDS-PAGE) reportados por Malaga et al, 2000 sobre veneno de *B. atrox* del Peru ya que en dicho trabajo se encontraron dos bandas proteicas comunes en todos los casos siendo una de ellas con pesos moleculares cercanos a 66 kDa, la cual no es mayoritaria en nuestras muestras (<4.0%) y las otras con pesos moleculares alrededor de 14,3 kDda, este último ausente en las muestras aquí evaluadas (juveniles y adultos).

El análisis electroforético (SDS-PAGE) del veneno de *Crotalus durissimuss terrificus* (Remuzgo et al, 2000) mostró un primer pico con la presencia de proteínas que migran en un rango de peso molecular de 54,2 a 103,3 kDa

aproximadamente, similar a los resultados aquí encontrados y cuyas fracciones, en todos los casos, son mayoritarias (>30%); el segundo pico mostró dos bandas de proteína con pesos moleculares aproximados de 22,5 y 14,8 kDa, bandas prácticamente inexistentes en nuestros resultados (figura 11) y el tercer pico una prominente banda con proteínas con pesos moleculares posiblemente menores a 15 kDa, similar a una banda aquí encontrada, en todos los casos, entre 1.2 y 10.0 KDa (Figura 11).

Un análisis electroforético SDS PAGE en *Bothrops alternatus* (Gay, Claudia C, *et al,* 2004) mostró una banda con la presencia de proteínas que migran en un rango de peso molecular de 45 a 68KDa aproximadamente, similar a los resultados aquí encontrados y cuyas fracciones, en todos nuestros casos, son minoritarias (aprox 7 %); una segunda banda mostró proteína con pesos moleculares aproximados de 29 a 36 kDa, las cuales son bandas mayoritarias en nuestros resultados (figura 11), una banda con proteínas con pesos moleculares posiblemente de alrededor de 24 kDa, similar a una banda aquí encontrada, en todos los casos, entre 20.0 a 25.0 KDa (Figura 11) y finalmente una banda entre 14.2 y 20 KDa, la cual es minoritaria en nuestros análisis..

Estudiando el patrón electroforético típico de cinco venenos de serpientes del género *Bothrops*: *B. atrox, B.barnetti, B. brazili, B. hyoprora y B. pictus*, de Perú (Mendoza et al, 2008), se observó que para *B. barnetti* el número de bandas fue catorce, tres de ellas menores de 66 kDa, mientras que el veneno de *B. brazili* tuvo un número de siete bandas menores a 45 kDa, comportamiento similar se vio en nuestro estudio.

Un estudio electroforético de proteínas en veneno *de Bothrops jararacá*, mostró tres bandas principales, una con un intervalo de pesos molecular de 14.2 a 20.1 KDa, minoritaria en nuestro trabajo, una segunda de aproximadamente 24 KDa, similar a las aquí encontradas, y una tercera entre 45 y 66 KDa, similar a las aquí encontradas pero en menor proporción (aprox. 7 %) (Camargo 1992)

El perfil electroforético total del veneno de *Bohrops venezuelensis* presento doce bandas proteicas con pesos moleculares entre 10 a 61.5 KDa, en las cuales ocho bandas se encuentran en el rango de 10 a 15 KDa. En nuestro trabajo se evidencio presencia minoritaria de éste último rango de pesos moleculares de proteínas.

En un estudio realizado en venenos de serpientes adultas de turquia, tales como *Vipera xanthina, Vipera ammodytes, Vipera kaznakovi, Vipera wagneri y Vipera lebetina* se registro que el veneno de estas serpientes del genero viper se componía de 10 a 12 fracciones de proteína por SDS PAGE, (Arikan et al 2003). Nuestro estudio dio un numero ligeramente mayor de bandas proteicas, tanto en serpientes juveniles como adultos de B. atrox

Minton y Weinstein (1987) establecieron que el veneno de los colúbridos contiene de siete a diez fracciones proteicas y el número total de proteínas extraídas por electroforesis es menor respecto de los viperidos. Sin embargo la secreción de Duvernoy de las serpientes colubridae es tan compleja como el del veneno de serpientes proteroglifas. El número total de fracciones proteicas es mayor en viper spp que en colúbridos. Así, se puede concluir que el veneno de viper es más complejo que el de colúbridos, como se verifico en este trabajo donde se reportan de 13 a 14 bandas de fracciones de proteínas.

En un estudio SDS PAGE de 25 serpientes del genero crótalos en México, estado de aguas calientes, específicamente de las especies *Crotalus molossus nigrescens, Crotalus scutulatus scutulatus* y *Crotalus lepidus klauber*i se observaron tres tipos de fracciones proteicas con pesos moleculares de 5 a 10 KDa, 12 a 20 KDa y 30 a 70 KDa relacionados con los grupos enzimáticos: miotoxinas de bajo peso molecular, Miotoxinas con actividad fosfolipasa A_2 y hemorraginas que son comunes de crotalidos. (Gómez, 2000). Si se observa la tabla 6 de los resultados de las serpientes juveniles y adultos de *B*. *atrox* se observa un comportamiento similar.

En un estudio en *B atrox* se aisló una miotoxina de 27 KDa (Huatuco, *et al,* 2004). Este dato correlaciona bien con los resultados obtenidos en serpientes del género *Crotalus* del párrafo anterior. Mientras que en otro estudio de *B. atrox* se aisló una L-aminoacido oxidasa de 127.9 KDa (Lazo et al 2007).

A partir del veneno de *B. asper, se* aisló una proteína (denominada aspercetina) con actividad agregante de plaquetas *in vitro* y capaz de inducir trombocitopenia al inyectarla en ratones. Se demuestra que la aspercetina es un heterodímero unido por enlaces disulfuro con un pI de 4,5 y una masa molecular de 29.759 Da. (Rucavado 2004). Según los datos de *Crotalus* (Gómez, 2000) esta proteína debería ser de tipo miotoxina. En un estudio de veneno de *Bothrops neuwiedi* colectado en los estados de Minas Gerais y Sao Paulo (Brasil) el análisis electroforético encontró siete fracciones proteicas respectivamente, las cuales mostraron efecto miotóxico (Rodrigues et al 1998), efecto que muy probablemente también presentan los venenos aquí estudiados.

