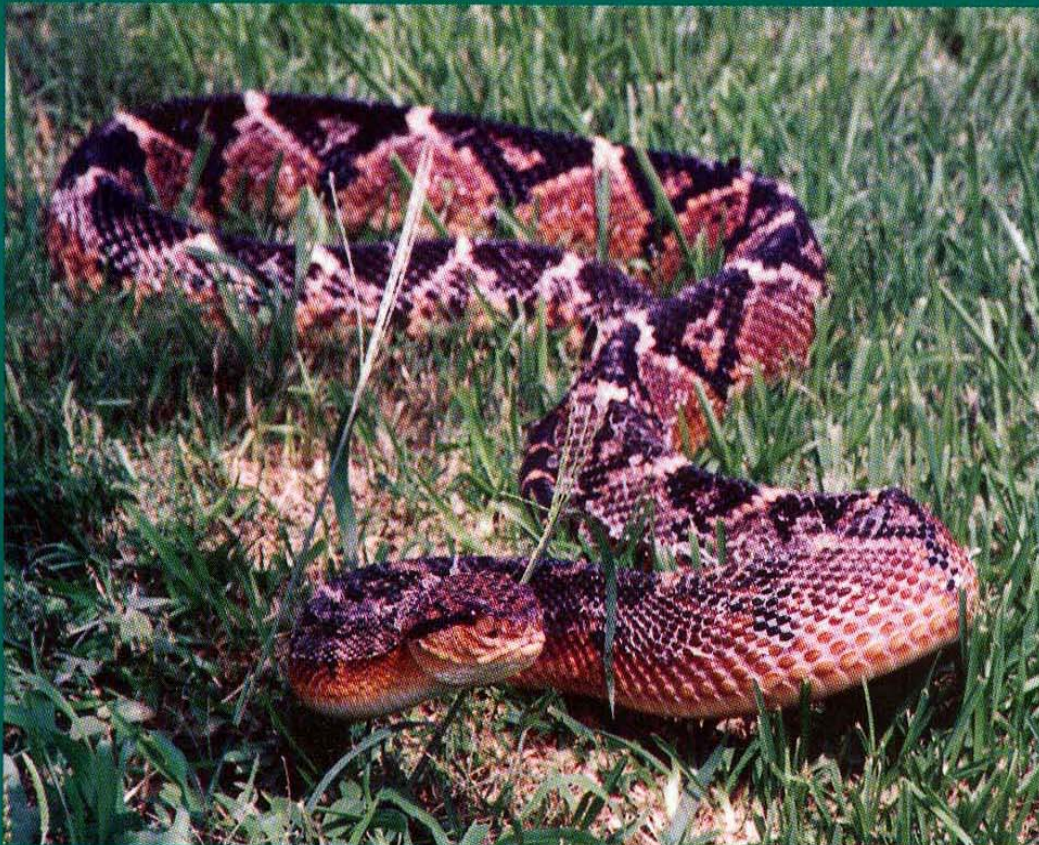




MINISTERIO DE SALUD
INSTITUTO NACIONAL DE SALUD
CENTRO NACIONAL DE CONTROL DE CALIDAD



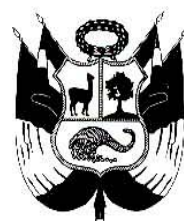
FARMACOLOGIA DE VENENOS Y ANTIVENENOS DE SERPIENTE



1998



MINISTERIO DE SALUD
INSTITUTO NACIONAL DE SALUD
CENTRO NACIONAL DE CONTROL DE CALIDAD



FARMACOLOGIA DE VENENOS Y ANTIVENENOS DE SERPIENTE

Serie de Documentos N° 6

1998

Este libro se editó dentro del marco del convenio de Cooperación para investigación científica y docencia suscrito entre la Universidad Peruana Cayetano Heredia y el Instituto Nacional de Salud.

© Ministerio de Salud
INSTITUTO NACIONAL DE SALUD
Jr. Cápac Yupanqui 1400. Jesús María
Telf. 471-3254/ Fax: 471-7443
Lima. Perú. 1998

FARMACOLOGIA DE VENENOS Y ANTIVENENOS DE SERPIENTE

AUTORES:

Dr. Alfonso Zavaleta Martínez- Vargas MSc. María Salas Arruz

Blgo. León Villegas Vilchez

Blgo. Jorge Castillo Yui

COMITE EDITOR:

Or. Alfonso Zavaleta Martínez- Vargas MSc. María Salas Arruz

Dr. César Cabezas Sánchez

Or. Jaime Chang Neyra

Dr. Carlos Carrillo Parodi

MINISTERIO DE SALUD ALTA DIRECCION

Dr. Marino Costa Bauer

Ministro

Dr. Alejandro Aguinaga Recuenco

Viceministro

INSTITUTO NACIONAL DE SALUD

Dr. Carlos Carrillo Parodi

Jefe

CENTRO NACIONAL DE CONTROL DE CALIDAD

Dr. Alfonso Zavaleta Martínez-Vargas

Director General

PERFIL DE LOS AUTORES

ALFONSO ZAVALETA MARTINEZ-VARGAS

Nació en Trujillo en 1955. Estudió Ciencias Biológicas, Farmacología y Medicina Humana en la Universidad Peruana Cayetano Heredia, graduándose de Bachiller en Biología en 1980, Bachiller en Medicina Humana y Médico Cirujano en 1983; Maestro en Farmacología en 1985 y Doctor en Farmacología en 1989. Desde 1974 investiga la toxicología de venenos animales, habiendo recibido las distinciones: Premio Roussell en 1983; Premio Grunenthal en 1983; Premio Bienal Hipólito Unanue en 1984; Premio Carlos Gutiérrez Noriega otorgado por CONCYTEC en 1988 y 1989 respectivamente; Premio Alberto Hurtado Abadía en 1990 y mención Honrosa en el Premio Bienal Hipólito Unanue en 1993. En 1984 se incorpora al Instituto Nacional de Salud, donde desempeña los cargos de Jefe de la Sección de Animales Venenosos y Serpentario (1984-1985), Jefe del Laboratorio Afiliado del Centro de Investigaciones en Salud "Hugo Lumbreas Cruz" (1985-1997) y Director General del Centro Nacional de Control de Calidad (1991-1992; 1994-1997). Es Profesor Principal y Coordinador de la Sección Farmacología, del Departamento de Ciencias Fisiológicas, Facultad de Ciencias y Filosofía de la Universidad Peruana Cayetano Heredia.

MARIA CLEOFÉ SALAS ARRUZ

Nació en Lima. Estudió Biología en la Universidad Ricardo Palma, graduándose de Bachiller en 1981 y Licenciado en Biología en 1984. En 1990 obtuvo el grado de Maestro en Ciencias con Mención en Fisiología en la Universidad Peruana Cayetano Heredia. Desde 1983 ha realizado diferentes estudios sobre la toxicología de venenos animales yantivenenos, especialmente de serpientes y arácnidos, y ha sido distinguida con el Premio Carlos Gutiérrez Noriega otorgado por CONCYTEC en 1988 y 1989 respectivamente y el Premio Hipólito Unanue en 1993. Tuvo a su cargo la Sección de Inmunología del Hospital de Apoyo Marfa Auxiliadora de Lima (1986-1987). Se desempeñó como Biólogo en el Laboratorio Afiliado, del Centro de Investigaciones en Salud "Hugo Lumbreas Cruz" del Instituto Nacional de Salud. Actualmente es Profesor Asociado de la Sección Farmacología, Departamento Académico de Ciencias Fisiológicas en la Facultad de Ciencias y Filosofía, y Coordinadora Técnico Administrativa del Servicio de Control de Calidad de la Universidad Peruana Cayetano Heredia.

LEON FAUSTINO VILLEGAS VILCHEZ

Nació en Lima. Estudió Biología en la Universidad Peruana Cayetano Heredia, donde se gradúa de Bachiller y Licenciado en 1990. Ha culminado estudios de Maestría en Bioquímica, en la Escuela de Post Grado Vctor Alzamora Castro de la Universidad Peruana Cayetano Heredia. Desde 1986 investiga en productos naturales, habiendo sido distinguido con el Premio Carlos Gutiérrez Noriega otorgado por el CONCYTEC en 1988 y 1989 Y el Premio Bienal Hipólito Unanue en 1993. Actualmente es profesor Auxiliar de la Sección Farmacología del Departamento de Ciencias Fisiológicas de la Facultad de Ciencias y Filosofía, Universidad Peruana Cayetano Heredia.

JORGE A. CASTILLO YUI

Nació en Lima, obtuvo los grados de Bachiller en Ciencias Biológicas, Biólogo y Bachiller y Licenciado en Educación en la Universidad Nacional Mayor de San Marcos; Magíster en Ciencias con Mención en Biología en la Universidad Peruana Cayetano Heredia. Actualmente es Profesor Asociado del Departamento Académico de Biología de la Facultad de Ciencias y Filosofía, Jefe de la Oficina de Biblioteca y Publicaciones de la Universidad Peruana Cayetano Heredia, y miembro del Comité Ejecutivo del Consorcio de Universidades, habiendo sido distinguido con el Premio Carlos Gutiérrez Noriega otorgado por el CONCYTEC en 1988 y 1989.

INDICE

Presentación	8
--------------------	---

CAPITULO 1: ESTUDIO FARMACOLOGICO DEL VENENO DE

Lachesis muta muta "SHUSHUPE"

Dr. Alfonso Zavaleta M-V, MSc. María Salas Arruz,

Blgo. León Villegas Vélchez, MSc. Jorge Castillo Yuj..... 9

Introducción	10
Material y Métodos.....	14
Abreviaturas empleadas	14
Materiales y Reactivos.....	14
Métodos	15
Resultados.....	29
Discusión	48
Abstract	55
Referencias Bibliográficas	56

CAPITULO II: ANTIVENENOS

Dr. Alfonso Zavaleta M-V, MSc. María Salas Arruz 63

Sinonimias	64
Definición	64
Tipos de Antivenenos	64
Producción de Antivenenos	64
Control de Calidad de Antivenenos	65
Recomendaciones especiales para el manejo de pacientes sensibles al suero heterólogo	66
Suero Antibotrópico Polivalente Heterólogo (Equino)	68
Suero Anticrotálico Monovalente Heterólogo (Equino)	72
Suero Antilachésico Monovalente Heterólogo (Equino).....	75
Suero Antiloxoscélico Monovalente Heterólogo (Equino)	78
Referencias Bibliográficas	82
Algunas Serpientes venenosas de importancia médica.....	83

SECTOR SALUD
INSTITUTO NACIONAL DE SALUD



No. 174-97-J-IPD/INS

RESOLUCION JEFATURAL

Lima, 31 de Octubre de 1997

CONSIDERANDO:

Que, el Instituto Nacional de Salud, a través del personal del Laboratorio Afiliado del INS del Centro Nacional de Laboratorios en Salud Pública, y del Centro Nacional de Control de Calidad, en colaboración con personal docente de los Departamentos Académicos de Ciencias Fisiológicas y Biología de la Universidad Peruana "Cayetano Heredia", han formulado en el marco del convenio de cooperación vigente entre ambas instituciones, el documento "Estudio Farmacológico del Veneno de Lachesis muta muta Shushupe";

Que, en tal virtud resulta necesario aprobar y difundir dicho documento, para su conocimiento por la comunidad técnico-científica;

De conformidad con lo dispuesto en el Reglamento de Organización y Funciones del INS, aprobado por R.M. N° 178-95-SA/DM; y,

Estando a lo acordado;

SE RESUELVE:

Artículo 1º.- Aprobar, la publicación del documento titulado: Estudio Farmacológico del Veneno de Lachesis muta muta "Shushupe", perteneciente a la Serie de Documentos del Instituto Nacional de Salud.

Artículo 2º.- Disponer la impresión y distribución del documento a que se refiere el numeral anterior.

Regístrese y comuníquese,



Carriello
DR. CARLOS CARRILLO PARODI
JEFE
INSTITUTO NACIONAL DE SALUD



PRESENTACION

La presente publicación cubre una necesidad que viene de antiguo y es la referente al problema del diagnóstico y tratamiento de los accidentes causados por la mordedura de serpientes ponzoñosas. Para ello resulta indispensable conocer las características de los venenos, su toxicidad, sus componentes bioquímicos, sus propiedades antigénicas y la manera de preparar, dosificar y conservar los anticuerpos. La mayoría de los manuales se ocupan de los ofidios prevalentes en otros países y nunca podemos tener la seguridad que lo que ocurre con una serpiente de Norteamérica sea aplicable directamente a lo que ocurre por ejemplo, en la Selva Alta del Perú, aunque se trate de la misma especie taxonómica.

Aunque se trata de las características particulares del veneno de la *Lachesis muta* los estudios aquí reportados constituyen un modelo de lo que se puede y debe hacer con los venenos de otros animales con el objeto de contar con los datos básicos que permitan un mejor afronte diagnóstico y terapéutico.

Los estudios experimentales se han efectuado principalmente en el Laboratorio de Farmacología, Departamento de Ciencias Fisiológicas de la Universidad Peruana Cayetano Heredia, Afiliado al Instituto Nacional de Salud del Ministerio de Salud del Perú, en una muestra más del exitoso Convenio entre el INS y la UPCH, el que viene ejecutándose desde hace 13 años con óptimos resultados, tanto en los aspectos técnicos y académicos, como en el modelo de lo que debe ser la cooperación entre la Universidad y el Estado para afrontar los problemas nacionales.

Para la terapéutica adecuada es imprescindible el conocimiento de los antivenenos disponibles en el país, sus propiedades, dosificación, indicaciones y contraindicaciones. En la segunda parte de este libro, se incluye la información básica sobre los sueros antiofídicos producidos por el Instituto Nacional de Salud.

Esperamos que a esta publicación sigan las que se refieren a los estudios sobre otros animales ponzoñosos, otras serpientes como las *Bothrops* o las *Micrurus*, arañas como la *Loxosceles* y los tan temidos escorpiones. Hay estudios suficientes y esperamos que el presente esfuerzo sea sólo el primer avance de una serie tan necesaria en nuestro país.

Dr. Ramiro Castro de la Mata

CAPITULO 1

ESTUDIO FARMACOLOGICO

DEL VENENO DE

Lachesis muta muta "Shushupeff"

Dr. Alfonso Zavaleta M-V
MSc. María Salas Arruz
Blgo. León F. Villegas Vílchez
MSc. Jorge Castillo Yu

INTRODUCCIÓN

Los accidentes producidos por mordeduras de ofidios en el hombre, han ocurrido en todas las etapas históricas del mundo y actualmente constituyen un problema médico de considerable magnitud, reportándose anualmente de 30 000 a 40 000 muertes ocasionadas por mordeduras de serpientes venenosas en el mundo (1,13, 14, 54, 95, 107, 116, 118).

Frente a este panorama la Organización Mundial de la Salud (OMS) y la Oficina Sanitaria Panamericana (OPS) han impulsado el estudio de los venenos ofídicos de las especies cuya mordedura ocasiona accidentes más frecuentemente en los diferentes países (118). Una propuesta para la formación de equipos multidisciplinarios multinacionales han sido recientemente planteada a nivel de latinoamérica.

Las alternativas de solución al problema del ofidismo a nivel mundial, recaen en la actualidad de 4 pilares fundamentales (118):

- a) Mejoramiento de los esquemas de tratamiento mediante la adecuada estandarización de los antivenenos, único tratamiento de eficacia comprobada.
- b) Producción de antivenenos de mayor potencia y especificidad, en condiciones comercialmente rentables para los países del tercer mundo.
- c) Búsqueda de técnicas que permitan el diagnóstico temprano del agente agresor, que conlleven a un tratamiento específico, así como de técnicas para la realización de estudios poblacionales en condiciones de campo que permitan un conocimiento claro y preciso de la magnitud del problema.
- d) Búsqueda de nuevas alternativas como la inmunización activa oral (80) utilizables en la prevención activa del ofidismo y sus secuelas.

El Perú es el segundo País en cuanto al número de especies reportadas de fauna ofídica venenosa en Sudamérica, después de Brasil, contando con más de 60 especies de serpientes venenosas distribuidas en los géneros *Bothrops*, *Lachesis*, *Crota/us*, *Micrurus*, *Leptomicrurus* y *Pe/amis*, correspondientes a 3 familias: Viperidae, Elapidae e Hydrophyidae respectivamente (20, 50, 51, 73, 74, 75).