Por otro lado, los estudios sobre propiedades bioquímicas en venenos de *Bothrops atrox, Bothrops brazili, Bothrops pictus* indican que en cuanto a sus pesos moleculares, las enzimas similares a trombina, están en el rango de 40 a 45 KDa, en tanto que proteasas I y II, asi como la atroxina tienen valores entre 20 a 25 KDa. En el caso de las fibrinogenasas se observa una marcada variabilidad en sus pesos (22 a 84 KDa), información que puede correlacionarse con su antigenicidad (Yarleque 2004). Estos resultados sin lugar a dudas orientan los

futuros trabajos sobre actividad biológica de los venenos de *B. atrox* aqui estudiados.

En un estudio comparativo de serpientes *B. cotiara*, *B. alternatus* y *B. atrox estos* venenos presentaron un patrón similar de elución con una proporción predominante (85– 88%) de proteínas de peso molecular medio y una pequeña proporción (10–14%) de proteínas de peso molecular bajo. Esta tendencia se vio en las serpientes juveniles de B. atrox aquí estudiadas (tabla 4) Comparativamente con estas, *B. moojeni*, *B. jararacussu*, *B. jararaca* y *B. neuwiedi* presentaron una proporción más pequeña de proteínas de peso molecular medio (61–47%) y una proporción más grande de proteínas de peso molecular bajo (37–52%).

Estos venenos exhiben solo proporciones traza (0–2%) de proteínas de alto peso molecular. En el presente trabajo, se observo como característica la presencia de altas proporciones de proteínas de alto peso molecular solo en serpientes adulto de *B. atrox.* Es claro que hay muchos factores (ubicación, alimentación, estrés del animal) que afectan este tipo de resultado para ver que se debe solo al estado de desarrollo de las serpientes.

Los venenos de *L. muta* y *C. d. terrificus* presentaron una proporción más equilibrada de proteínas de alto (16–20%), medio (37–54%) y bajo peso molecular (30–43%), similar a los resultados aquí encontrados para serpientes adultas de *B. atrox*.

De otro lado, al revisar la distribución de actividades proteolitica, procoagulante y fosfolipasa entre las proteínas de estos venenos, se evidencio que la actividad proteolítica y coagulante sobrelapa una de otra en muchos venenos de las especies de *Bothrops*, con intervalos de peso molecular de 30,000 a 100,000 Da. Contrariamente la actividad fosfolipasa fue localizada en un intervalo mucho más estrecho (peso molecular de 10,000– 20,000) para todas las especies excepto para *B. alternatus*, donde esta actividad fue localizada en un rango de peso molecular más alto (35,000– 50,000 Da) (Francischetti et al, 1998). Es claro, que esta información dirigirá los análisis sobre actividad biología de las serpientes *B. atrox* mantenidas en cautiverio en el serpentario de la UNIAMAZONIA.

La caracterización de proteínas de veneno de *Bothrops* por SDS-PAGE de la Argentina mostró que *Bothrops alternatus* mostraba 11 bandas, *B. neuwiedi* 9, *B. ammodytoides* 9, *B. jararaca* 8 y *B. jararacussu* 6 bandas. En general sobresalen tres tipos de bandas, discriminadas asi: <14KDa, 20 -30 KDa y 30-99 KDa todas con una intensidad (proporción) variable (Stanchi, O.N. *et al*. 1999). Estos resultados están en concordancia con lo obtenido en el presente trabajo e indicando la poca variación composicional de proteínas de veneno debido a la ubicación geográfica de los animales estudiados.

La caracterización de proteínas del veneno de *B. atrox* de Ecuador, Peru, Brasil y Colombia evidencio la existencia de una molécula idéntica K49-PLA2 de peso molecular de 13,826 Da. Los resultados en general muestra que los pesos moleculares del veneno de *B atrox* de estos países oscila entre 6 a 97.4 KDa (Vitelbina Núñez et al, 2009). En la tabla 4 se puede apreciar que las serpientes, aquí estudiadas, tienen una fracción proteica similar, lo cual dejaría la posibilidad de que *B. atrox* del serpentario de la UNIAMAZONIA también presente este tipo de molécula.

Un estudio sobre veneno de *Bothrops colombiensis* en Venezuela, de dos sitios del estado de Miranda mostro, en ambos casos, seis bandas mayoritarias, con pesos moleculares entre 23.00 a 40.32 KDa. De estas, sobresalen las fracciones proteicas de peso molecular 26.51 y 27.52 KDa de cada localidad con una potente actividad fibrinolitica (Girón, 2008). Fracciones proteicas de peso molecular similar a lo reportada en nuestro trabajo y que orientan futuros análisis en *B. atrox* de estas regiones de Colombia.

Como se ha observado, los resultados de electroforesis no solo describen los pesos moleculares de las fracciones proteicas sino que también han mostrado correlación con la actividad biológica de tales fracciones, lo cual sin duda alguna dirige los próximos trabajos de *B. atrox* de nuestra región.

7.2 Dosis letal media

Tabla 7 dosis letal prueba fina

DILUCION	1	2	3	4	5	6
Dilución Veneno µg/ml	55.12	57.88	60.77	63.8	66.99	70.34
Lectura 48 horas.	0/4	¼	1/4	2/4	2/4	4/4

Los resultados de la tabla 6 muestran que en 55.12 µg/ml de veneno es la mínima concentración que no muere ningún ratón y 70.4 µg/ml la máxima concentración donde muere el 100% de los ratones inoculados (4/4) mostrando así, que la dosis letal media es de 63.8 µg/ratón.

Dentro de los resultados la dosis fue de 63.8 µg/ratón encontrándose dentro del rango que establece los laboratorios probiol que son entre 40-100µg/ratón mostrando que la dosis es baja frente a la dosis reportada por (Artunduaga 2008) para serpientes juveniles que reporta una dosis de 44.0µg/ratón para la misma región lo cual quiere decir que este pool de veneno tiene poca efectividad para evaluar un suero antiofídico por que básicamente han reportado dosis en el género *Bothrops* en un rango de 40-50 µg/ratón.