El envenenamiento por mordeduras de serpientes de la subfamilia Crotalidae, se caracteriza por la presentación de lesiones cutáneas y sistémicas que puedan ocasionar la muerte del humano envenenado en pocos minutos u horas (5, 2, 74, 87). Las manifestaciones sistémicas incluyen hipotensión y shock; trastornos de la coagulación sanguínea y las células hemáticas. En el envenenamiento por *Crota/us durissus terrificus* "Cascabel", se añaden trastornos neurológicos (74, 75, 87). Los efectos locales incluyen edema local (42, 61) Y hemorragia debida a exudación de plasma o sangre total a nivel de los capilares, presuntamente provocada por una acción citotóxica a nivel del endotelio vascular (4, 14, 22). La necrosis es la manifestación local más seria, pudiendo ocasionar lesiones tróficas prolongadas y/o incapacitación motora permanente secundaria a amputación de miembros (30, 73).

Las principales actividades biológicas de los venenos ofídicos han sido caracterizadas según el órgano y/o sistema de la economía que es afectado durante el curso de envenenamiento. Así tenemos la presencia de neurotoxinas, cardiotoxinas, nefrotoxinas, hemolisinas, necrotoxinas, toxinas coagulantes (88) y/o anticoagulantes, hemorraginas, y otras (14, 33, 40, 59, 90, 92, 95,

107) considerándose el envenenamiento como la resultante de la interacción de las diferentes actividades biológicas.

Varios factores presentes en el veneno de serpientes han sido acusados de ser responsables de sus acciones tóxicas: proteínas con actividad enzimática (kalikreína, enzirpa similar a trombina, fosfolipasa) y polipéptidos de bajo peso molecular (neurotoxinas, cardiotoxinas, etc). Los eutacoides histamina y serotonina y diferentes péptidos han sido acusados de ser responsables de la actividad inflamatoria, acciones vasomotoras y la producción de dolor durante el envenenamiento (59, 69, 95, 107).

Múltiples son las enzimas que han sido detectadas en los venenos de serpiente. De ellas se consideran las más importantes a las enzimas proteolíticas, lipolíticas e hidrolíticas de los ácidos nucleicos (7, 14, 17, 26, 40, 47, 48, 55, 56, 59, 72, 76, 91, 93, 107). La actividad proteolítica ha sido relacionada por numerosos autores, con los fenómenos de necrosis, incremento de permeabilidad capilar, acción inflamatoria y alteración de la dinámica cardiovascular mediada por liberación de péptidos vaso activos (2, 7, 14, 21, 38, 42, 67, 72, 97, 113). La actividad citotóxica de los venenos ofídicos se ha relacionado a las actividades proteolítica y lipolítica o fosfolipásica. (43, 44, 90, 96) esta última es responsable de los cambios específicos de la permeabilidad iónica transmembrana en células neuronales, musculares y eritrocitos (59,90,96, 107). La actividad hidrolítica de ácidos nucleicos no tiene paralelismo comprobado con ninguna actividad biológica conocida, aunque se considera a la adenosina, producto final de algunas reacciones de este tipo como factor cardiotoxico e hipotensor (121).

El descubrimiento de las kininas en la década del 50 por Rocha y Silva y otros, durante el estudio de las acciones del veneno botrópico permitió el reconocimiento de un sistema enzimático, el sistema de las kininas, que posee importantes acciones sobre la coagulación sanguínea, presión arterial, permeabilidad capilar y respuesta inflamatoria local (51, 56, 62). El descubrimiento posterior de Ferreira (16) en el veneno de *B. jararaca* y de Kato y Susuki (26) en el veneno de *Agkistrodon halys blomhoffi*, de la existencia de péptidos con acción potenciadora de las acciones de las kininas sobre diferentes variedades de músculos lisos de mamíferos, ha permitido el reconocimiento de la relación existente entre el sistema de kininas y el sistema de renina-angiotensina modulador de la presión arterial al igual que el desarrollo posterior de poderosos agentes para el tratamiento de la hipertensión arterial como el captopril.

El ofidismo en el Perú es frecuente en la Amazonía, donde ocurre la mayor parte de los casos, muchos de los cuales no son registrados por falta de infraestructura de salud (5, 22, 30, 73, 74, 75, 87, 101). Con menor frecuencia se reportan casos en la región costera (110). Chang y Zavaleta realizaron en 1985 un estudio seroepidemiológico en el valle del Palcazu

(Huánuco) en la selva central del Perú. Los resultados mostraron que en algunas comunidades rurales, más de 50% de los pobladores habían sido mordidos alguna vez por una serpiente venenosa pero la mortalidad registrada fue menor al 5% de los casos. Las serpientes involucradas más frecuentemente fueron *Bothrops atrox* y *L. muta muta* (Zavaleta y Chang, resultados no publicados). En nuestro país, la mayor proporción de accidentes ofídicos registrados a nivel hospitalario son debidos a mordedura de serpientes de los géneros *Bothrops* (especialmente *B. atrox*) y *Lachesis*, constituyendo el envenenamiento lachésico el 10 a 15% de los accidentes (5, 22, 87).

Lachesis muta "shushupe" (foto 1) es una serpiente americana cuya área de distribución geográfica comprende desde Nicaragua, hasta Brasil, Bolivia y Perú (20, 50, 73, 75, 112). Hoge y Romano (51) definieron 3 subespecies: *L. muta muta* distribuida en Colombia, Venezuela, Ecuador, PerúBolivia, Brasil, Trinidad y Guyana; *L. muta stenophrys* presente en

Costa Rica y Panamá; y *L. muta noctivaga* que se encuentra exclusivamente en la región atlántica del Brasil. Una cuarta subespecie: *L. muta melanocephala* ha sido descrita recientemente en Costa Rica (45).

L. muta muta es una serpiente de gran tamaño, distribuida fundamentalmente en la selva tropical amazónica, considerada de gran peligrosidad para el ser humano debido a sus dimensiones y a la gran cantidad de veneno que es capaz de inyectar en sus víctimas. Theakston ha reportado recientemente la presencia de anticuerpos circulantes en pobladores de una comunidad nativa de la selva ecuatoriana. De ellos, el 37,5% de pobladores estudiados, presentó anticuerpos contra una o más especies del género *Bothrops* (105). Esto sugiere que la ocurrencia del ofidismo en comunidades rurales es mucho más alta de lo esperado y que un alto porcentaje de sujetos mordidos sobreviven, resultados coincidentes con los obtenidos por Chang y Zavaleta en el Valle del Palcazú, Huánuco, Perú en 1985.

El hecho resaltante de ocurrir el accidente lachesico en zonas rurales e ir asociado a elevada mortalidad inmediata en los sujetos envenenados, ha motivado la casi total ausencia de reportes de casos humanos. Sin embargo Silva Haad en Leticia, Colombia, reportó dos casos humanos en 1981, describiendo los síndromes coagulante, hipotensivo, hematológico y gastrointestinal de este envenenamiento (101).

Los estudios pioneros sobre el veneno de este ofidio fueron efectuados por Vellard entre 1947 y 1950 en Lima, definiéndolo como hemolítico, coagulante, hipotensor, hemorrágico, neurotóxico y letal (111). A pesar de las casi cuatro décadas transcurridas y numerosos estudios bioquímicos que han permitido identificar la presencia de hasta nueve enzimas diferentes (caseinólíticas, tamerásica, procoagulante similar a trombina, fosfolipasa A2' 5' nucleotidasa, exonucleasa y liberadora de kininas), se desconoce casi por completo los aspectos fundamentales de sus acciones farmacológicas.

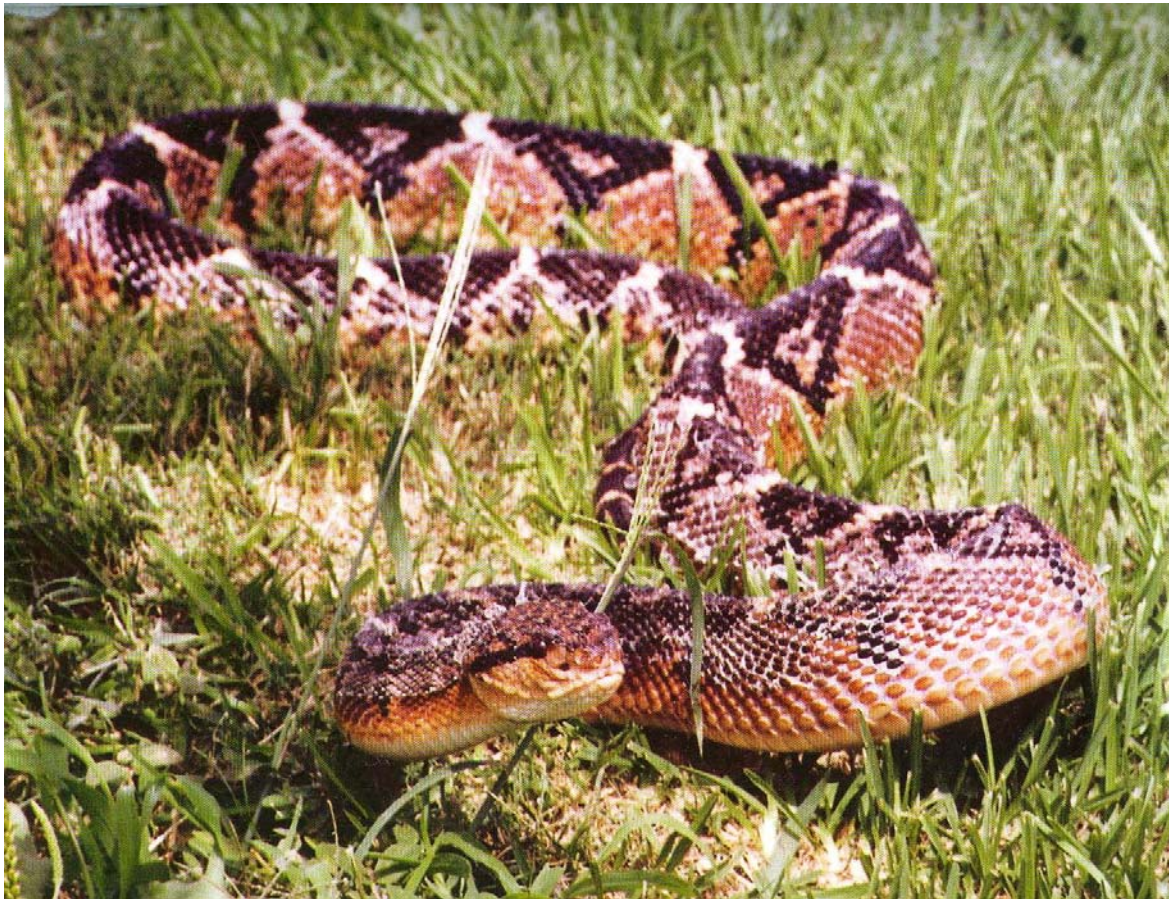
Luego de los estudios experimentales de Vellard (111), Meneses (74) y Magalhaes y col. (63,64,65,66), se reconoce para el veneno de *L. muta* los siguientes efectos biológicos: hipotensión arterial, coagulación intravascular por hipofibrinogenemia adquirida (coagulación intravascular diseminada); acción hemolítica, edematosa, hemorrágica, necrosante, neurotóxica y letal para humanos y una variedad de mamíferos (25, 37, 40, 42, 53, 61, 101, 122). En la última década, se han detectado en el veneno de *L. muta muta* las enzimas con actividad coagulante similar a Trombina; kalikreina; caseinólítica y fibrinolítica; hidrolíticas de ácidos nucleicos (exonucleasa, endonucleasa y 5' nucleotidasa), esterásica y fosfolipasa A (6, 17, 18, 19,27,46,47, 56, 60, 63, 64, 65, 66, 77, 102, 114, 15, 119, 120, 121).

El Instituto Nacional de Salud, inició en 1968 la producción de los sueros antiveneno ofídico para uso humano, entre los cuales se encuentra el suero antilachésico monovalente (ALM). Este antiveneno es preparado en equinos y constituye la única herramienta terapéutica disponible en la actualidad, para contrarrestar algunos de los efectos más importantes del veneno. Con el mejoramiento de las técnicas de producción de los antivenenos específicos para el tratamiento de la mordedura de las especies más prevalentes en diferentes regiones del orbe, la mayoría de víctimas del ofidismo sobreviven, y los síntomas de afección severa o generalizada disminuyen, (111) sin embargo, en muchos casos el daño tisular local no es prevenido totalmente por el uso de antivenenos (12, 14). Esta problemática se agrava por el hecho que la aplicación precoz del antiveneno, si bien permite la supervivencia de los accidentados, no impide totalmente la ocurrencia del efecto hemorrágico y mionecrótico (82, 83, 84, 85, 94). Esta situación adquiere mayor importancia en países como el nuestro, porque con frecuencia el antiveneno es administrado varias horas y aun días después de ocurrido el accidente, debido a

que nuestra cobertura de salud en las áreas rurales es marcadamente deficitaria (5, 30).

El único medicamento de eficacia antiletal comprobada actualmente es el antiveneno (23) por lo que su potencia neutralizante frente a las principales actividades biológicas del veneno inyectado, debe ser estandarizada por los fabricantes y por instituciones a cargo del control de calidad antes de su uso terapéutico en humanos. Puesto que la potencia de los antivenenos comerciales actualmente en uso, se titula en casi todos los países, únicamente contra la actividad letal del veneno, dejándose sin evaluar la potencia de otras actividades biológicas importantes relacionadas con efectos agudos y/o crónicos del envenenamiento, la Organización Mundial de la Salud ha planteado la necesidad de incrementar los estudios de los antivenenos, tendientes a la búsqueda de nuevas técnicas alternativas de titulación de su eficacia, a un bajo costo (111).

Son objetivos del presente trabajo la realización de un estudio sobre los efectos farmacológicos *in vivo* e *in vitro* del veneno de *L. muta muta*, la evaluación de nuevas técnicas para la estandarización del antiveneno peruano destinado al uso humano, así como la evaluación de 3 sistemas cromatográficos utilizados para el estudio y la caracterización bioquímica de los principios biológicos detectados en el veneno.



MATERIAL Y MÉTODOS

I ABREVIATURAS EMPLEADAS

DL50	Dosis letal 50%
DE50	Dosis efectiva 50%
DHM	Dosis Hemorrágica mínima
DHR	Dosis hemorrágica referencial
CPK	Creatina fosfo kinasa
DA50	Dosis aglutinante plaquetaria 50%
TAME	N-p-toluensulfonil-L-arginina ester metílico
Hb	Hemoglobina
UAH	Unidad Antihemorrágica
UAHE	antihemolítica
UAF	antifosfolipásica

2 MATERIALES Y REACTIVOS

2.1 VENENO OFIDICO

El veneno ofídico fue obtenido de ejemplares adultos de *Lachesis muta muta* procedentes de la zona del Alto Marañón (Departamento de Amazonas, Perú), por personal especializado del Departamento de Animales Venenosos del Instituto Nacional de Salud en Lima, Perú, mediante la técnica manual.

El veneno líquido extraído manualmente se sometió inmediatamente a centrifugación a 1000 xg durante 10 minutos a temperatura ambiente, y el sobrenadante se deseca al vacío sobre cloruro de calcio hasta cristalización, o se somete a liofilización.

El veneno se almacenó en forma sólida a -10° C hasta el momento de su utilización. Para el estudio, el veneno, fue diluído (P jV) en NaCl 0,85% o, solución Ringer apropiada.

2.2. OTROS REACTIVOS UTILIZADOS

Empleamos los siguientes reactivos: Sephadex G-100 Fino y superfino; Dextran Blue (Pharmacia, Suecia); histamina cloruro, acetato de amonio, NaCl y cloroformo (Carlo Erba); reactivo de Folin-Ciocalteu; caseína, albúmina sérica bovina tipo IV, carbonato de sodio, sulfato de cobre y tartrato de sodio y potasio; cloruro de acetilcolina; sulfato de atropina; bromuro de hexamethonio; 5 hidroxitriptamina maleato; trombina bovina; fibrinógeno bovino; colágeno Tipo I de tendón de Aquiles bovino; ADP; TAME; Trizma Base; Trizma HCL; buffer Tris-Imidazol (Sigma Chemical Co, USA); pentobabital sódico (Sanivet, Perú); Kit de CPK (Diagnostest, Lima); aprotinina (TrasyloI@, Bayer Químicas Unidas, Perú); N-Bz-(L-Pro)(L-Phe)-(I-Arg)- pNa: HCl (Chromozym@ PK, Pentapharm, Suiza); Suero Antilachésico monovalente (INS, Perú, lotes 10 y 12). El sulfato de ristocetina fue obtenido de Femmelweiss Centropa (Italia), y el papel parafilm de la American Can Company, USA. Los reactivos utilizados tuvieron calidad analítica.

2.3. ANIMALES EXPERIMENTALES

Se realizaron estudios del veneno de *L. muta muta* en los siguientes animales experimentales:

- *Cavia aperea* Variedad Porcellio "cuy" machos, 400 a 500 g de peso proporcionados por el Bioterio de animales menores del Instituto Nacional de Salud en Lima.
- Ratones albinos *Mus muscu/us* cepa Venezuela proporcionados por el Bioterio de animales menores del Instituto Nacional de Salud en Lima.
- Ratones albinos *Mus muscu/us* cepa Swiss proporcionados por el Bioterio del Instituto de Investigaciones de la Altura, Universidad Peruana Cayetano Heredia, Lima.
- Conejos *Orycto/agus cunicu/us* variedad Nueva Zelanda, de 2,5 a 3,5 Kg de peso, sin distinción de sexo, fueron proporcionados por el Bioterio de animales menores del Instituto Nacional de Salud en Lima.
- Perros sin distinción de raza ni sexo, de 6 a 15 Kg, fueron proporcionados por el Centro Antirrábico de Lima.
- Ratas albinas adultas *Ratus ratus* de cepa Holtzman (350 a 400 g) proporcionados por el Bioterio del Instituto de Investigaciones de la Altura, de la Universidad Peruana Cayetano Heredia, Lima.

3 METODOS

3.1 ESTUDIOS IN VIVO

3.1.1. Toxicidad aguda

Se determinó la Dosis Letal Media (DL50) por vía intraperitoneal, en ratones albinos cepa Venezuela de ambos sexos (14-18 g de peso). Para el estudio se emplearon 64 ratones, divididos en 8 grupos, los que fueron inyectados con 0,5 mL de soluciones de veneno crudo diluido en NaCl 0,85% (rango: 9,5 a 16,9 mg/Kg ratón). El grupo control fue inyectado con 0,5 mL de NaCl 0,85%. La mortalidad se registró periódicamente durante 72 horas. La DL50 fue calculada utilizando el método de Transformación en Probits (35), y como parámetros el logaritmo de la dosis (mg/kg ratón) y el porcentaje de la mortalidad. Los cálculos se realizaron en una microcomputadora empleando un programa computarizado desarrollado en la UPCH (Castro de la Mata, R. 1983, comunicación personal).

3.1.2 Actividad hemorrágica

La actividad hemorrágica del veneno crudo de *L. muta* y las fracciones obtenidas luego de filtración en columna de Sephadex G-100 superfino, se estudió en cuatro modelos experimentales: ratón (Técnica de Kondo); cobayo y conejo (Técnica de Kondo modificada por Aguirre, 1987) y sobre pulmón canino (Técnica de Bonta, (1970).

3.1.2.a Hemorragia en la piel del ratón (Técnica de Kondo, 1960). (58)

Este método se basa en la determinación del rango lineal de la gráfica de logaritmo de la dosis inyectada versus el diámetro medio de lesión hemorrágica producida en la piel del animal experimental luego de un intervalo de tiempo fijo. Se conoce que la relación entre

ambos parámetros es lineal para el intervalo de 10 a 20 mm de diámetro medio de lesión hemorrágica. Luego se obtiene mediante extrapolación gráfica o mediante cálculo estadístico, aquel valor de dosis que es capaz de provocar una lesión cuyo diámetro medio equivale a 10 mm de diámetro en la unidad de tiempo fijada, el que es definido como Dosis Hemorrágica Mínima (DHM).

Volúmenes de 0.1 mL de solución de veneno fueron inyectados por vía subcutánea en la piel del abdomen de ratones de cepa Swiss, adultos de ambos sexos (20 a 22 g, n=3 ratones/dosis). La capacidad del veneno, para producir hemorragia en la piel del ratón fué evaluada a las 24 horas en la piel evertida del abdomen.

Para evaluar cualitativamente la presencia o ausencia de hemorraginas en las fracciones obtenidas de las diferentes etapas cromatográficas en Sephadex G-100, se inyectan por vía subcutánea 0,1 mL de cada fracción, en la región abdominal de dos ratones, y se observa la lesión hemorrágica producida luego de 24 horas de envenenamiento, en la piel evertida del ratón.

3.1.2.b Hemorragia en piel de cobayo. (técnica de Kondo 1960, modificada por Aguirre y col 1987). (3,58).

Se emplearon 50 ejemplares machos de *Cavia aperea* val' porcellio (400 a 500 g), inyectándose el veneno de *L. muta muta* por vía subcutánea. En un ensayo típico, se depila la piel de la región abdominal de cobayo. Luego de 12 horas se inyecta por vía se. en la piel depilada del animal experimental, las dosis de veneno diluidas en NaCl 0,85% (peso/volumen), utilizando una progresión logarítmica de concentración.

En todos los casos, la preparación de las dosis se realizó el mismo día de la inyección. Se aplicaron 5 dosis de (0,1 mL) c/u, por animal experimental, empleando jeringas para tuberculina de plástico con aguja número 27 (Terumo Co., USA). Como control negativo, se inyectaron alícuotas de 0,1 mL de solución de NaCl 0,85% por vía se. A las 24 horas de envenenamiento se sacrifica al animal mediante inhalación de cloroformo, se disecciona la piel del abdomen y se everta sobre una placa de vidrio transparente para efectuar las mediciones de los diámetros de la lesión hemorrágica. Para la cuantificación, se realiza el dibujo de las lesiones hemorrágicas obtenidas, sobre una lámina de acetato. El área de la lesión hemorrágica es cuantificada mediante comparación, utilizando un retroproyector y una lámina control de acetato milimetrada, asumiendo para el cálculo, que la lesión hemorrágica tiene una forma circular. El diámetro de la lesión hemorrágica fue obtenido empleando la fórmula del área del círculo.

La Dosis Hemorrágica Mínima (DHM), se define como aquella cantidad de veneno que es capaz de producir una lesión hemorrágica de 10 mm de diámetro en la piel del animal experimental, en 24 horas.

La Dosis Hemorrágica Referencial (DHR) es definida como la dosis de veneno capaz de provocar una lesión hemorrágica de 20 mm de diámetro a las 24 horas en similares condiciones a las utilizadas para el cálculo de la DHM.

Para el cálculo de la Dosis Hemorrágica Mínima (DHM) Y la Dosis hemorrágica Referencial (DHR) se utilizan los parámetros logaritmo de la concentración de veneno aplicada (uyO,1 mL) y el diámetro de lesión hemorrágica obtenida, comprendidos entre 10 y 20 mm. Los resultados obtenidos fueron procesados matemáticamente utilizando el método de regresión lineal (29,

35,86) en una microcomputadora y el programa Lotus-123. versión 2.0 (Lotus Development Corporation, USA). Los cálculos fueron reconfirmados cuando fue necesario, mediante el programa estadístico NWA STA TPACK versión 3,1 (Norhtwest AnalyticalInc., Portland, USA).

3.1.2.c Hemorragia en el pulmón del perro

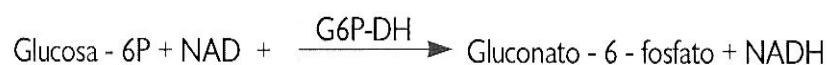
Para evaluar la hemorragia provocada por la aplicación tópica del veneno sobre la superficie pulmonar canina, se utilizaron seis perros machos (615 Kg), los que fueron anestesiados con pentobarbital sódico (Halatal®, Sanivet, Perú) a dosis de 3 mg/kg ev; y seguidamente se traqueotomizaron. Los perros fueron sometidos a respiración asistida con una bomba Palmer de respiración y en los casos en que fue necesario se administró una dosis adicional del anestésico (1,5 mg/kg ev). Para el estudio se utilizaron discos de papel de filtro Whatman NQ 1 de 5mm de diámetro, los que se remojaron con soluciones de veneno de L. muta (crudo y/o fracciones) y luego se aplicaron durante 3 minutos sobre la superficie pulmonar. La presencia o ausencia de lesión homorrágica en el sitio de aplicación del veneno luego de retirado el disco de papel, se registró durante un período de observación de 90 minutos.

3.1.3 Actividad mionecrótica

Se utilizó la técnica de determinación de la enzima Creatina Fosfoquinasa (CPK) plasmática en ratones en forma similar a la reportada por Mebs (70) y Nakada y col (79). Para el estudio empleamos ratones albinos de cepa Venezolana (machos, 24 a 26 g de peso).

En un experimento típico, grupos de 2 a 12 ratones fueron inyectados por vía intramuscular en la pata trasera posterior derecha, utilizando dosis de veneno de concentración variable. Los ratones del grupo control que incluyeron de 2 a 4 ratones fueron inyectados por la misma ruta empleando volúmenes equivalentes de solución de NaCl 0,85%. Las muestras de sangre (aproximadamente 70 uL) se colectaron en capilares heparinizados, seccionando una de las venas de la cola del ratón. La sangre obtenida en el capilar fue centrifugada a 2500 rpm durante 3 minutos a temperatura ambiente. El hematocrito fue determinado por la técnica del microhematocrito. El plasma se separa y se vierte sobre una lámina de papel Parafilm de 2 x 2 cm, utilizándose alícuotas de 20 uL para el dosaje de CPK.

Para la cuantificación de la actividad de CPK se utilizó el método de en..., zimas acopladas con lectura en rango visible (Kit de CPK. Diagnostest). Para las determinaciones se emplearon cubetas de cuarzo de 1 centímetro y un espectrofotómetro Zeiss M4QIII. Las reacciones enzimáticas acopladas miden la aparición de NADH. leída a 340 nm y a 25 DC en función del tiempo durante 5 minutos. La actividad de CPK guarda relación lineal en función del tiempo de reacción durante los primeros 8 minutos. Las reacciones acopladas utilizadas en el método son:



Para la determinación de la relación de dependencia entre el efecto mionecrótico y la concentración de veneno inyectada. así como para seleccionar una dosis de reto adecuada

para los estudios de neutralización se emplearon 5 grupos de 4 a 6 ratones a los que se les determinó los valores basales de CPK. Veinticuatro horas más tarde los grupos previamente seleccionados al azar se inyectaron con 50 uL de solución de NaCl 0.85% (grupo control) o veneno (120. 250. 375. 0500 ug/ratón) respectivamente. Las muestras de sangre para la determinación de CPK fueron colectadas a las 3 horas de envenenamiento.

Para la determinación de la variación de los niveles de CPK en función del tiempo de envenenamiento. se utilizó un grupo de 12 ratones inyectados con 50 uL por vía intramuscular de veneno liofilizado de *L. muta muta* (5mg/mL. 10 ug/g ratón). Un grupo de 4 ratones fueron inyectados con 50 uL de NaCl 0,85% y utilizados como control. Se colectaron muestras seriadas de sangre de la vena caudal para la determinación de CPK plasmático, a las 0, 3, 6, 9 Y 24 horas de envenenamiento.

3.1.4. Efectos sobre la presión arterial y la respiración del perro anestesiado.

Cincuentaicuatro perros chuscos de ambos sexos (6 a 15 kg de peso). fueron anestesiados con pentobarbital sódico (30 mg/kg, ev) y traqueotomizados. En aquellos casos en que fue necesario prolongar el efecto anestésico, se aplicó una segunda dosis de 15 mg/kg evo La presión arterial carotídea fue registrada con un manómetro de mercurio, y los movimientos respiratorios con la ayuda de un neumógrafo sobre un quimógrafo del papel ahumado. El veneno y los fármacos ensayados, fueron inyectados por vía intravenosa a través de una cánula colocada en la vena safena externa izquierda. Se utilizó un volumen de empuje de 2 mL de NaCl 0,85%.

La vagotomía cervical bilateral fue practicada en 4 perros en el estudio del sitio y mecanismo de acción hipotensora del veneno crudo. Se aplicó respiración artificial a cuatro perros, mediante una bomba Palmer de respiración, con la finalidad de determinar la influencia de la falla respiratoria sobre la mortalidad provocada por una dosis letal de veneno lachésico.

3.2 ESTUDIOS IN VITRO

3.2.1 Contenido protéico

El contenido protéico del veneno crudo cristalizado y/o liofilizado, así como de las fracciones obtenidas del veneno cristalizado luego de la filtración en Sephadex fue estimado mediante la técnica de Lowry modificada por Stauffer (45), utilizando buffer alcalino (Na₂ CO₃ 1 M, NaOH 0,25 M), re activo de Cobre (CuSO₄.5H₂O al 0,1%, Tartrato de Na⁺ y K⁺ al 0,1%) y re activo de FolinCiocalteau (1 :4). Como standard solución acuosa de albúmina sérica bovina a concentracones de 1 mg/mL.

3.2.2. E.studios en órganos aislados

Las soluciones de veneno fueron disueltas en solución isotónica apropiada, inmediatamente antes de la prueba, y luego ensayadas en las siguientes preparaciones: aorta aislada de conejo; ileon. útero y nervio frénic<Xliafragma de rata, según las especificaciones del staff del Departamento de Farmacología de la Universidad de Edimburgo (109). Las concentraciones utilizadas son expresadas en términos de concentración final en el baño. Para los ensayos se utilizaron además los siguientes fármacos: cloruro de acetilcolina; sulfato de atropina; bromuro de hexamethonio; atropina; aprotinina. histamina cloruro y 5 hidroxitriptamina maleato.

3.2.2.a Ileon aislado de rata. (Método de Magnus, 1904)

Se utilizaron en el estudio 10 ratas adultas de cepa Holtzman (350 a 400 g). En los experimentos (n=20) se utilizaron segmentos de 3 a 3.5 cm de ileon. los que fueron sus pendidos en un aparato de órganos aislados conteniendo 10 ml de solución de Tyrode a 37°C constantemente burbujeando con 100% Oxígeno. registrándose a continuación las contracciones longitudinales isotónicas. mediante una palanca inscriptora sobre quimógrafo de papel ahumado.

3.2.2.b Utero aislado de rata. (Método de De Jalon y col, 1945)

Se utilizaron en el estudio 10 ratas adultas hembras no grávidas. de cepa Holtzman (350 a 400 g). Inmediatamente después de sacrificadas las ratas. se obtuvieron ambos cuernos uterinos. los que fueron seccionados longitudinalmente. obteniéndose 4 segmentos de músculo uterino. Estos segmentos fueron colocados a continuación en un aparato de órganos aislados conteniendo 10 mL de solución de De Jalon a 37°C burbujeada constantemente con 100% O₂. Las contracciones espontáneas. y las inducidas por los fármacos fueron registradas isotónicamente con un quimógrafo de papel ahumado.

3.2.2.c Aorta aislada de conejo. (Método de Furchgott y Bardrakon, 1953).

Segmentos de aorta torácica fueron obtenidos de conejos adultos Nueva Zelanda (n=4), practicándose un corte en espiral. a fin de obtener segmentos de 3 a 4cm de largo. Los segmentos obtenidos fueron inmediatamente montados en un aparato de órganos aislados, conteniendo 10 mL de solución Krebs a 37° C. Los efectos del veneno y otros fármacos fueron registrados isotónicamente con un quimógrafo de papel ahumado.

3.2.2.d Nervio Frénico-Diafragma de rata. (Método de Bulbring, 1947).

Ocho ratas adultas Holtzman (250-400 g de peso), sin distinción de sexo, fueron utilizados para el estudio de los efectos del veneno de *L. muta muta* sobre la preparación neuromuscular de la rata. Las ratas fueron sacrificadas mediante decapitación, desangradas e inmediatamente toracotomizadas. Se expuso el hemitórax izquierdo, y se individualizó el nervio frénico izquierdo, ligándosele a nivel cervical, y posteriormente se disecó el nervio hasta la proximidad del músculo diafragma correspondiente. Seguidamente, este último fue seccionado a nivel de la línea media y desincertado de su inserción tendinosa posterior, extrayéndose a continuación el músculo diafragma con las costillas correspondientes a su inserción muscular, conjuntamente con el nervio frénico. La preparación fue montada en un aparato de órganos aislados, conteniendo 20 mL de solución Krebs a 37°C. Durante el experimento, se aplicó estimulación eléctrica indirecta sobre el nervio frénico mediante electrodos de plata (0,1 Hertz, 5 a 7 voltios). Los efectos del veneno y otros fármacos fueron registrados isotónicamente con un quimógrafo de papel ahumado.