Estudios similares sobre toxicidad aguda en venenos de serpientes de *Bothrops asper* y *Porthidium nasutum* (anteriormente *Bothrops nasutus*) de Antioquia y Chocó, registraron valores de 66.2 µg/ ratón (49.5-88.6) y 109 µg/ratón (82-131) respectivamente. (Otero, 2002). Otro estudio de la DL50 para el veneno de *B. atrox* reporto 67,87 µg/ratón (lovera, 2006). Estos resultados son similares a los aquí obtenidos.

Si asumimos que el peso promedio de un ratón usado en este trabajo es 19 g, el dato 63.8µg/ratón sería equivalente a 3.36 mg/kg, el cual es un valor superior respecto al registrado (0,210 mg/Kg) para la serpiente cascabel *Crotalus durissus cumanensis,* presente en la localidad de porshoure, guajira venezolana e indicando que este último es altamente tóxico (Pirela, 2006). Otro estudio reportó DL50 de 4.7 mg/Kg en *Lachesis muta* (granados-zúñiga, 1998). Otro estudio en *B. atrox* reporto DL50 de 3,33 (2,79 - 3,96) mg/Kg ratón (García et al, 2008), valor muy similar a lo reportado en este trabajo.

Otros reportes son DL50 (mg/Kg): *B. asper* 2.5 ± 0.4, *Ath. Nummifer* 7.0 ± 1.7, *C. d. durissus* 5.7 ± 0.8, *C. basiliscos* 10.6 ± 2.8, *C. atrox* 2.4 ± 3.0, *C. scutulatus* 2.3 ± 0.5, *Agk. bilineatus* 5.8 ± 1.0 y *M. nigrocinctus* 2.3 ± 0.5. (de Roodt, 2005), los cuales son similares a los de *B. atrox* aquí estudiada.

Comparado con los valores de DL50 (µg/raton) de otras serpientes del genero *Micrurus: M. surinamensises* es de 13.56 µg / ratón; *M. mipartitus* de 5.53 µg / ratón; *M. isozonus* de 28.92 µg / ratón; *M. dumerilii* de 8.83 µg / ratón y para *M. medemi* de 47.2 µg / ratón. (Monje, 2007).

8. CONCLUSIONES

Entre las serpientes juveniles y adultas de *B. atrox* estudiadas, no se observa diferencia en: la cantidad de veneno seco o fresco expulsado, la cantidad de sólidos totales del veneno y pH.

En cuanto al contenido de proteína se observa un incremento en la cantidad de proteína producida a avanzar el estado de desarrollo del animal.

Del análisis electroforetico se observa que independientemente del estado de desarrollo del ejemplar de *B. atrox* (juvenil o adulto) hay predominio de las fracciones proteicas con peso molecular entre 21 a 40 KDa, conformando casi el 51% de la mezcla total. En el caso de juveniles, se observa predominio de fracciones proteicas de 71 a 100 KDa conformando el 25 a 35 % de la mezcla. En el caso de adultos, se observa predominio de fracciones proteicas de 101 a 120 KDa correspondientes al 29 a 34 % de la mezcla.

Del pool de venenos de *B. atrox* evaluados se estableció que la dosis letal media es de 63.8 µg/ratón (.3.36 mg/kg) y determinada por vía intraperitoneal en ratones *Mus musculuss* y es baja frente a especies juveniles de la misma región

9. RECOMENDACIONES

Completar los estudios de porcentaje de recuperación del método de Biuret usado para determinar contenido de proteína en venenos.

Estandarizar el método de lowry para esta misma determinación, como vía alterna**.**

Definir claramente la edad de las serpientes evaluadas.

Iniciar estudios de actividad biológica con base a la información electroforética obtenida

Aislar una fracción proteica, con base a la información electroforética obtenida y determinar su letalidad y actividad biológica.

10. BIBLIOGRAFIA

Acosta de Pérez, *et al.* (2004). Aislamiento y caracterización parcial de fosfolipasa A2 de veneno de la serpiente *Bothrops alternatus* (víbora de la cruz) Facultad de Ciencias Veterinarias - UNNE. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales y Agrimensura – UNNE.

Alfenas, A.C. *et al* 1998. Extração de proteínas para electroforese. En: Alfenas, C.A. Eletroforese de isoenzimas e proteínas afins. Fundamentos e aplicaçóes em plantas e microrganismos. Edit. Universidade Federal de Viçosa. Pp. 87 – 114.

Araya C. 2004. Evaluación de la actividad citotóxica de dos péptidos catiónicos, sintetizados a partir de toxinas ofídicas de *Bothrops asper* y *Agkistrodon piscivorus piscivorus,* sobre células eucarióticas normales y cancerosas. Instituto Tecnológico de Costa Rica. Tesis. Pp 2-68.

Arikan H, Kumlutas Y, Turkozan O, Baran U. 2003. Electrophoretic Patterns of Some Viper Venoms From Turkey. Turk J Zool. Vol. 27 pag. 239-242.

Artunduaga M. 2008.determinacion de la dosis letal media (DL_{50}) del veneno de cinco individuos juveniles de *Bothrops atrox* (Ofidia: Viperidae). Pp 7-42.

Barker, R. A. et al. 2000. Role for complement in the rejection of porcine ventral mesencephalic xenografts in a rat model of Parkinson's disease. J. Neurosci. 20. Pp 3415–3424.

Barona, J. *et al.* En el (2004). Aspectos toxinológicos e inmunoquímicos del veneno del escorpión *Tityus pachyurus* pocock de Colombia Capacidad neutralizante de antivenenos producidos en Latinoamérica. Biomedica. 24:42 – 49.

Bjarnason. J. and Fox, J. W. 1994. Hemorragic metalloproteinases from snake venoms. Pharmacol. Thcr. 62. Pp 325-372.

Blaylock, R. 1999. Antibacterial properties of South African snake venoms. Toxicon 37(10): PP1336–1336.

Blobel, C.; White, J. 1992. "Strucutre, Function and Evolutionary Relationship of Proteins containing a Disintegrin Domain" Current Opinion in Cell Biology Vol.4, pp.760-765.

Bouchot, R. 1994. Sanke a Natural History. Sterling publishing Co.Inc. New York. Ed. Casting S. Pp. 202-203.

Burelos J. C. 1994. Inspección de la fauna silvestre en el Estado de Tabasco, México. Tesis de licenciatura. Universidad Juárez Autónoma de Tabasco (U.J.A.T.). México. Pp. 1 – 16.

Bush S.P and Cardwell M.D**.** 1999. Mojave rattlesnake (Crotalus scutulatus scutulatus) identification. Rev: Wilderness Environ Med 10: Pag 6-9.

Camargo M. 1992**.** Estudo dos efeitos da radiação gama d e 6 0 co nas propriedades bioquímicas, biológicas e imunológicas d o v e n e n o *de bothrops jararaca.* Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do grau de doutor em ciências na área de tecnologia nuclear. são paulo.

Campbell, J.A. AND Lamar, W.W. 2004. The venomous reptiles of the western hemisphere. First publishied. Cornell University Press. Volume I p 775.

Chanhome L, Khow O , Puempunpanich S , Sitprija V & Haiyabutr N. 2009. Biological characteristics of the *Bungarus candidus* venom due to geographical variation. Journal of Cell and Animal Biology Vol. 3 (6), pp. 093-100.

Charry-Restrepo, H. 2007. Manual básico para el tratamiento del accidente ofídico. COODESCA. Administración cooperativa de entidades de salud de Caldas y Quindío. Manizales, Colombia.

_____. 2006. Aspectos biomedico del accidente *Bothropico*. Temas de Toxinología: Ofidismo (Ofidiotoxicosis). Pp 1-24.

Chippaux J.P. Goyffon M. 1998. Venom, antivenom and Immunotherapy. Rev .toxicon 36(6). Pp 823-846.

Detrait, J. 1987. Composition Chimique des venins et immunologie. Pp 91- 103.

Detrait, J. & Saint Girons, H. (1986). European Viper"s venoms toxicity and immunology. In studies in herpetology.Ed rocekz. Prague a; 631- 636.

De roodt, Ramírez J *et al*. 2005. toxicidad de venenos de serpientes de importancia médica en méxico. gac méd méx vol.141 no. 1, pag 13 a 21.

Dirección Seccional de Salud de Antioquia. 2005. Accidente bothrópico, lachésico, elapídico, crotálico. En: Guías toxicológicas para serviciosde urgencias.

Fernandez R.E. & Galvan C.A. 2001. Métodos Para la cuantificación de proteínas. Departamento de bioquimica y biologia molecular. Pp 1-7.

Ferri, V. 1992. El Libro de las serpientes de todo el mundo. 1era. Edición. Editorial De Vecchi S.A. Balmes, Barcelona. 23-25, 55.

Flores D. E. 2001. Sinopsis de los escorpiones de la familia Buthidae en Colombia. Tesis de posgrado universidad nacional de Colombia. Pp 102.

Flores-Villela, O. A. 1980. Reptiles de importancia económica en México. Tesis profesional. Universidad Nacional Autónoma de México (U.N.A.M.). México.

Ivo M. Francischetti B, *et al.* 1998. *Bothrops* sp. Snake Venoms: Comparison of Some Biochemical and Physicochemical Properties and Interference in Platelet Functions. Comp. Biochem. Physiol. Vol. 119 **C**, No. 1, pp. 21–29.

García J, Yarlequé A, *et al*. 2008. características bioquímicas y evaluación preclínica de un antiveneno botrópico liofilizado contra el veneno de la serpiente *bothrops atrox.* rev peru med exp salud publica. 25(4). Pp 90- 386.

García H.2000. Electroforesis en geles de poliacrilamida: fundamentos, actualidad e importancia. UNIV DIAG; 1(2): Pp 31-41.

Gay C. *et al* 2004). Aislamiento y caracterización de una hemorragina acídica del veneno de Bothrops alternatus. Rev. Comunicaciones Científicas y Tecnológicas.

Gay, Claudia C, *et al,* 2004. Aislamiento y caracterización de una hemorragina acídica del veneno de *Bothrops alternatus*. Universidad nacional del nordeste comunicaciones científicas y tecnológicas. Resumen: E-016.

María E. Girón, Salazar A. M, Aguilar I, *et al,* 2008. Hemorrhagic, coagulant and fibrino(geno)lytic activities of crude venom and fractions from mapanare (*Bothrops colombiensis*) snakes. Comparative Biochemistry and Physiology, Part C 147. Pp. 113–121

Gomes J.R; Sigala J.J; & Salinas E.M. 2000. Estudio comparativo de la composición bioquímica del veneno en serpientes venenosas de Aguascalientes. Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología. Pp 5-44.

Gómez, T. J.R. (2000). Estudio comparativo de la composición bioquímica del veneno en serpientes venenosas de Aguascalientes. Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología. Cuaderno de trabajo. 43 pp.

Gómez, Cabal Clemencia. 2003. El accidente ofidico en Colombia: un problema que merece nuestra atencion. Revista de ministerio de agricultura y desarrollo rural. Colombia agropecuaria. Año IV, volume 9. Bogota, D.C. Colombia.

Gontijo, J. y T. Césare. 1995. Técnicas electroforéticas. Empresa Brasilera de Pesquisa Agropecuária–EMBRAPA. Ministerio de Agricultura, do Abastecimiento e de Reforma Agraria. Centro Nacional de Pesquisa de Soja – CNPSo Londrina, PR. 34p.

Gould, R et al. 1990. Niewiarowski"Disitegrins;: A Family of Integrin Inhibitory Proteins form Viper Venoms" Proc. Soc. Exp. Biol.Med., Vol. 195, No.2. Pp 168-171.

Granados-Zúñiga, J. Aragón-ortíz, F. 1998. Alteraciones cardiovasculares inducidas por el veneno de *lachesis muta* (serpentes:viperidae) y por su enzima fibrinogenolítica. rev. biol. trop v.46 n.4 san josé dic.