3.2.3 Aglutinación plaquetaria

Para la evaluación de la capacidad aglutinante plaquetaria, utilizamos la metodología descrita previamente por Zavaleta y col. (124). Se compararon los efectos aglutinantes sobre plaquetas humanas formolizadas, del veneno de *L. muta muta* con los producidos por una muestra de veneno de *B. brazili* utilizada como control positivo (124) y con diferentes agregantes plaquetarios: trombina humana; colágeno Tipo I y sulfato de ristocetina.

Las plaquetas fueron obtenidas a partir de sangre humana del grupo O factor Rh positivo

colectada en bolsas conteniendo citrato de sodio al 3,8% como anticoagulante. Las plaquetas fueron separadas del plasma mediante centrifugación a 750 xg durante 10 minutos a la temperatura ambiente. Inmediatamente después de obtenido el plasma rico en plaquetas, este fue incubado a 37° C durante 30 minutos y luego mezclado en partes iguales con solución de formol al 2% y mantenido a 4° C durante 18 horas. Una vez fijadas, las plaquetas fueron sometidas a tres lavados consecutivos con solución tampón fosfato 0,1 M a un pH de 7,3. Las plaquetas fijadas mantienen sus propiedades aglutinantes hasta por 15 días si se almacenan en viales de plástico a -70° C.

Para los experimentos del presente trabajo, las plaquetas fijadas fueron utilizadas dentro de los siete días de su obtención, resuspendidas en solución tampón fosfato 0.1 M a pH de 7.3 en dos proporciones diferentes: SRP (suspensión rica en plaquetas, 300000 plaquetas/mm³ y SPP (suspensión pobre en plaquetas, 150 000 plaquetas/mm³).

Para las pruebas de aglutinación, el veneno fue diluido con NaCl al 0.9% (1 a 20 mg/mL) y adicionado en volúmenes variables (1 a 50 uL/tubo) en una cubeta conteniendo 0,45 mL de SRP. La cubeta usada como referencia contenía 0,45 mL de SPP, a la que se le adicionó volúmenes equivalentes de NaCl 0,9% en lugar del veneno. Los ensayos se efectuaron por duplicado. El recuento de plaquetas se realizó en cámara de Neubauer, por el método de contraste de fases de Brecher y Conkrite (11). Los efectos del veneno fueron registrados por un período de cinco minutos, y la aglutinación plaquetaria fue expresada en porcentaje utilizando la fórmula siguiente:

$$\% \text{Aglutinación} = \frac{T_{SRP} \times 100}{T_{SPP}}$$

donde T es la transmitancia a los S minutos a temperatura de 37°C. La agregación plaquetaria fue estudiada en un lumiágregómetro Cronolog.

La Dosis Aglutinante 50% (DA50) fue calculada con el método de transformación en Probits (35), utilizando como parámetros el logaritmo de la dosis (ug/mL) y el porcentaje de aglutinación plaquetaria obtenido. Los cálculos se realizaron en una microcomputadora empleando un programa computarizado desarrollado localmente (Castro de la Mata, 1983, comunicación personal).

3.2.4 Actividad proteolítica

La actividad proteolítica del veneno fue determinada empleando dos métodos diferentes: El método de Kunitz modificado por Villegas (10,115) que utiliza caseína como sustrato y el método de Hummel que utiliza N-p-toluen-sulfonil-L-arginina éster metílico (TAME) como sustrato (52).

Para los ensayos se disolvió el veneno en NaO 0,85% a una concentración final de 0,5 mg/mL. Todas las determinaciones de actividad enzimática se realizaron el mismo día que se preparó la dilución del veneno.

3.2.4.a Actividad Caseinolítica

Se utilizó como sustrato Caseína según Bergmeyer (10) con las siguientes modificaciones: caseína (Sigma, USA) a una concentración de 1 % (P:V) en buffer fosfato a 0,1 M, pH 8,7. La mezcla de reacción contenía 1 mL de sustrato, 0,1 mL de solución de veneno en NaO 0,85% y 0,9 mL de

buffer fosfato. Luego de 20 minutos de reacción a 35°C, la reacción se detuvo adicionando 3 mL de ácido tricloroacético al 5%. Las proteínas hidrolizadas precipitan luego de centrifugación a 2 500 rpm durante 20 minutos. Los residuos ácido solubles presente en el sobrenadante son estimados a 280 nm en un espectrofotómetro (115).

La actividad específica del veneno se expresa en unidades de actividad caseinolítica para un tiempo de incubación de 20 minutos a 37°C. Para el cálculo de la actividad específica se utilizó la siguiente fórmula:

$$AE = \frac{\Delta \text{Abs}_{280\text{nm}} \cdot V}{t \cdot v \cdot c} \text{ Unidades/minuto} \times \text{mg proteína.}$$

donde:

V = volumen total (en mL).

v = volumen del veneno en mL.

c = concentración del veneno en mg de proteína/mL.

t = tiempo de reacción en minutos.

3.2.4. b Actividad Esterásica

Se utilizó el método de Hummel (52) que emplea N-p-toluen sulfoniL-arginina metil ester (TAME) como substrato, a una concentración de 10 mM. La mezcla de reacción contenía 0,3 mL de substrato, 0.1 mL de solución de veneno en NaCl 0,85% y 2,6 mL de buffer tris (46 mM, pH 8,1) conteniendo 11,5 mM de CaCl₂. La actividad es medida en un espectrofotómetro a 247 nm, a temperatura ambiente durante 10 minutos.

La actividad Tamesterásica se expresa en unidades/mg de proteína. Una unidad de actividad tamesterásica es la cantidad de enzima capaz de liberar un micromol de N-p-toluen-L-arginina por minuto a 25°C. Para el cálculo de la actividad específica se utilizó la siguiente fórmula:

$$AE = \frac{U \cdot V}{\epsilon \cdot d \cdot v \cdot c} \text{ Unidades/min} \times \text{mg proteína}$$

donde:

U = número de unidades/mL

V = volumen total (en mL).

ε = coeficiente de extinción molar del TAME a 247 nm
(E_{247 nm} = 540 L/mol × cm)

v = volumen del veneno en mL.

c = concentración del veneno en mg de proteína/mL.

d = diámetro de la cubeta.

3.2.5 Actividad fosfolipásica

Se empleó el método turbidimétrico de Marinetti (68), que se basa en la disminución de la turbidez, por acción de la fosfolipasa sobre la lecitina de una suspensión de yema de huevo. Esta reacción es cuantificada en un espectrofotómetro a 925 nm.

Para el ensayo, alícuotas de 160 uL de una solución de veneno de 0,031 a 1 mg/mL fueron adicionadas a 200 uL de una suspensión de yema de huevo al 2% en buffer tris-HCl 50 mM, conteniendo CaCl₂ 10 mM a pH 7,5, Y llevadas a un volumen final de 1,2 mL con una solución de Cloruro de Sodio 0,85% a pH 7,8;

luego son incubadas por 15 minutos a 41 °C. La absorbancia es leída a 925 nm y registrada a los 0, 5, 10 y 15 minutos de incubación. Para efectos de la prueba se equilibra la absorbancia de la solución a 0,6 unidades al minuto 0 de la reacción.

Una unidad de actividad se define como la cantidad de enzima capaz de producir una disminución de 1 miliunidad de absorbancia por minuto, durante 10 minutos:

$$U. \text{ de actividad/min} = \frac{(\text{Abs } 0' - \text{Abs } 10') \times 1000}{10 \text{ minutos de reacción}}$$

y actividad específica según la fórmula:

$$\text{Actividad Específica} = \frac{U. \text{ de actividad/min}}{\text{mg de proteína}}$$

3.2.6 Actividad Coagulante (81,119)

Se utilizó una solución de fibrinógeno bovino de 5 mg/mL en buffer fosfato salino (PBS) 0,02 M a pH 7,4. La mezcla de reacción contenía 0,4 mL de solución de fibrinógeno bovino y 0,1 mL de NaCl 0,85% o solución de veneno, midiéndose a continuación el tiempo de coagulación total a 37°C. Como estandar utilizamos Trombina bovina (Sigma, USA, lote 7S-F-9466; 52 Unidades INH/mg). Para el cálculo de la potencia coagulante del veneno, se comparan gráficamente el logaritmo de las unidades coagulantes del veneno, se comparan gráficamente el logaritmo de las unidades de trombina INH versus el logaritmo del tiempo de coagulación obtenido. Los resultados obtenidos para el veneno son superpuestos en la misma gráfica, y el cálculo de la potencia coagulante se extrapola gráficamente para un tiempo fijo de 80 segundos.

3.2.7 Actividad de Acetilcolinesterasa

Se utilizó el Método de Ellman et al. modificado por Bennett, y Rosenz, weig (9). Se pipeteó en cada tubo de ensayo: 50 uL de acetiltiocolina 0,037 M. (Sigma Chemical Company), 100 uL del reactivo de Ellman, ácido 5,5' - ditiobis - 2 (2 - nitrobenzoico) (DTNB) Y la cantidad necesaria de buffer fosfato de sodio 0,1 M pH 8,0, para llegar a un volumen final de 3 mL. Los tubos se incubaron a 25°C por 3 a 5 minutos y luego se pipetearon distintas soluciones de veneno de *L. muta* desecado, cristalizado y reconstituido en NaCl 0,9%. La formación del producto coloreado 5-tionitro- benzoato (5-TNB) se cuantificó a 412 nm en un espectrofotómetro Cary modelo 118, utilizando cubetas de plástico de 1 cm. La reacción fue evaluada durante 15 minutos a 25°C.

3.2.8 Actividad de Kalikreina

Se empleó el método de Svendsen en forma similar a la descrita previamente por Loayza (60), utilizando como sustrato cromógeno al N-Bz- (L-Pro)-(LPhe)-(L-Arg)- pNa: HCl (Chromozym@ PK, Pentapharm, Suiza), sustrato específico para Kalikreina plasmática. El sustrato sintético es un derivado tripeptídico en el que la p-nitroanilina está unida como grupo cromógeno mediante un enlace amida al grupo carboxil de la arginina, siendo el tripeptido Pro-PheArg, reconocido específicamente por la enzima kalikreina plasmática. La hidrólisis enzimática del sustrato produce la liberación del grupo p-Na, el cual es cuantificado a 405 nm en un espectrofotómetro.

Se ensayaron alícuotas de veneno crudo de *L. muta muta* (0,1 mg/mL) así como del eluato obtenido de la cromatografía en Sephadex G-100 Fino (sistema 1). Para las determinaciones, las muestras fueron diluidas 1 :20 con NaCl 0,85%, y el sustrato se preparó en solución acuosa a una concentración final de 1 mg/mL.

La mezcla de reacción contiene:

1,8 ml de buffer tris-imidazol O, 15M a pH 7,9
0,1 ml de muestra problema.

Luego de preincubar la mezcla de reacción por 2 minutos a 37°C, se adiciona 0,1 mL del sustrato Chromozym® PK, midiéndose el incremento de absorbancia a 405 nm durante 6 minutos. A la muestra control se le adicionó 0,1 mL de NaCl 0,85% en lugar de veneno. Una unidad enzimática de Kalikreina se define como la cantidad de enzima que hidroliza un micromol del sustrato sintético por minuto a 37°C. La actividad específica se expresa como el número de unidades/mg de proteína.

Para el cálculo de actividad específica se utilizó la siguiente fórmula:

$$AE = \frac{U \cdot V}{\epsilon \cdot d \cdot v \cdot c} \text{ Unidades/mg proteína}$$

donde:

- U = número de unidades/mL
- V = volumen total (en mL).
- ϵ = coeficiente de extinción molar de p-Na a 405 nm.
- v = volumen del veneno (en mL).
- c = concentración del veneno (en mg de proteína/mL)
- d = diámetro de la cubeta.

3.3 FRACCIONAMIENTO DEL VENENO

Con la finalidad de evaluar el perfil de elusión protéico del veneno, así como las diferentes actividades biológicas presentes en éste, se ensayaron tres sistemas de filtración en Gel Sephadex G-100, utilizando Dextran blue 2000, para la determinación del volumen de exclusión (V_o):

Sistema 1: Sephadex G-100 Fino utilizando como buffer de corrida la mezcla Tris 0,05 M, NaCl 0,15M, a pH 8,5, en una columna de 1,5 x 63 cm, a un flujo de 6 mL/hora; fracciones de 2,5 mL/tubo. (18, 19,119).

Sistema 2: Sephadex G-100 Superfino utilizando como buffer de corrida la mezcla Tris 0,05M, NaCl 0,15M, a pH 8,5, en una columna de 1,5 x 63 cm, a un flujo de 2,5 mL/hora; fracciones de 2,0 mL/tubo (18,19,119).

Sistema 3: Sephadex G-100 Superfino utilizando como buffer de corrida Amonio acetato 0,2 M a pH 8,4, en una columna de 1,6 x 97 cm, a un flujo de 5,2 mL/hora; fracciones de 2,6 mL/tubo.

En los sistemas 1 y 2 se empleó la metodología descrita previamente para la primera etapa de purificación de la enzima similar a trombina y de exonucleasa (18) del veneno de *L. muta*.

En todos los casos, la solución de veneno fue centrifugada a 2 500 xg. por 15 minutos para descartar todo el material insoluble, en una centrífuga Sorvall refrigerada. El precipitado fue descartado y el sobrenadante se aplicó a la columna cromatográfica, y el perfil de elusión fue estimado leyendo la absorbancia a 280 nm del veneno eluido en un espectrofotómetro Zeiss M4QIII.

Las actividades biológicas: hipotensión arterial, hemorragia en piel de ratón, cobayo y pulmón de perro; coagulante, caseinolítica, esterásica y fosfolípásica, fueron estudiadas en el veneno crudo y fraccionado, utilizando alícuotas de 0,3 a 0,5 mL del eluato obtenido, según las técnicas descritas anteriormente, (Ver sección 3.2)

3.3. I Actividad hipotensora

En un experimento típico, 50 a 200 mg de veneno crudo fueron disueltos en 102 mL de NaCl 0,9% (50-100 mg/mL, concentración final) y seguidamente aplicados a una columna cromatográfica de 1,5 x 68 cm yeluidos con el buffer de equilibrio a temperatura ambiente (22-24°C), con un flujo de 9 mL/jhora. El filtrado fue colectado en fracciones de 2 a 3 mL/tubo, registrándose su absorbancia a 280 nm. Las fracciones obtenidas fueron congeladas a -10°C y la actividad hipotensora del filtrado obtenido fue ensayada en el perro anestesiado. Utilizando alícuotas de 0,1 mL de cada tubo, los que se inyectaron en forma secuencial por vía evo a intervalos de 5 minutos entre dosis. Las fracciones que presentaron actividad hipotensora fueron reunidas, y liofilizadas y posteriormente resuspendidas en agua destilada y la sal extraída mediante filtración en una columna de Sephadex G25 (10 x 25 cm) reequilibrada con buffer amonio-acetato 0.1 M a pH 7.3 obteniéndose alícuotas de 5 mL/tubo del filtrado, procediéndose al ensayo de actividad hipotensora por el método antes descrito. Dos alícuotas de 20 mg cada una, de la fracción hipotensora libre de sales fueron disueltas en buffer amonio-acetato 0.1 M a pH 7,3 (50 mg/mL) y recromatografiadas por separado en columnas (1.6 x 94 cm) de Sephadex G-50 y G-120-150 respectivamente, utilizando como buffer de elusión amonio-acetato 0,1 M a pH 7,3. La recromatografía fue realizada a 10°C. con un flujo de 5 mL/h. Se colectaron alícuotas de 3 mL/tubo de eluato. Se estimó espectrofotometricamente la absorbancia a 280 nm y posteriormente se ensayaron alícuotas de 0,1 mL de eluato en el perro anestesiado para detección de actividad hipotensora, empleando la técnica antes descrita.

3.3.2 Actividad hemorrágica en pulmón de perro

Fue estudiada con los sistemas 1 y 2 de Filtración en Sephadex. Para el estudio se remojó discos de papel de filtro de 5 mm de diámetro con el eluyente o: r tenido en cada tubo. A continuación el papel remojado con la fracción correspondiente se aplica a la superficie pleural del pulmón anestesiado durante 3 minutos. La presencia o ausencia de lesión hemorrágica local se registra hasta los 60 minutos después de retirado el disco de papel de filtro. Como controles se utilizaron discos remojados con el buffer de corrida.