Gutierrez, J. & Lomonte, B. 1997. Phospholipase A2 myotoxins from *Bothrops* snake venoms. In: Venom Phospholipase A2 Enzymes, Structure, function and mechanism. Ed. Wiley Singapore. Cap. 13: pág. 321-330.

Gutiérrez J. Chávez F. & Bolaños R.1980. Estudio comparativo de venenos de ejemplares recién nacidos y adultos de Bothrops asper Rvsta. Biol. Trop. 28: 341.

Huatuco, S. *et al,* 2004. Aislamiento y caracterización parcial de una miotoxina del veneno de la serpiente *Bothrops atrox* (Ophidia: Viperidae). Facultad de Ciencias Biológicas UNMSM. *Rev. peru. biol.* 11(1): 79- 86.

Hurtado, L. *et al*, 2007. Alislamiento y algunas propiedades bioquímicas de una hialuronato glucanohidrolasa del veneno de la serpiente *Lachesis muta* "Shushupe". Rev Soc Quím Perú., 73, Nº 4. Pp 226-234.

Isla, M. *et al,* en el (2003). Características bioquímicas y acción biológica de una hemorragina del veneno de *Bothrops brazili* Anales de la Facultad de Medicina Universidad Nacional Mayor de San Marcos. SSN 1025 – 5583 Vol. 64, Nº 3 .Págs. 159 – 166.

Jimenez-Porra, J.M. 1985. Venom proteins of the fer-de-Lace, Bothrops atrox, from Costa Rica. Toxicon 2. Pp 155-166.

Kini M. & Evans H**.** 1990. "Effects of snake venom proteins on Blood platelet." Toxicon, Vol. 28, No.12. Pp.1387 -1422.

Klaasen C.D. et al . 1996.Toxicology. The basic Science of poison. Rev .McGraw-Hill, New York. Pp 801-809.

Klauber L. M. 1972. Rattlesnakes, their habits, life histories, and influence on mankind. Vol. 1 y 2. Univ. of Calif. Press, Berkeley and Los Angeles, pp. 771-821.

Kochva E. 1987 the Origen of snakes and the evolution of the venom apparatus. Rev. Toxicon; 25(1): Pag 65-106.

Lazo et al. 2007. Actividad antimicrobiana de una flavoproteína aislada del veneno de la serpiente peruana *Bothrops atrox* ("jergón"). Rev Soc Quím Perú. Edi 73, Nº 4 Pp 197-207.

Lazo et al 2007. Algunas propiedades bioquímicas de una l-aminoácido oxidasa aislada del veneno de la serpiente *Bothrops atrox.* Rev Soc Quím Perú. Vol. 73, Nº3. Pp 131-141.

Lévano F & Fernández R. 2004. Diagnostico y tratamiento de los accidentes por animales ponsoñosos. Instituto nacional de salud de peru. Centro nacional de productos biológicos. Pp 7-73.

Lomonte, B. Electroforesis en Gel de Poliacrilamida. Capítulo 13. Pp. 92 – 101.

Lomonte, B; Tarkowski, A; Hanson, L. 1993. Host response to Bothrops asper snake venom: Analysis of Edema Formation, Inflamatory Cells, and Cytokine Release in a Mouse Model. Inflamation 17(2). Pp 93-105.

Lomonte, B. 1994. Tissue damage and inflamation induced by snake venoms. PhD. Thesis. Göterbog, Sweden. University of Göteborg. Pp 88.

Loret E and Hammock B. 2001. structure and neuroticixity of venoms. In: the biology Of the scorpions. Stanford University press. Pp 587.

López, J.C.*et el*, 1999. Estudio cromatográfico, electroforético, y enzimático del veneno total y fracción I de la serpiente venezolana *Bothrops venezuelensis* (tigra mariposa). Revista científica FCV- LUZ. Vol. IX, N^0 4. Pp 314-320.

Lovera, A. Bonilla, C. Hidalgo, J. 2006. Efecto neutralizador del extracto acuoso de *dracontium loretense* (*jergón sacha*) sobre la actividad letal del veneno de *bothrops atrox.* rev peru med exp salud publica 23(3),pag. 177-181

Málaga, O. Pantigoso, C. *et al,* 2000. Variaciones en la composición proteica, actividades enzimáticas y biológicas del veneno de la serpiente bothrops atrox (vipereidae) en relación con la edad. Revista Peruana de Biología Vol. 7 Nº 2

Maldonado, J. & Silva Haad. 2007. Serpientes venenosas de Colombia. Pp 1 – 88.

Marcinkiewicz, C. et al. 2003. Obtustatin: a potent selective inhibitor of *α*1*β*1 integrin in vitro and angiogenesis in vivo. Cancer. Res. 63. Pp 2020–2023.

Martz E. 1971. bioquimica. Pp 1-224

McLane, M. *et al*. 1998. "Viper Venoms Disintegrins and Related Molecules" Proc. Soc. Exp. Biol. Med., Vol. 219, No.2, Nov. Pp.109-119.

Mebs D. 1989. Pharmacology of reptilian venoms. En Biology of the reptilia, Carl Gans, Ed. Vol.VIII, Cap.4,. Acad. Press, N. York-London.. PP. 437-559.

Mendoza, J. Gonzales, Ruiz, E. *et al.* 2008. Patrones electroforéticos comparativos de los venenos de serpientes peruanas del Género *bothrops*» XVII RC ICBAR, Agosto 2008 Resúmenes

Ministerio de Protección Social. 2006. Protocolo de accidente ofídico. – Instituto Nacional de Salud. Versión actualizada. Cód INS 100.

Minton, S.A. & Weinstein, S.A. 1987. Colubrid Snake Venoms; Immunologic Relationships, Electrophoretic Patterns. Copeia 4: 993-1000.

Monje, S. 2007. Determinacion de la dosis letal media (DL_{50}) de cinco especies del genero *Micrurus* en estado de cautiverio en Nilo – Cundinamarca (Colombia).Pp: 1 – 125.

Murañak, S.L. *et, al.* 2006. Acción del veneno de *Bothrops jararacussu* de Argentina sobre la coagulación sanguínea. Edi: 8(1):Pp 119-128.

Núñez V et, al. 2005. Estudio comparativo doble ciego aleatorizado de dos Antivenenos polivalentes en mordeduras por *Bothrops asper* en Colombia.

Núñez, V. Cid, P. *et al*. 2009. Snake venomics and antivenomics of Bothrops atrox venoms from Colombia and the Amazon regions of Brazil, Perú and Ecuador suggest the occurrence of geographic variation of venom phenotype by a trend towards paedomorphism. journal of proteomics vol 73 pag 57–78

Ohsaka A. Omori Satoh T. Kondo S. Y Murata R. 1966. Biochemical and phatological aspects of hemorrhagic principles in snake's venoms with special reference to Habu (*Trimeresurus flavoviridis*) venoms. Rev: Inst. Butantan Simp. Internac. Cap. 33: pag. 193 -205.

Otero R. *et al*. 2007. Evaluacion experimental de la capacidad neutralizante de los extractos contra los efectos letal y enzimatico del veneno de la mapana equis (*Bothrops atrox asper*).pp 59-70.

Otero, R. Núñez, V. *et al*. 2002. características bioquímicas y capacidad neutralizante de cuatro antivenenos polivalentes frente a los efectos farmacológicos y enzimáticos del veneno de bothrops asper y porthidium nasutum de antioquia y chocó. iatreia / vol 15/no.1 / marzo /. pag 5-15

Otero, R. Tobón, G.S. Gómez, L.F. *et al*.1990. Accidente ofídico en Antioquia y Chocó. Aspectos clínicos y epidemiológicos. Acta Méd. Colomb 1992; 17: 229-249.

Oviedo, P. 2000. Validación del Nuevo Ensayo Tiempo de *Bothrops atrox* diluido (d*Bat*) para la Detección de Anticoagulante Lúpico. Anales de la Facultad de Medicina Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Vol. 61, Nº 1 – 2000. Págs. 7 – 14.

Ownby C. 1982. Pathology of rattlesnake envenomation. In: Tu AT,ed. Rattlesnake venoms. New York: Marcel Dekker. Pp163-209.

Pantigoso C. Escobar, E. Málaga & Yarlequé A. 1996. Aislamiento y algunas propiedades de la atroxina, una proteinasa del veneno de la serpiente peruana *Botrhops atrox* «jergón». Acta Científica Venezolana. Cap. 47: Pp 67 -73.

Patiño C & Blanca S. 2002. Serpientes venenosas.grupo de estudios de animales silvestres. Vol 3 N°1-6. Pp 37-42.

Pérez J. and Sanchez E. 1999. Natural proteasa inhibitors to hemorrhagins in snake venoms and their potential use in medicine. Toxicon 37: Pp 703-728.

Pineda, D. 2002. accidentes por animales venenosos. Instituto nacional de salud, Bogota. Pp 17-63.

Pirela, R. lópez-jonsthon, J.C. & Hernández, J.L. 2006. Caracterización toxinológica del veneno total de la serpiente de cascabel *crotalus durissus cumanensis* (viperidae), presente en la localidad de porshoure, guajira venezolana. Revista científica, fcv-luz / vol. xvi, nº 3, 232 – 238

Porges, N. 1953. Snake Venoms, Their Biochemistry and Mode of Action. *Science*, Vol. 117, No. 3029, pp 47-51

Remuzgo, C. Alvarez, M.P. *et al*. 2000. Caracterización parcial del veneno de la serpiente cascabel peruana crotalus durissus terrificus Rev. Peru. Biol**.** Vol. 7. Nº 1.

Veridiana, M. Rodríguez, A. *et al*. 1998. geographic variations in the composition of myotoxins from *bothrops neuwiedi* snake venoms: biochemical characterization and biological activity. Comparative Biochemistry and Physiology Part A 121 (1998) Pp 215–222.

Rojas, G; Gutiérrez, JM; Aymerich, R. 2001. El envenenamiento Ofídico en Centroamérica: Fisiopatología y tratamiento. San José, CR. Instituto Clodomiro Picado. p 35.

Roodt A, Ramírez J *et al.* 2005. Toxicidad de venenos de serpientes de importancia médica en México. Rev. Gac. Méd. Méx. V 141 N: 1.

Roodt, Adolfo R. *et al.* 2004. Toxicidad de venenos de serpientes de importancia médica en México. Gac Méd Méx Vol.141 No. 1, 2005.

Rosenberg, P. 1979. Pharmacology of Phospholipase A_2 from snake venoms. In: Snake venoms LEE CY ed. Handb exp pharm. Springer – Verlag Berlin – Heidelberg & New York; 52: 401 – 447.

Rucavado Romero, Alexandra . 2004. Componentes del veneno de *Bothrops asper* que afectan la hemostasis y su papel en el desarrollo del síndrome hemorrágico. Tesis sometida a la consideración del Sistema de Estudios de Posgrado para optar por el grado de Doctor en Ciencias (Ph.D.), con énfasis en Ciencias Biomédicas. Instituto Clodomiro Picado, Facultad de Microbiología, Universidad de Costa Rica.

Russell F. 1983. Snake Venoms Poisoning. New York. Edi: Scholium International. Pág. 5-61.

Salazar, E. 2000. Aspectos básicos sobre la electroforesis. (mimeografiado). P 8

Sánchez, O. 1998. Serpientes de México. Biodiversitas. CONABIO. Volumen 21.

Sarmiento, K. 2006. Comparación de la técnica de seroneutralizacion o pruebas de potencia para sueros antiofídicos utilizados en los laboratorios PROBIOL LTDA. De Colombia y en el instituto Clodomiro picado de Costa Rica. Tesis FMVZ. UNAL. Pág. 4 – 27.