3.3.3 Actividad liberadora de kininas (Similar a Kalikreína)

Fue estudiada en el Sistema 1 de filtración en Sephadex G-100. Alícuotas de 0,1 mL de cada tubo conteniendo el eluyente de la columna cromatográfica, son ensayados mediante la técnica de Svendsen modificada por Loayza (60) utilizando el sustrato cromógeno Chromozym@ PK. en similares condiciones a las utilizadas para el estudio de esta actividad en el veneno crudo (sección 3.2.8)

3.3.4 Actividad hemorrágica en piel de ratón

Fue estudiada en el Sistema 2 de filtración en Sephadex G-100. Alícuotas de 0.1 mL de cada tubo conteniendo el eluyente de la columna cromatográfica. son inyectados por vía se. en la piel de la región abdominal de ratones adultos. Luego de 24 horas se sacrifica al animal experimental. se retira la piel de la zona abdominal. y se registra la presencia o ausencia de lesión hemorrágica en la cara interna de la piel de cada animal experimental inyectado. Como

control se utilizó 0.1 mL de buffer de corrida. inyectado en un grupo de 3 ratones.

3.3.5 Actividad hemorrágica en piel de cobayo

Fue estudiada en el sistema 3 de filtración en Sephadex G-100. La actividad hemorrágica de cada tubo de eluyente. fue ensayada inyectando 0.1 mL de cada tubo por vía subcutánea en cobayos, registrándose luego de 24 horas la presencia o ausencia de lesión hemorrágica en la piel evertida. el diámetro de las lesiones hemorrágicas obtenidas. La actividad relativa hemorrágica es expresada en mm de diámetro hemorrágico/unidad de absorbancia a 280 nm.

3.3.6 Actividad caseinolítica, TAMEsterásica, coagulante, Fosfolipasa A2

Fue estudiada utilizando el Sistema 3 de filtración en Sephadex G-100. Alícuotas del eluato de la columna cromatográfica de 30 ul fueron utilizadas para el ensayo de la actividad caseinolítica según la técnica de Kunitz.; 50 uL para el ensayo de actividad TAMEsterásica según la técnica de Hummel; 20 uL para el ensayo de actividad coagulante sobre fibrinógeno bovino, y 30 ul para la detección de fosfolipasa A2 por el método de Marinetti.

3.4 INHIBICION Y NEUTRALIZACION DE ACTIVIDADES BIOLÓGICAS POR SUERO ANTILACHESICO COMERCIAL.

3.4.1 Actividad antiletal

Se determinó la Dosis Efectiva Media Antiletal (DE 50) del suero Antilachésico monovalente (INS, Perú, lote 10), en ratones albinos machos de cepa Venezolana (18 a 22 g de peso) por vía intraperitoneal. Para el estudio se utiliza como dosis de reto de veneno cristalizado, el equivalente a 2DL50 ip, 48 horas (9,25 mg/kg ratón), diluido en un volumen de 0,1 mL de NaCl 0,85%. La dosis de reto de veneno, se combina con 0,4 mL de diluciones apropiadas de suero antilachésico monovalente (INS, lote 10) y se preincuba a 37°C durante 30 minutos, al cabo de los cuales se inyecta 0,5 mL de la mezcla o control correspondiente por vía intraperitoneal.

Para el estudio se emplearon 64 ratones, divididos en 8 grupos, según el esquema mostrado en la Tabla 1.

Los grupos control fueron inyectados con

- | | |
|-----------------------|---|
| a) control salino | 0,5 mL de NaCl 0,85% |
| b) control antiveneno | 0,4 mL de antiveneno sin diluir +
0,1 mL de NaCl 0,85% |
| c) control veneno | 0,1 mL de veneno (2DL50) + 0,4 mL de NaCl
0,85% |

TABLA I
CONDICIONES EXPERIMENTALES DEL ESTUDIO DE
NEUTRALIZACION DEL VENENO DE *Lachesis muta muta* POR EL SUERO
ANTILACHESICO MONOVALENTE (INS, PERU, LOTE 10)

Grupo	Veneno L.muta (mg/kg)*	Antiveneno (uL)	NaCl 0,85% (uL)
1	9,25	400	0
2	9,25	200	200
3	9,25	100	300
4	9,25	50	350
5	9,25	30	370
6	9,25	12	388
control veneno	9,25	0	400
control antiveneno	0,00	400	100
control NaCl 0,85%	0,00	0	500

(*) Dosis de reto = 2DL50, ip., 48 horas, Volumen final de inyección = 0,5 mL.

La mortalidad se registró periódicamente durante 48 horas. La DE50 fue calculada con el método de transformación en Probits (35), utilizando como parámetros el logaritmo del volumen de antiveneno utilizado para inhibir 2DL50 de veneno ofídico y el porcentaje de la mortalidad registrado a las 48 horas de envenenamiento. Los cálculos se realizaron en forma similar a la descrita para la estimación de la DL50.

3.4.2 Actividad antihemorrágica del suero antilachésico comercial

Se tituló la potencia antihemorrágica del suero antilachésico monovalente (INS, Perú, lote 10). Para la estandarización de la actividad antihemorrágica se empleó una dosis de veneno equivalente a una DHR combinada con volúmenes variables del antiveneno (dilución 1/10) preparados en progresión logarítmica. La dosis de veneno, o veneno+antiveneno fue en rasada a un volumen final de 0,1 mL adicionando NaCl 0,85% estéril, e incubando a 37°C por espacio de 30 minutos, luego de los cuales se procedió a la inyección de 12 cobayos por vía subcutánea. A las 24 horas se sacrificó al cobayo, se retiró la piel del abdomen, y los diámetros de la lesión obtenida se registraron en forma similar a como se ha descrito para la determinación de la DHM. En forma paralela se inyectaron volúmenes de 0,1 mL de NaCl 0,85%, suero y veneno como control.

Los parámetros logaritmo del volumen de suero utilizado expresado en micrólitros, versus diámetro de lesión hemorrágica fueron graficados y sometidos a análisis estadístico de regresión lineal, usando el programa LOTUS 123 en una microcomputadora, a fin de determinar la mínima cantidad de suero capaz de producir una disminución del diámetro de lesión de 20 a 10 mm. Dicha cantidad se definió como una unidad antihemorrágica (UAH). La potencia del suero se expresa como número de UAH/ mL de suero, o por frasco de 10 mL.

3.4.3 Inhibición del efecto mionecrótico en ratón

Se determinó los valores basales de CPK en 3 grupos de ratones. Veinticuatro horas después se inyectó por vía intramuscular la mezcla a ensayarse (control veneno, control antiveneno; o

veneno+antiveneno), previa incubación a 37°C por 30 minutos.

La composición de las mezclas ensayadas fue:

- Control antiveneno:

25 uL/ratón de suero antilachesico comercialiofilizado (Lote 12, INS, Perú) resuspendido en 3mL. (en esta proporción el suero está 3,3 veces más concentrado en relación al suero líquido del mismo lote). El volumen final de inyección es en rasado a 50 uL con NaCl 0,85%.

- Control Veneno:

50 ul de solución de veneno liofilizado en NaCl 0,85% (10 mg/mL, concentración final).

- Veneno + antiveneno:

Se combina volúmenes 1:1 de solución de veneno en NaCl 0,85% (20 mg/mL), con suero antilachésico comercial (liofilizado y resuspendido en 3,3 mL). El volumen final inyectado fue de 50 uL.

Tres horas después de aplicada la mezcla correspondiente, se colecta las muestras de sangre para determinación de la actividad de CPK plasmática. La actividad mionecrótica inducida por veneno control, a las 3 horas, fue considerado como 100% de actividad. Los resultados obtenidos son expresados como porcentaje promedio de inhibición producida por el antiveneno, utilizando la fórmula:

$$\% \text{ inhibición} = 100 - \left\{ \frac{D-B-C}{A-B-C} \times 100 \right\}$$

donde:

A = CPK de grupo control veneno a las 3 horas - CPK de grupo control veneno a las 0 horas.

B = CPK de grupo control salino a las 3 horas - CPK de grupo control salino a las 0 horas.

C = CPK de grupo control antiveneno a las 3 horas - CPK de grupo control antiveneno a las 0 horas.

D = CPK de grupo veneno + antiveneno a las 3 horas - CPK de grupo control veneno + antiveneno a las 0 horas.

3.4.4 Inhibición de Actividad Fosfolipásica

En un ensayo típico se preparó una mezcla de reacción veneno-antiveneno cuyo volumen final fue fijado en 320 uL y contenía:

a) 160 uL de solución de veneno diluido en NaCl 0,85% (2 ug/mL, 320 ug/tubo).

b) 160 uL de diluciones apropiadas de antiveneno en NaCl 0,85% (0,1 :1, 1 :2, 1 :4, 1 :8, 1 :32, 1 :64, V:V). (suero antilachésico monovalente Lote 10). El control veneno, estuvo constituido por 160 uL de solución de veneno reemplazándose el volumen de antiveneno, por 160 ul de NaCl 0,85%

El control antiveneno, contenía 160 uL de antiveneno sin diluir, reemplazándose el volumen de veneno por 160 uL de NaCl 0,85%

La mezcla de reacción correspondiente se incubó a 37°C durante 30 minutos, al cabo de los cuales se adicionó 0,2 mL de emulsión de yema de huevo en buffer tris-HCl 50mM, 10m M CaCl₂ a pH 7,8, llevándose a un volumen final de 1,2 mL con NaCl 0,85%. A continuación se determina la absorbancia a 925 nm, a tiempo cero y luego de 10 minutos de incubación a 41°C. La actividad se expresa en unidades de absorbancia (Grannis y col) por minuto, en forma similar a la descrita para el ensayo de actividad de fosfolipasa A₂. Los resultados son expresados como porcentaje de inhibición utilizando la siguiente fórmula:

$$\% \text{ inhibición} = 100 - \left(\frac{\text{Actividad de la muestra}}{\text{Actividad veneno control}} \times 100 \right)$$

La DE₅₀ del antiveneno fue estimada utilizando el método de transformación en Probits, empleando como parámetros el logaritmo del volumen de antiveneno empleado en microlitros y el porcentaje de inhibición obtenido.

RESULTADOS

4.1 TOXICIDAD AGUDA EN RATOS ALBINOS

El veneno de *L. muta* inyectado por vía intraperitoneal (ip) en ratones produjo intensa hemorragia en la pared anterior del abdomen del ratón, con acumulación de líquido ascítico sero-hemorrágico y muerte. El valor de la DL50 (ip, 48 horas) fue de 14,1 mg/Kg ratón con límites fiduciales (95%) de 15,5 y 12,8 mg/Kg. (figura 1).

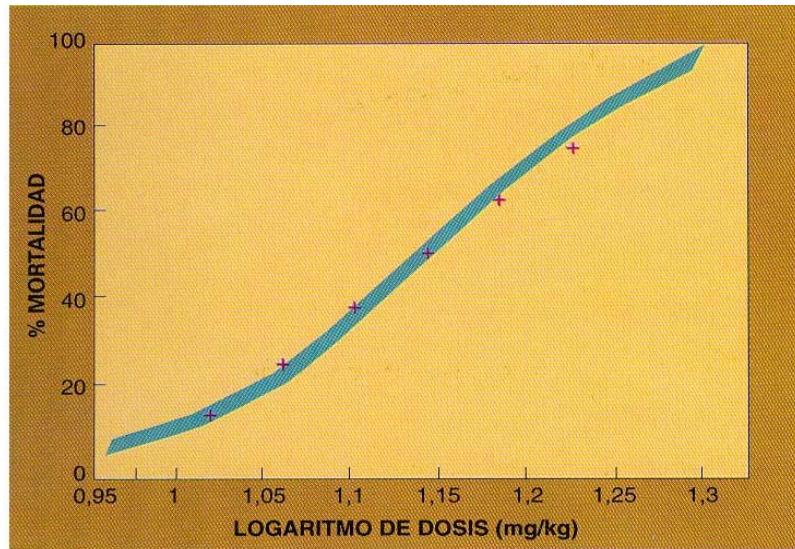


FIGURA 1.- Curva de Log dosis vs. mortalidad para el veneno de *Lachesis muta muta* inyectado por vía intraperitoneal (48 horas).

4.2. ACTIVIDAD HEMORRAGICA

4.2.1.a Hemorragia en piel del Ratón

El veneno a dosis de 0,5 y 5 ug/ratón respectivamente, provocó luego de 24 horas de envenenamiento, intensa hemorragia de aspecto puntiforme localizada en el sitio de inyección y sin progresión hacia la necrosis. Dosis de 150 a 470 ug/ratón produjeron para el mismo período de tiempo marcada hemorragia en el subdermis, de aspecto coalescente, y con progresión a la necrosis local en todos los animales inyectados. La solución de NaCl 0,85% no produjo hemorragia ni necrosis local.

4.2.2.b Hemorragia en pulmón de perro

Alícuotas de solución de veneno crudo (2,5 a 5 mg/mL) aplicadas a la superficie pulmonar canina, produjeron lesiones hemorrágicas a los 5 minutos de retirados los discos de papel de filtro. Las lesiones hemorrágicas producidas por el veneno mostraron aspecto petequiral, con tendencia progresiva a la coalescencia.

4.2.3.c Actividad hemorrágica en piel de cobayo

Los resultados obtenidos son mostrados en la Tabla 2. El veneno de *L. muta muta* (rango 2,4 a 13,0 ug/0,1 mL) provocó hemorragia en la piel del cobayo. El diámetro de la lesión hemorrágica guardó relación lineal con el logaritmo de la dosis, en el rango de 10 a 20 mm de

diámetro de lesión a las 24 horas (figura 2); correspondiendo el valor de DHM y DHR a 2,28 y 12,5 ug de veneno respectivamente.

TABLA 2
ACTIVIDAD HEMORRAGICA* DEL VENENO CRISTALIZADO
DE *L. muta muta* EN *Cavia aperea var porcellio*

VENENO (ng)	LOG C	DIAMETRO HEMORRAGICO PROMEDIO (mm)	DIAMETRO HEMORRAGICO TEORICO (mm)
2420	3,384	10,38	10,35
3080	3,489	11,76	11,76
3920	3,593	13,24	13,17
4980	3,697	14,21	14,58
6330	3,801	16,06	15,98
8040	3,905	17,67	17,38
10220	4,009	18,91	18,79
13000	4,114	19,99	20,20

- * Una DHM = 2281 ng de veneno
- * Una DHR = 12561 ng de veneno

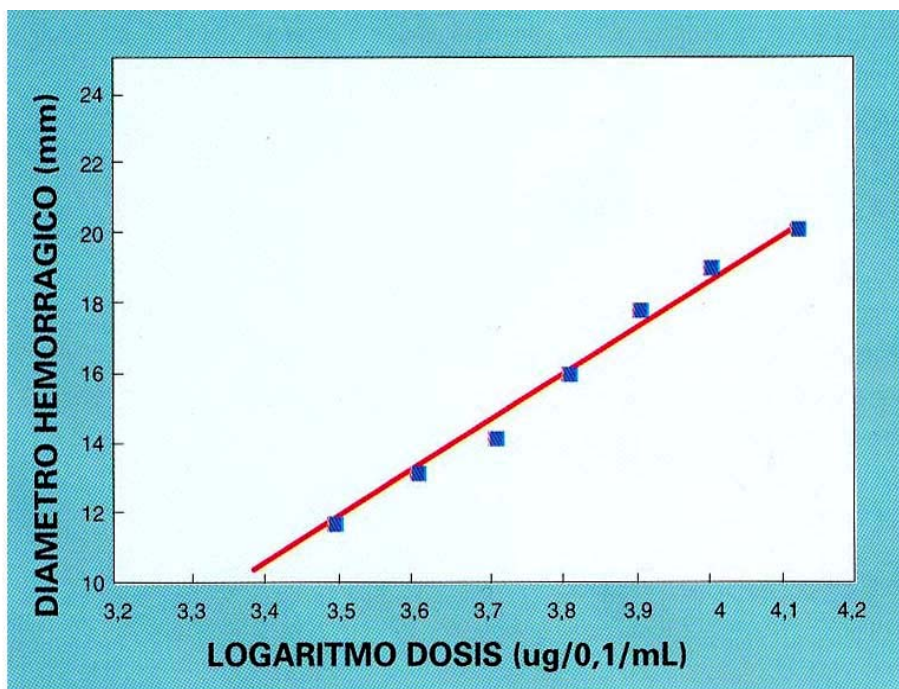


FIGURA 2.- Actividad hemorrágica del veneno de *Lachesis muta muta* en la piel del cobayo.

4.3 ACTIVIDAD MIONECROTICA

El rango normal de la actividad enzimática plasmática de creatina fosfoquinasa (CPK) obtenido en ratones de la Ceba Venezolana fluctuó entre 55 y 120 U/litro (89,52 :t 30,2 U/litro, n=69).

Los niveles de CPK plasmática se incrementaron en los ratones envenenados en forma progresiva y en función del tiempo, alcanzando su valor máximo a las 9 horas, tendiendo los valores a la normalidad a las 24 horas de envenenamiento. No se registró mortalidad temprana (antes de las 3 horas), en los ratones que recibieron dosis de 120 a 560 ug/ratón.

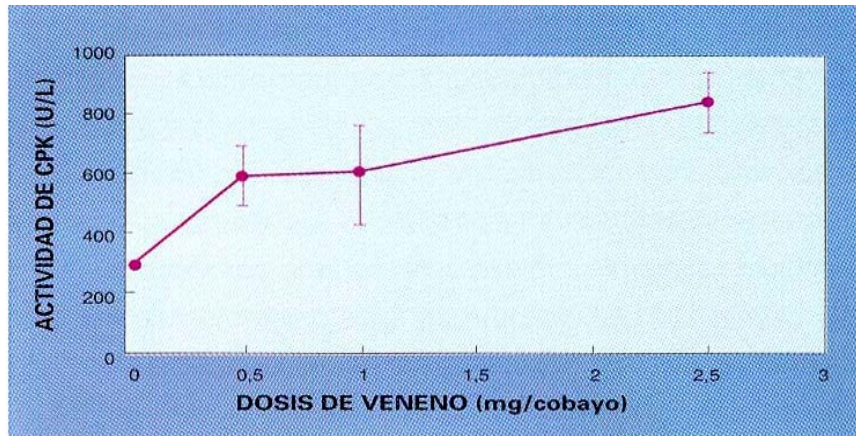


FIGURA 3.- Actividad mionecrótica del veneno de *Lachesis muta muta* en cobayos envenenados por la vía intramuscular.

4.4 EFECTOS DEL VENENO DE *L. muta muta* SOBRE LA PRESION ARTERIAL y LA RESPIRACION DEL PERRO

El veneno inyectado en el perro anestesiado en dosis de 10 a 20 ug/kg. ev produjo un aumento en la frecuencia y amplitud respiratoria del animal experimental, que acompaña a la fase de caída rápida de la presión arterial (n=10).

El veneno de *L. muta* inyectado por vía ev en el perro en dosis de 10 a 200 ug/kg produjo la caída de la presión arterial (n=20). retornando sólo parcialmente a niveles pretratamiento luego de 5 a 25 minutos. La inyección posterior de nuevas dosis del veneno produce taquifilaxia (figura 4).

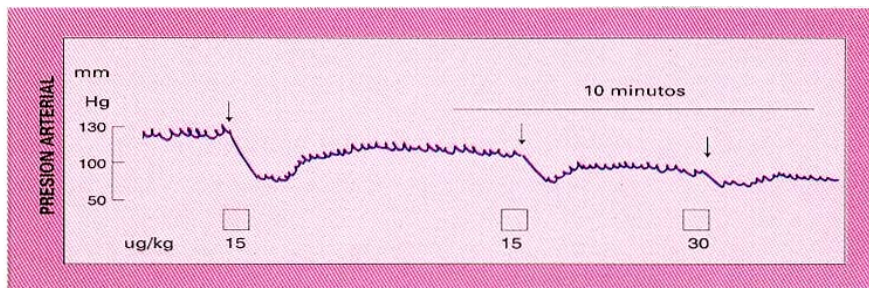


FIGURA 4.- Efectos del veneno de *Lachesis muta muta* sobre la presión arterial y la respiración del perro anestesiado. En (↓) se inyectó el veneno de *L. muta muta* por vía endovenosa en un perro macho de 8 kg anestesiado previamente con pentobarbital sódico (30 mg/kg, ev). Se observa una caída inmediata de la presión arterial, con recuperación incompleta y presencia de taquifilaxia.

Una dosis mayor o igual a 100 ug/kg produjo una dramática caída de la presión arterial (figura 5) acompañada de alteraciones marcadas de la dinámica respiratoria caracterizadas por: apnea de corta duración, seguida de polipnea y disminución gradual de la amplitud respiratoria, hasta llegar al paro respiratorio conducente a la muerte. La aplicación de respiración artificial impidió la muerte a 4 perros inyectados con dosis de 100 a 700 ug/kg evo La magnitud de la respuesta hipotensora producida por el veneno así como la duración del efecto fue proporcional a la dosis de veneno inyectada.

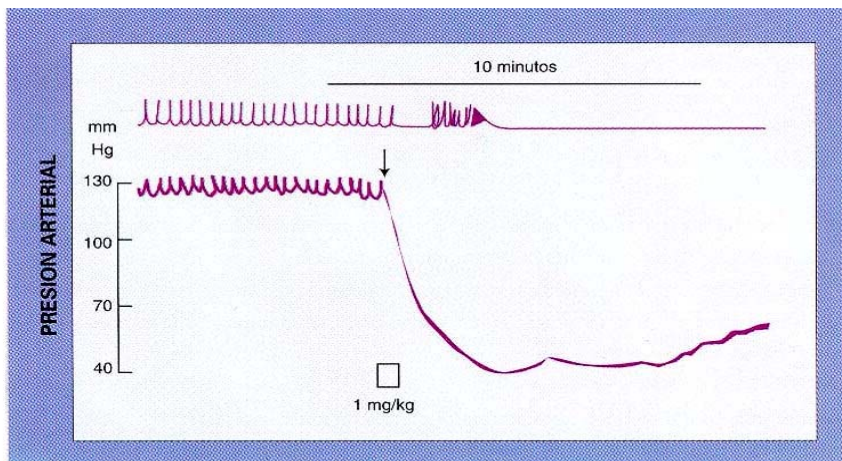


FIGURA 5.- Efectos del veneno de *Lachesis muta muta* (1mg/kg, ev) sobre la presión arterial y la respiración del perro anestesiado. El trazado superior corresponde al registro de los movimientos respiratorios. La inyección del veneno (↓) a esta dosis provocó hipotensión arterial inmediata e irreversible seguida de paro respiratorio y muerte del animal experimental (perro macho, 7 kg)

El efecto hipotensor del veneno (10 ug/kg.ev) no fue bloqueado por atropina (0.17 mg/kg. evo n=4) (figura 6); propranolol (5 mg/kg. evo n=4); clorprofenpiridamina (3-10 mg/kg. evo n=3) (figura 8); ni dibenzilina (2 mg/kg. evo n=4). La droga simpaticomimética, cocaína (5mg/kg,ev) no alteró el efecto presor producido por el veneno de *L. muta* (n=3). El agente bloqueante ganglionar hexamethonio aplicado en dosis intravenosa de 4 mg/kg, la que es capaz de producir el bloqueo completo de los efectos vasculares y respiratorios de la nicotina (30-60 ug/kg, ev, n=3), no impidió la hipotensión provocada por la inyección del veneno. La respuesta presora, fue sin embargo alterada por el hexamethonio, observándose la ausencia de recuperación de la presión arterial en los perros tratados con este agente. (figura 7). El efecto hipotensor del veneno de *L. muta* (10 ug/kg,ev) no fue alterado por la inyección previa de la nicotina (n=3) (figura 7).

La preincubación del veneno de *L. muta* (100-500 ug/ml) en presencia de aprotinina (Trasylol, 100-500 unidades inhibitoras de Kalikreina), impidió totalmente el efecto hipotensor producido por una dosis equivalente a 15 ug/kg evo del veneno en el perro anestesiado (n=3) (figura 9). La aprotinina inyectada por vía endovenosa a dosis menores de 400 UIK, cinco minutos antes de la inyección evo de veneno (15 ug/kg) no impidió la ocurrencia de respuesta hipotensora (figura 10).

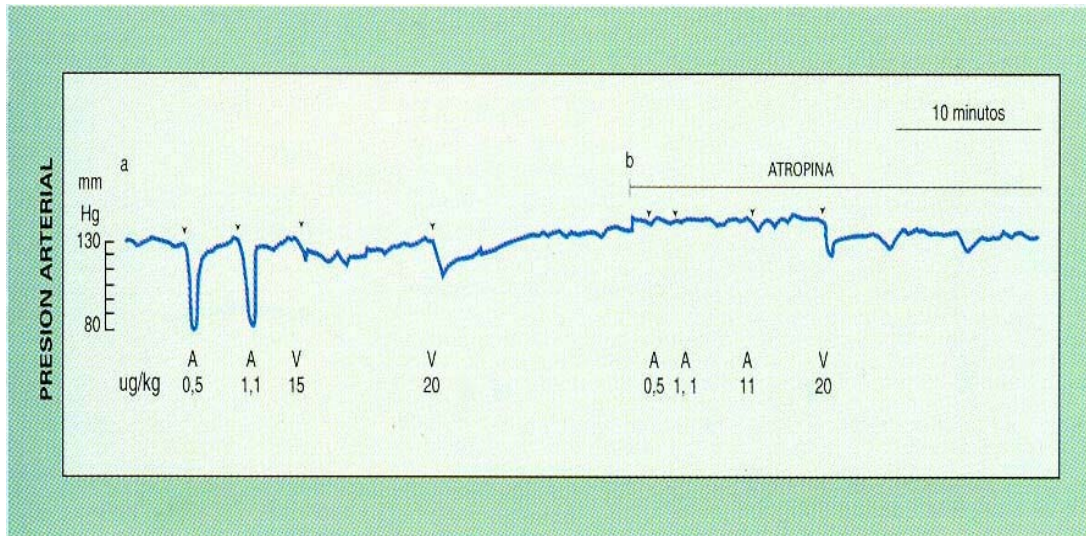


FIGURA 6.- Acción de la atropina sobre el efecto hipotensor del veneno de *L. muta muta* en perro anestesiado: a (pre-tratamiento); b (post-tratamiento). En a se inyectó acetilcolina (A) y veneno (V) por vía endovenosa. Entre a y b el registrador se detuvo durante 10 minutos, y se aplicó atropina (0,17 mg/kg, ev). En la figura se observa que la atropina produjo bloqueo total de la acción hipotensora de la acetilcolina sin afectar el efecto hipotensor provocado por el veneno de serpiente.

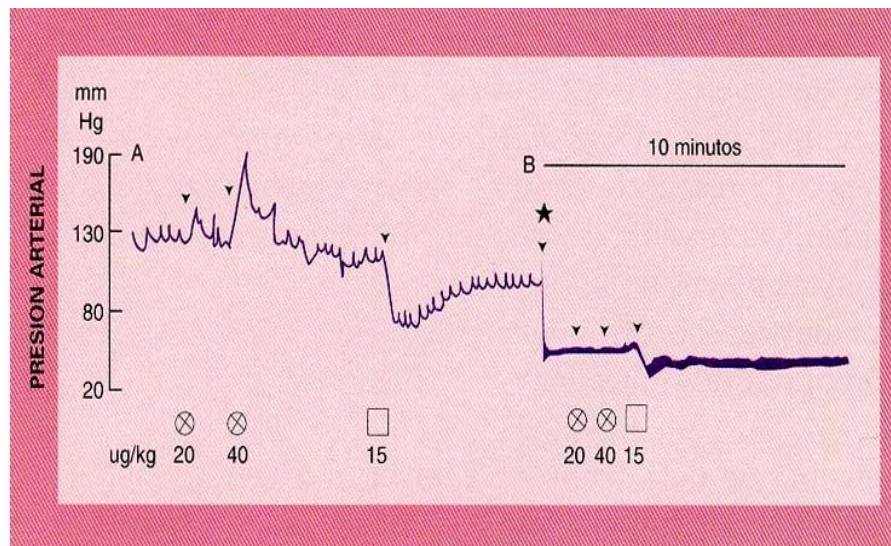


FIGURA 7.- Efectos del bloqueante ganglionar hexamethonio sobre la acción hipotensora del veneno de *L. muta muta*: A (pre-tratamiento); B (post-tratamiento). En A se inyectó nicotina (⊗) y veneno (□) por vía endovenosa. En B el registrador se detuvo durante 10 minutos, y se aplicó hexamethonio (4 mg/kg, ev). En la figura se observa que el hexamethonio bloqueó totalmente la respuesta presora de la nicotina sin impedir la aparición del efecto hipotensor provocado por una dosis de 15 ug/kg de veneno lachésico en un perro macho de 12 kg.

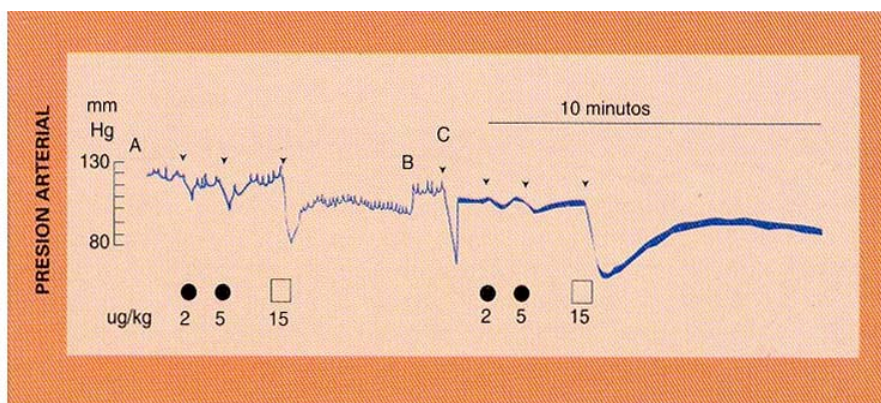


FIGURA 8.- Acción de la clorfeniramina sobre el efecto hipotensor del veneno de *L. muta muta* en perro anestesiado: A (pre-tratamiento); B (post-tratamiento). En A se inyectó histamina (●) y veneno (□) por vía endovenosa. En B y C el registrador se detuvo durante 10 minutos, y en C se aplicó clorfeniramina (10 mg/kg, ev). En la figura se observa que la clorfeniramina produjo bloqueo de la acción hipotensora de la histamina sin modificar el efecto hipotensor provocado por el veneno de serpiente.

4.5 EFECTOS EN ORGANOS AISLADOS

4.5.1 Efectos del veneno sobre preparaciones musculares lisas

El veneno de *L. muta* (1 a 100 ug/mL) produjo contractura de larga duración (hasta 15 minutos) del ileon aislado de rata (n=15), sin incremento de motilidad espontánea. El efecto contracturante intestinal es dosis-dependiente y no taquifiláctico a bajas concentraciones (n=6). Concentraciones elevadas (mayores de 100 ug/mL), provocaron intensa contractura de la preparación, de difícil relajación mediante lavado y seguida de taquifilaxia. A concentraciones finales de 27 a 90 ug/mL no se produjeron efectos significativos en la aorta aislada de conejo (n=2), sin embargo, concentraciones de 0,3 a 20 ug/mL provocaron contractura del útero de rata *in vitro* (n=10) seguido por el aumento del número y amplitud de las contracciones espontáneas de la preparación. El efecto ocitócico del veneno no fue bloqueado por atropina (1,67 ug/mL), a pesar de ser esta una concentración óptima para bloquear la contractura producida por acetilcolina a concentración final de 0,2 ug/mL (n=4).