Secretaría de Higiene y Seguridad Laboral 2005. Aportes para la Prevención y Control de accidentes causados por Animales Venenosos. Buenos ares argentina. Pp 1-19

Silva H. 1981. Accidentes humanos por las serpientes de los géneros *Bothrops* y *Lachesi*s. Rev. Memoria Instituto Butantan (Brasil) 44/45: Pag. 403-423.

Souza, D.H. *et, al* . 2000. Disintegrin-like Domain of the Snake Venom Metalloprotease Alternagin Inhibits a2b1 Integrin-Mediated Cell Adhesion. Archives of Biochemistry and Biophysics 384 (2). Pp 341–350.

Stanchi, O.N. *et al*. 1999. Characterization of bothrops venoms of argentina by sds-polyacrylamide gel electrophoresis. Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata. Pp. 55 - 58.

Theakston R, Reid H. 1983. Development of simple standard assay procedures for the characteritation of snake venoms. Rev world healt organization: 61. Pag.949-956.

Trethewie, E.R. & Thomas, W.E. 1969. Some effects of material obtained from snake bite area. Toxicon: 7: 243 – 244.

Vidal J.C. 1976. Venenos de serpientes. Bioquímica y Farmacología. Ciencia e Investigación. Vol 32. Pp 3-23.

World Health Organization. 1981. Progress in the Characterization of Venoms and Standarization of Antivenoms. Offset Publication, WHO, Geneva.

Yarleque, A. 2000. Las Serpientes Peruanas y sus Venenos. Lima-Perú. Edi: UNMSM. Pág. 78.

Yarlequé, A. Vivas, D. *et al*. 2008. acción del antiveneno botrópico polivalente sobre las actividades proteolíticas presentes en los venenos de serpientes peruanas. Rev Peru Med Exp Salud Pública. 2008; 25(2): 169-73

Yarleque, A. 2004. Enzimas proteoliticas en los venenos de serpientes peruanas. Consejo superior de investigaciones. Boletin 54, Octubre-Diceimbre. ISSN 1727-4389. Pag 12-15.

Zertuche J. 1981. Reptiles mexicanos de importancia para la salud pública y su distribución geográfica. Salud Pública de México. XXIII (4): Pp 329–343.

Zhao X and Yeh, J. Z. and Narahashi, T. 2001 Post-stroke dementia: nootropic drug modulation of neuronal nicotinic acetylcholine receptors. Ann. N.Y. Acad. Sci. 939. Pp 179–186.

http://www.javeriana.edu.co/Facultades/Ciencias/neurobioquimica/libros/celular/cromatografia.htm.

www.proteored.org

http://www.geocities.com/dfch_diegoc/Viperidae/Bothrops_atrox.htm

11. ANEXOS

Anexo 1

Estado de desarrollo	carril	No de bandas (fracciones proteicas)	Rango PM (KDa) de cada banda
Juvenil	1	6	1.2 a 10.0 10.0 20.0 a 25.0 25.0 a 37.0 50.0 75.0 a 100.0
Juvenil	3	6	1.2 a 10. 20.0 a 25.0 25.0 37.0 a 50 50.0 a 75.0 75.0
juvenil	4	7	1.2 a 10. 20.0 a 25.0 37.0 50.0 50.0 a 75.0 75.0 a 100.0 260.0
adulto	2	6	1.2 a 10.0 20.0 a 25.0 37.0 a 50.0 75.0 a 100.0 75.0 a 100.0 260.0
Adulto	3	6	1.2 a 10.0 20.0 a 25.0 37.0 a 50.0 75.0 a 100.0 75.0 a 100.0 260.0
Adulto	3	6	1.2 a 10.0 20.0 a 25.0 37.0 a 50.0 75.0 a 100.0 75.0 a 100.0 260.0

ANEXO 2

Datos respectivos de cada una de las seis muestras electroforéticas

Tabla 3. Número de fracciones proteínicas separadas y peso molecular (KDa) respectivo de los venenos de serpientes juveniles y adultas de *Bothrops atrox* del serpentario de la UNIAMAZONIA

Edad de la serpiente	Tiempo de retención	No de pico	Peso molecular (KDa)	%total
juvenil	22.52	9	10.73	5.15
Carril 1	24.78	11	20.12	1.28
	25.47	12	21.10	2.05
	27.10	13	23.42	7.18
	27.39	14	23.85	5.22
	28.18	15	24.97	1.69
	28.97	16	32.08	20.05
	29.51	17	37.04	19.15
	31.53	18	46.75	2.43
	32.12	19	49.60	5.62
	33.59	20	63.14	4.00
	34.72	21	73.82	1.47
	36.64	22	85.55	15.03
	37.04	23	87.87	9.15

Edad de la serpiente	Tiempo de retención	No de pico	Peso molecular (KDa)	%total
juvenil	22.51	8	10.70	0.10
Carril 3	23.39	9	14.44	0.62
	24.08	10	17.35	1.50
	25.74	11	21.49	5.94
	26.03	12	21.90	5.38
	27.65	14	24.21	16.64
	28.23	15	25.30	22.56
	30.28	16	40.78	2.62
	31.21	17	45.25	2.87
	31.90	18	48.54	1.05
	32.34	19	51.30	2.92
	33.07	20	58.21	2.09
	33.80	21	65.13	2.10

	35.86	22	80.92	32.72
	62.64	26	251.65	0.48
Edad de la serpiente	Tiempo de retención	No de pico	Peso molecular (KDa)	%total
juvenil	21.77	6	9.35	1.58
Carril 4	24.64	8	19.74	1.04
	25.42	9	21.03	2.37
	27.51	10	24.02	14.28
	29.19	11	34.10	14.84
	29.81	12	38.51	19.24
	32.06	13	49.32	4.27
	33.05	14	58.04	2.82
	33.78	15	64.94	0.78
	34.25	16	69.38	2.69
	35.04	17	76.11	2.03
	35.61	18	79.49	1.31
	38.07	19	93.93	32.14