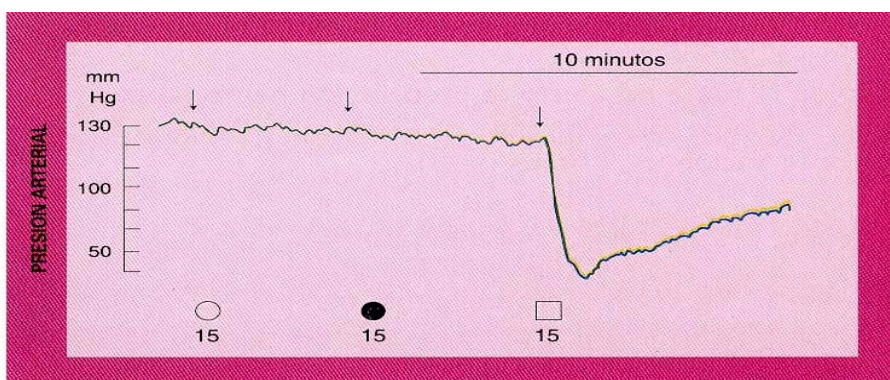


FIGURA 9.- Acción hipotensora arterial del veneno de *L. muta muta*: efectos de la preincubación del veneno en presencia de aprotinina. En el experimento, 200 ug/mL de veneno se preincubaron a 37°C durante 30 minutos en presencia de aprotinina (○ = 1000 y ● = 500 UIC/ml, C.F.) y se inyectaron inmediatamente por vía endovenosa en el perro anestesiado (6 kg), fijando la dosis correspondiente de veneno aplicado en 15 ug/kg. En la figura se observa que el veneno (□) provoca hipotensión arterial, la que es inhibida mediante preincubación en presencia de aprotinina.

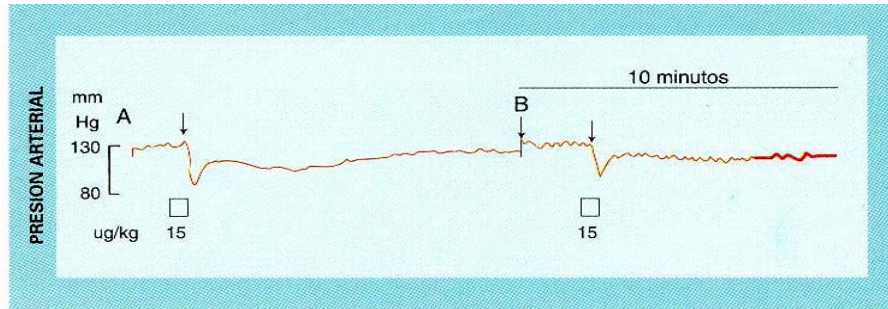


FIGURA 10.- Acción hipotensora arterial del veneno de *L. muta muta*: efectos del tratamiento con aprotinina in vivo. En A, se aplicó veneno (□) por vía ev (15 ug/kg). En B el registrador se detuvo durante 20 minutos, y se inyectó 50,000 UIC de aprotinina por vía endovenosa y 15 minutos después se aplicó una segunda dosis de veneno lachésico (□). La aprotinina no impidió la aparición del efecto hipotensor del veneno lachésico. (Perro macho, 8 kg).

4.5.2 Efectos sobre la preparación nervio frénico-diafragma de rata

El veneno de *L. muta* no afectó la preparación neuromuscular de nervio frénico-diafragma de rata. en rango de 1 ug/mL a 1 mg/MI, para un periodo de observación de 2 horas (n=8).

4.6 AGLUTINACION PLAQUETARIA

La ristocetina (5 ug/mL). la trombina bovina (5-10 Uj/mL). el ADP (10 M) Y el colágeno (3 mg/mL). potentes agentes agregantes plaquetarios fueron incapaces de aglutinar las plaquetas fijadas y resuspendidas en tampón fosfato. Ambos venenos estudiados produjeron aglutinación de las plaquetas lavadas formolizadas (figura 11). Este efecto es probablemente independiente de la acción de los factores procoagulantes presentes en el veneno como la enzima similar a trombina. puesto que ocurren en ausencia de plasma.

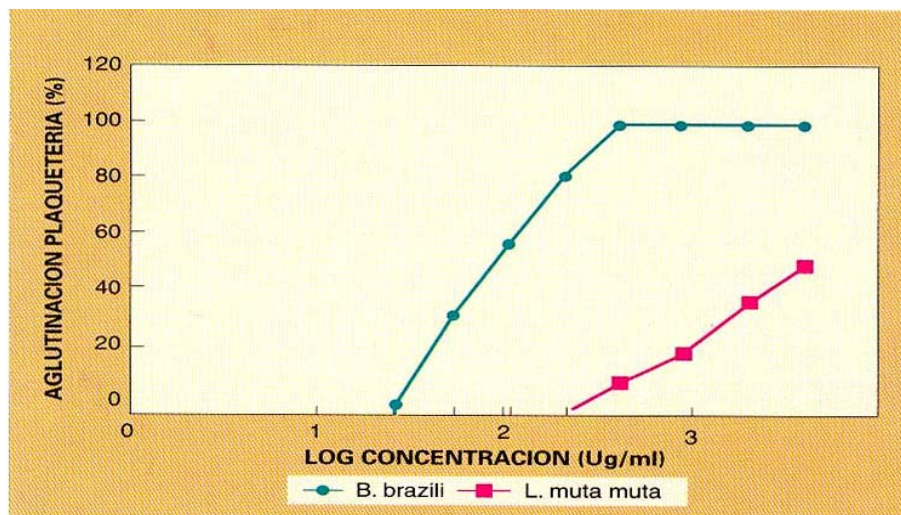


FIGURA 11.- Aglutinación plaquetaria *in vitro* inducida por veneno de *Bothrops brazili* y *Lachesis muta muta*.

El veneno de *B. brazili*, produjo aglutinación de las plaquetas a concentraciones finales de 54,4 a 435 ug/mL. El efecto aglutinante presentó una onda monofásica, y la magnitud del efecto aglutinante para ambos venenos fue dosis dependiente. El veneno de *L. muta muta* requirió de

concentraciones 37,5 veces mayores para inducir aglutinación plaquetaria, con respecto al veneno de *B. brazillii*. Las dosis aglutinantes 50% (DA 50) obtenidas para ambos venenos son mostradas en la Tabla 3.

TABLA 3
AGLUTINACION DE PLAQUETAS HUMANAS INDUCIDA
POR EL VENENO DE *B. brazillii* y *L. muta muta*

ESPECIE	DA50+ (ug/mL)	LIMITES FIDUCIALES 95%	
		INFERIOR	SUPERIOR
<i>L. muta muta</i>	3455,4	2620,8	4555,7
<i>B. brazillii</i>	92,2	83,4	101,9

+ Dosis aglutinante 50%

4.7 ASPECTOS BIOQUIMICOS

4.7.1 Contenido protéico y actividades enzimáticas en el veneno de *L. muta muta*

El contenido protéico del veneno lachésico estimado por el método de Lowry, fue de 61 % (610 ug/mg de veneno desecado).

El veneno de *L. muta muta* posee actividad proteolítica sobre los sustratos TAME y caseína; hidrolizó el sustrato sintético para kininogenasas, Chromozym® PK, y coaguló el fibrinógeno bovino (figura 12). La curva de calibración obtenida con la trombina standard es mostrada en la figura 13. La potencia coagulante del veneno desecado de *L. muta muta* fue estimada en 52,1 Unidades INHjmg de veneno. De la comparación de la actividad del veneno en unidades por mg de peso seco, el veneno resultó tener una potencia similar a la de trombina comercial (Sigma) utilizada como standard. (figura 14)

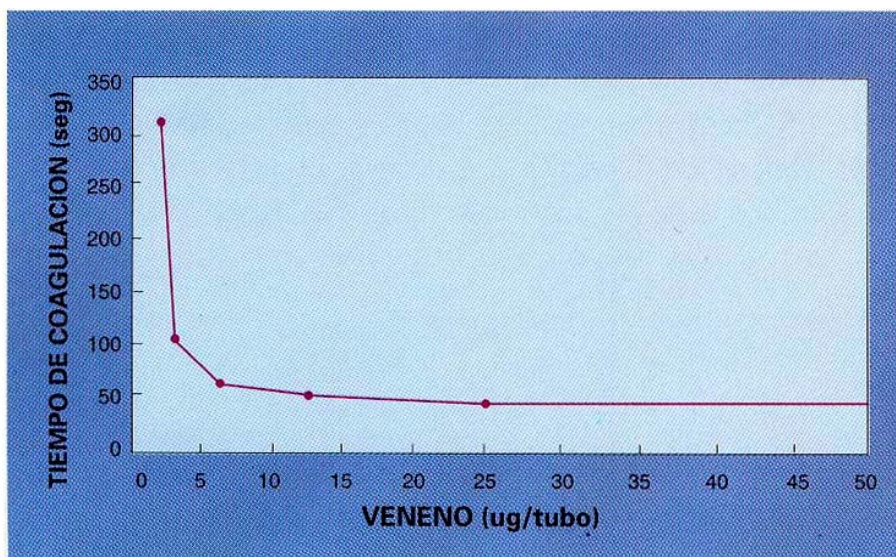


FIGURA 12.- Efecto coagulante del veneno de *Lachesis muta muta* sobre fibrinógeno bovino.

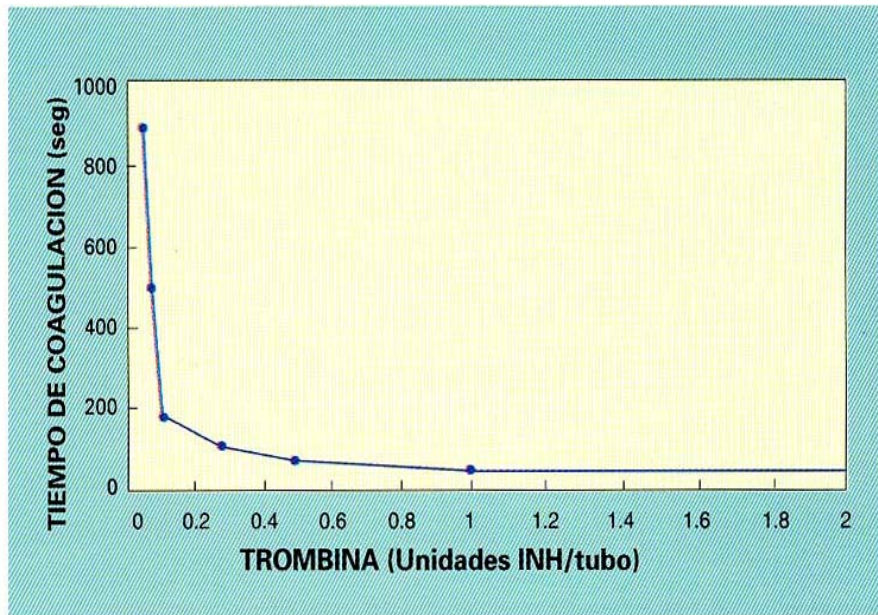


FIGURA 13.- Efecto coagulante de la Trombina Sigma sobre fibrinógeno bovino.

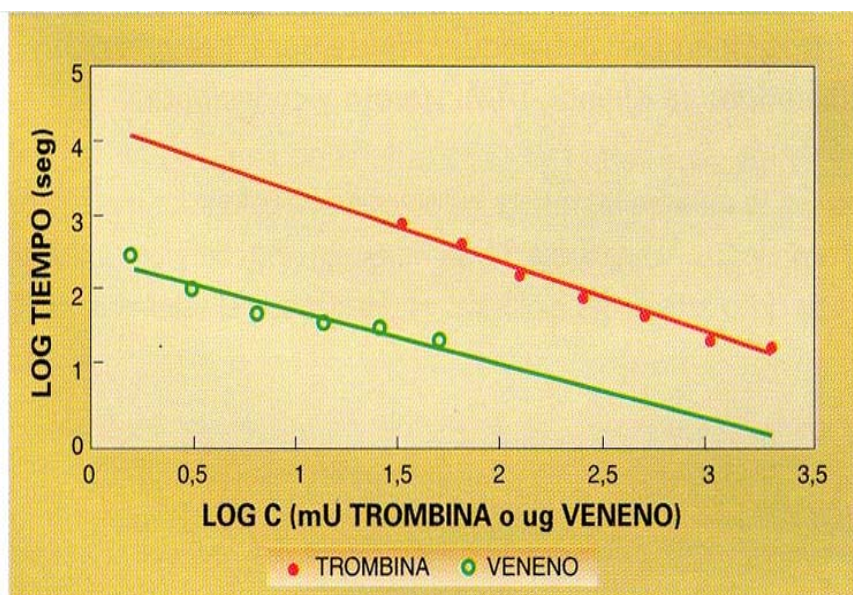


FIGURA 14.- Curva comparativa de la potencia coagulante del veneno de *Lacheis muta muta* versus Trombina standard (Sigma).

En la Tabla 4 se muestran las actividades específicas obtenidas para las actividades enzimáticas estudiadas. El veneno de *L. muta* carece de actividad de acetilcolinesterasa en el rango estudiado de (0,1 a 10 mg/mL). Asimismo, carece de capacidad inhibitoria sobre las colinesterasas plasmáticas en el rango de 0,1 a 20 mg/mL.

TABLA 4
ACTIVIDADES ENZIMATICAS DEL VENENO CRISTALIZADO
DE *L. muta muta*

ENZIMA	ACTIVIDAD ESPECIFICA (*)
FOSFOLIPASA A2	1,18 U/mg
TAMESTERASA	1,47 U/mg
CASEINOLITICA	54,00 mU/mg
KININOGENASA	252,00 U/mg
COAGULANTE	52,10 UINH/mg

(*) Expresado en función del peso seco del veneno cristalizado (61% de contenido protéico).

4.7.2 Filtración en gel: actividades hiPotensora, hemorrágica y liberadora de Kininas, TAMEsterasa y coagulante.

En la tabla 5.a se muestra los resultados obtenidos al utilizar los tres sistemas de filtración propuestos. En la Tabla 5.b se muestran los coeficientes de distribución (Kd) de cinco actividades biológicas estudiadas con el sistema 3.

TABLA 5.a
SEPARACION DE ACTIVIDADES BIOLÓGICAS DEL VENENO DE
Lachesis muta muta MEDIANTE CROMATOGRAFIA EN SEPHADEX G-100

ACTIVIDAD BIOLÓGICA	SISTEMA 1 PICO			SISTEMA 2 PICO						SISTEMA 3 PICO						
	1	2	3	1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6	7
HIPOTENSORA		+					+	+							+	+
HEMORRAGICA																
• RATON	+	+		+	+	+	+									
• PULMON CANINO		+		+	+	+										
• COBAYO											+	+	+	+	+	
CASEINOLITICA											+	+	+	+	+	
TAMESTERASA											+	+				
KININOGENASAS		+														
COAGULANTE											+	+				

TABLA 5.b
COEFICIENTE DE DISTRIBUCION (Kd) DE 5 ACTIVIDADES
BIOLÓGICAS DEL VENENO DE *L. muta muta* EN EL SISTEMA 3
DE FILTRACION EN GEL SEPHADEX G-100 (SF)

ACTIVIDAD BIOLÓGICA	PICO DE ACTIVIDAD #		
	1	2	3
CASEINOLITICA	0,09	0,45	
TAMESTERASICA	0,23	0,35	
HIPOTENSORA	0,41		
COAGULANTE	0,21		
HEMORRAGICA	0,15	0,35	0,67

4.7.2.a Sistema I

La filtración en columna de Sephadex G-100 fino. utilizando como eluyente al tampón Tris 0.05 M - Na Cl 0.15M a pH 8.5, permitió la separación del veneno de *L. muta* en 3 picos de absorbancia a 280 nm. (figura 15).

La actividad hipotensora correspondió al segundo pico eluído. Los componentes responsables de la actividad Kininogenásica (similar a kalikreina) coeluyeron en este sistema de fraccionamiento, conjuntamente con la actividad hemorrágica detectada en pulmón canino y la actividad hipotensora.