Edad de la serpiente	Tiempo de retención	No de pico	Peso molecular (KDa)	%total
adulto	21.99	6	9.59	1.47
Carril 2	22.49	7	10.59	1.61
	25.11	9	20.59	0.79
	25.89	10	21.71	1.77
	27.74	11	24.34	13.00
	29.91	13	38.99	15.78
	30.53	14	41.95	14.40
	31.31	15	45.71	5.65
	32.87	16	56.34	1.58
	33.43	17	61.60	1.56
	33.99	18	66.87	1.80
	34.43	19	71.08	0.69
	35.22	20	77.15	1.54
	36.17	21	82.74	8.33
	39.12	22	100.36	27.03
	40.46	23	120.66	2.32

Edad de la serpiente	Tiempo de retención	No de pico	Peso molecular (KDa)	%total
adulto	22.16	8	9.78	1.34
Carril 5	24.69	11	19.96	0.55
	25.12	12	20.60	0.88
	25.88	13	21.68	2.23
	27.76	14	24.37	8.23
	28.08	15	24.84	7.19
	29.92	16	39.01	12.81
	30.56	17	42.12	17.72
	32.83	18	55.92	2.69
	33.37	19	61.00	1.43
	33.90	20	66.08	3.61
	35.20	21	77.05	3.10
	36.01	22	81.80	2.32
	36.65	23	85.61	1.15
	39.13	24	100.49	34.42

Edad de la serpiente	Tiempo de retención	No de pico	Peso molecular (KDa)	%total
adulto	22.22	5	9.85	1.21
Carril 6	23.03	6	12.89	0.36
	24.17	7	17.75	0.27
	25.15	8	20.64	0.93
	25.91	9	21.73	2.02
	28.08	10	24.83	12.45
	29.98	11	39.31	13.92
	30.63	12	42.45	18.34
	32.91	13	56.73	4.43
	33.94	14	66.46	3.72
	35.25	15	77.34	3.30
	36.01	16	81.81	1.42
	36.71	17	85.97	0.92
	39.21	18	101.70	32.09
	40.73	19	124.74	3.35
	44.59	20	160.99	0.91

Anexo 3

ASPECTO TEÓRICO Y EXPLICACIÓN DE LA PRUEBA ESTADÍSTICA SPEARMAN KARBER

La dosis letal 50 se calcula por el método Spearman Karber así:

$$m = X_{100} \pm d/n\ (\Sigma\ r\text{-}n/2)$$

Donde:

m = logaritmo DL_{50}

X_{100} = logaritmo del nivel donde la dosis más alta de veneno causa el 100% de mortalidad.

n = número de ratones utilizados en cada dilución.

r = número de ratones que mueren en cada dosis

d = valor constante, (logaritmo del intervalo de las dosis).

Σ = Sumatoria de ratones muertos por nivel desde X_0 a X_{100} incluyendo los dos valores + extremos (Xo representa el logaritmo de la dosis más baja que no produce ninguna muerte)

Anexo 4

CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA DE *Bothrops atrox.*

Reino: Animalia
Filo: Chordata
Subfilo: Vertebrata
Clase: Squamata
Suborden: Serpentes
Familia: Viperidae
Subfamilia: Crotalinae
Genero: *Bothrops*
Especie: *B. atrox* Linneaus, 1758.
Nombres vulgares: Colombia (talla x, veinticuatro, cuatro narices, pudridora, pelo de gato), Perú (jergón), Argentina (cabeza de lanza) en Brasil (jergón, jergona, macagua) en ecuador (Equis Rabo de Hueso, Fer de Lance, Pitalala, Shishi, Semenawa) http://www.geocities.com/dfch_diegoc/Viperidae/Bothrops_atrox.htm.

FORMATO

PRUEBA DE POTENCIA DE DOSIS LETAL MEDIA (DL_{50})

Fecha: 04/09/2009

Especie: *Mus musculus*

Vía de inoculación: Intraperitoneal

Peso del ratón: 17-19 gramos

Veneno: *Bothrops atrox*

Lectura: 48 horas

Elaborado: Jacson Murillo - Ekson Prada

µg veneno	µl veneno	ml Cloruro de sodio (NaCl 0.9%)	ml inoculados	# ratones	# Ratones. Muertos
20	200	4800	0.5	4	0/4
40	400	4600	0.5	4	2/4
60	600	4400	0.5	4	4/4
80	800	4200	0.5	4	3/4

Fecha : 5/09/2009

Especie: *Mus musculus*

Vía de inoculación: Intraperitoneal

Peso del ratón: 19-20 gramos

Veneno: *Bothrops atrox*

Lectura: 48 horas

Elaborado: Jacson Murillo - Ekson Prada

µg veneno	µl veneno	ml Cloruro de sodio (NaCl 0.9%)	ml inoculados	# ratones	# Ratones. Muertos
35	350	4650	0.5	2	0/2
40	400	4600	0.5	2	0/2
45	450	4550	0.5	2	0/2
50	500	4500	0.5	2	0/2

55	550	4450	0.5	2	2/2
60	600	4400	0.5	2	2/2

Fecha : 08/09/2009

Especie: *Mus musculus*

Vía de inoculación : Intraperitoneal

Peso del ratón: 17-19 gramos

Veneno: *Bothrops atrox*

Lectura: 48 horas

Elaborado: Jacson Murillo - Ekson Prada

µg veneno	µl veneno	ml Cloruro de sodio (NaCl 0.9%)	ml inoculados	# Ratones	# Ratones. Muertos
50	500	4500	0.5	4	0/4
52.5	525	4475	0.5	4	0/4
55.12	551.2	4448.8	0.5	4	0/4
57.8	578	4422	0.5	4	1/3
60.76	60.76	4392.4	0.5	4	4/4
63.8	638	4362	0.5	4	0/4

Fecha: 10/09/2009 **Especie:** *Mus musculus*

Vía de inoculación: Intraperitoneal **Peso del ratón:** 17-19 gramos

Veneno: *Bothrops atrox* **Lectura:** 48 horas

Elaborado: Jacson Murillo - Ekson Prada

µg veneno	µl veneno	ml Cloruro de sodio (NaCl 0.9%)	ml inoculados	# ratones	# Ratones. Muertos
60	600	4400	0.5	4	2/4
63	630	4370	0.5	4	2/4
65	650	4350	0.5	4	2/4