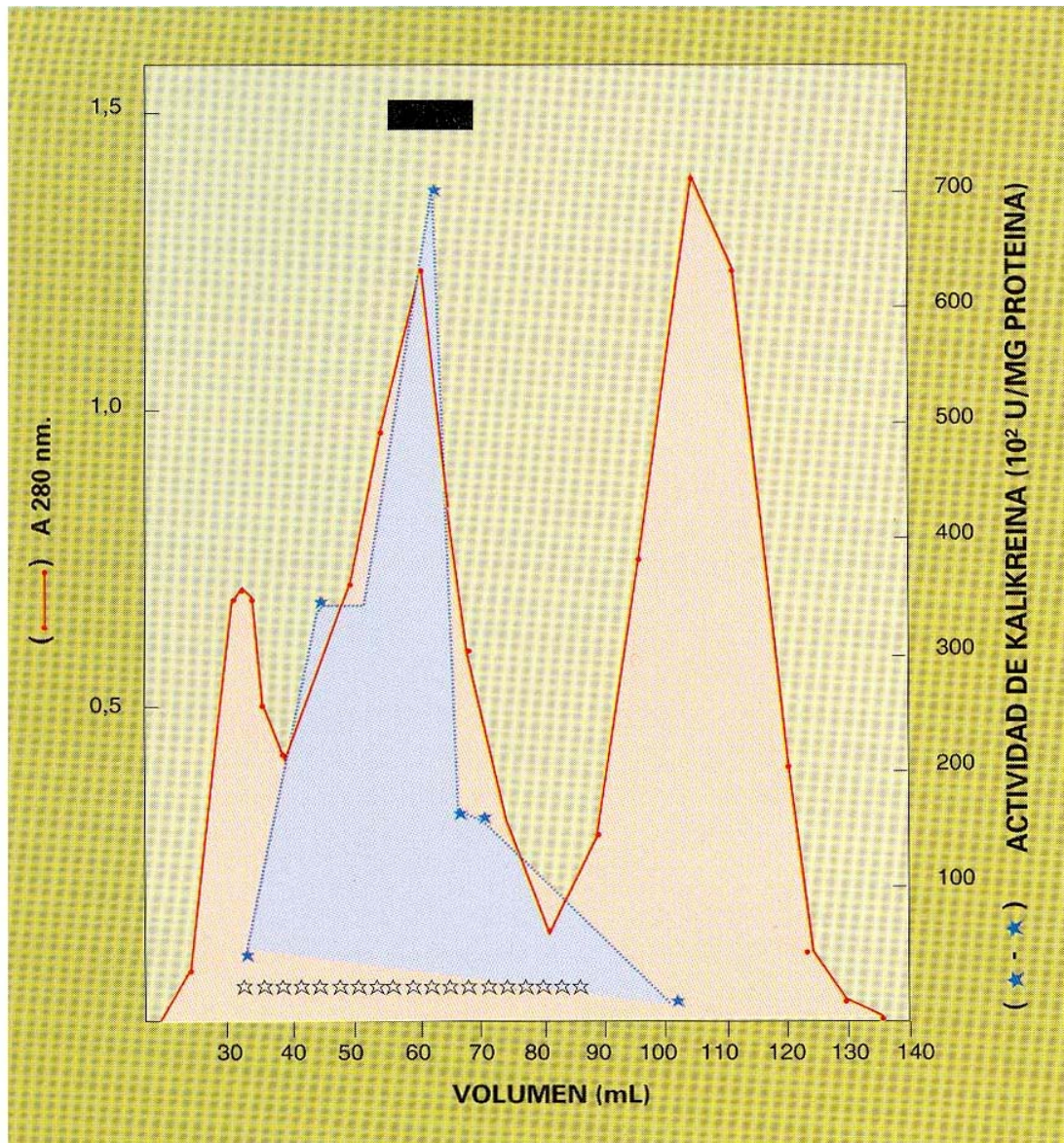


FIGURA 15.- Gel filtración en Sephadex G100 Fino del veno de *L. muta muta*. La columna (1,5 x 6,3 cm) fue equilibrada con buffer tris 0,05 M-NaCl 0,15 M a pH 8,5. El veneno se eluyó con el buffer de equilibrio a un flujo de 6 mL/h a 20°C, y el eluyente se colectó en fracciones de 2,5 mL. La absorbancia a 280 nm se registró espectrofotométricamente (—●—) y las actividades hipotensora (■) y hemorrágica se ensayaron en perro (☆). La actividad de Kalikreína (★) se determinó utilizando N-Bz-Pro-Phe-Arg-pNa como sustrato.

4.7.2.b Sistema 2

La filtración en columna de Sephadex G-100 superfino, utilizando como tampón eluyente Tris 0,05 M- NaCl 0,15 M a pH 8,5, permitió la separación del veneno de *L. muta* en 6 picos de absorbancia a 280 nm. (figura 16).

Se detectó la presencia de actividad hemorrágica luego de la inyección intradérmica en ratones, en 5 de los 6 picos obtenidos (1, 2, 3, 4 Y 6). El pico 5 no mostró actividad hemorrágica en las condiciones experimentales utilizadas en el presente estudio. Mediante la técnica de Bonta se registró actividad hemorrágica luego de la aplicación tópica sólo en los picos 1,2 Y 3. La actividad hipotensora arterial se detectó en los picos 4 Y 5. (Figura 16).

Los resultados presentados en la figura 16, muestran que para la detección de la actividad hemorrágica del veneno lachésico, la técnica de Bonta en pulmón canino, es menos sensible que la técnica de inyección intradérmica en ratón.

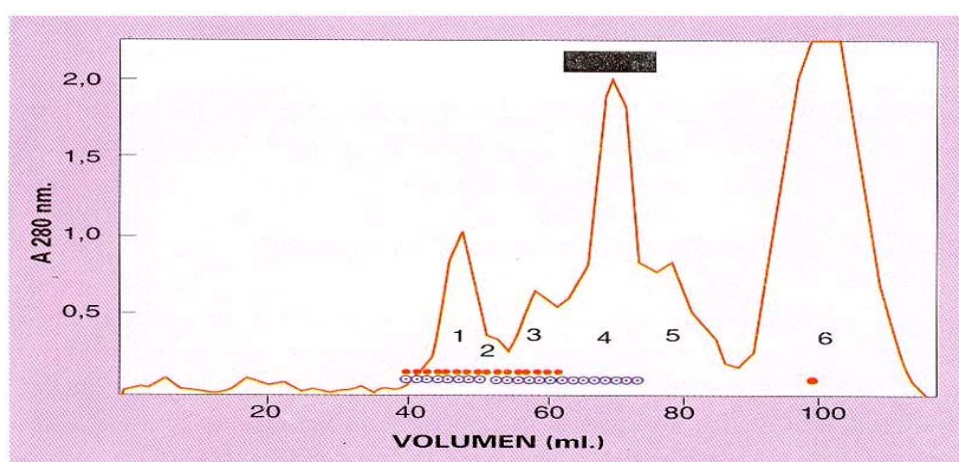


FIGURA 16.- Gel filtración en Sephadex G-100 S.F. del veneno de *L. muta muta*. La columna (1,5 x 63 cm) fue equilibrada con buffer tris 0,05 M -Na Cl 0,15 M pH 8,5. La muestra se eluyó con el buffer de equilibrio a un flujo de 2,5 mL/h a 20 °C. La absorbancia a 280 nm se registró espectrofotométricamente (—) y la actividad hipotensora (■) se ensayó en el perro anestesiado. La actividad hemorrágica fue ensayada por dos métodos: de Bonta en pulmón de perro (●) y Kondo en piel de ratón (⊙).

4.7.2.c Sistema 3

La filtración en columna de Sephadex G-100 superfino, utilizando como eluyente al tampón acetato de amonio 0,2 M a pH 8,4, separó al veneno de *L. muta*, hasta en 7 picos de absorbancia a 280 nm. (figuras 17, 18, 19 Y 20).

Se detectó la presencia de por lo menos 4 fracciones con actividad hemorrágica en cobayos. (figura 17), y dos con actividad proteolítica sobre caseína. (figura 18). Una de ellas correspondiente a proteínas de alto peso molecular que coeluyen en este sistema cromatográfico.

Se detectó un solo pico de actividad coagulante sobre fibrinógeno bovino (figura 19), la que coeluye con la mayor actividad tamersterásica (figura 20). La actividad hipotensora se eluye en forma separada de la fracción coagulante, y coeluyente con una fracción de baja actividad (figura 20) y hemorrágica (figura 17).

Con ambos sistemas 2 y 3, de filtración en Sephadex G-100 Superfino, se obtuvieron perfiles

de elusión similares, observándose de 6 a 7 picos protéicos para el veneno cristalizado de *L. muta muta*.

4.7.3 Recromatografía de la fracción hipotensora

La recromatografía de la fracción hipotensora obtenida en ambos sistemas empleando columnas de Sephadex G-100 (no graficado) resultó en mayor resolución y permitió la separación de una fracción mayor con actividad hipotensora, y dos menores, la primera de las cuales presenta actividad coagulante. La recromatografía de la fracción hipotensora obtenida en ambos sistemas empleando columnas de sephadex G-SO y G-1S0 no brindó mayor resolución. La actividad hipotensora obtenida en ambos sistemas empleando columnas de Sephadex G-SO y G-1S0 no brindó mayor resolución. La actividad hipotensora no es dializable contra agua destilada y mantiene su actividad en congelación hasta por período de 2 años.

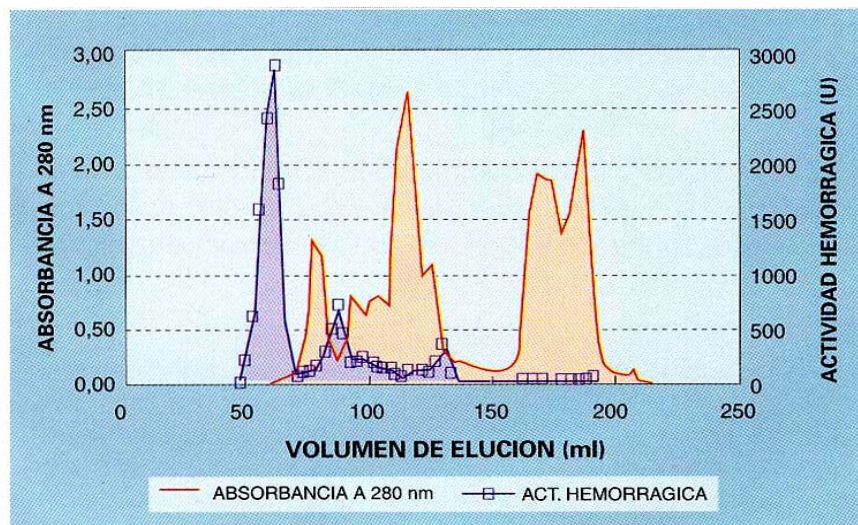


FIGURA 17.- Perfil de elución cromatográfico de la actividad hemorrágica del veneno de *Lachesis muta muta* en Sephadex G-100 Superfino. Condiciones experimentales similares a las de la Figura 15.

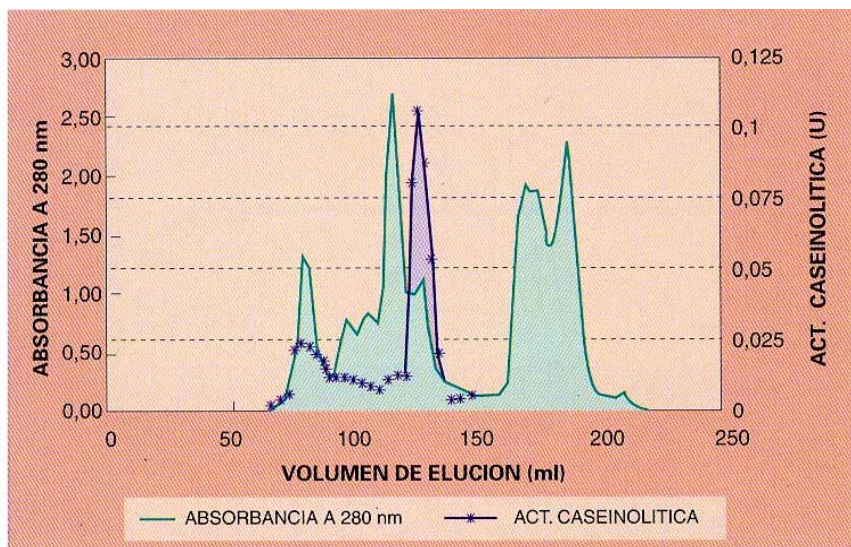


FIGURA 18.- Perfil de elución cromatográfico de la actividad caseinolítica del veneno de *Lachesis muta muta* en Sephadex G-100 Superfino. Condiciones experimentales similares a las de la Figura 15.

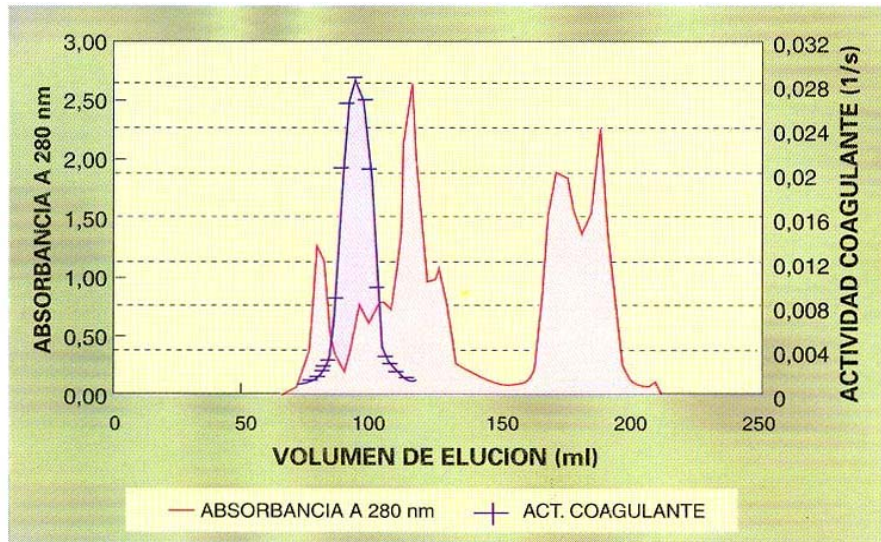


FIGURA 19.- Perfil de elución cromatográfico de la actividad coagulante similar a trombina del veneno de *Lachesis muta muta* en Sephadex G-100 Superfino. Condiciones experimentales similares a las de la Figura 15.

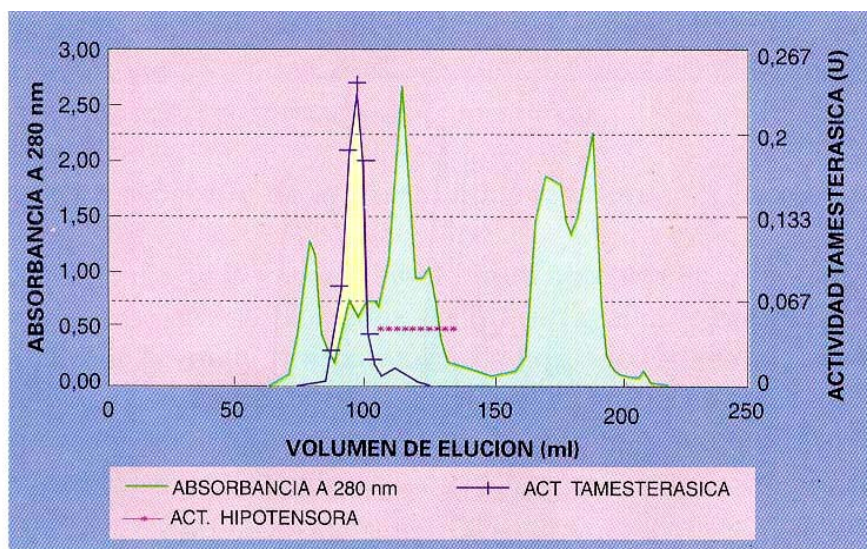


FIGURA 20.- Perfil de elución cromatográfico de la actividad tamesterásica e hipotensora del veneno de *Lachesis muta muta* en Sephadex G-100 Superfino. Condiciones experimentales similares a las de Figura 15.

4.8 ESTUDIO DE NEUTRALIZACION E INHIBICION DE ACTIVIDADES BIOLÓGICAS POR SUERO ANTILACHESICO COMERCIAL

El suero antilachésico fue capaz de inhibir *in vitro* y con diferentes potencias, las actividades hipotensora, fosfolipásica, mionecrótica, hemorrágica, y coagulante respectivamente. Los

resultados obtenidos son resumidos en la Tabla 6.

TABLA 6
ACTIVIDAD INHIBIDORA DEL ANTIVENENO COMERCIAL PARA CUATRO ACTIVIDADES BIOLÓGICAS DEL VENENO DE *L. muta muta*

ACTIVIDAD BIOLÓGICA	DOSIS DE RETO DE VENENO (ug)*	ACTIVIDAD INHIBITORIA			
		NOMBRE DE LA UNIDAD	VOLUMEN DE ANTIVENENO NEUTRALIZANTE (ul)	U/mL	U/ampolla
HEMORRAGIA	13,1 +	UIH	1,29	775,0	7751,9
FOSFOLIPASA A2	80,0 ++	DE50	35,8	27,9	279,3
TOXICA LETAL	185,0 **	DE50	59,0	16,9	169,5
COAGULANTE	20,0 \$	UIAC	21,9	45,7	457,2

(*) Dosis de reto de veneno utilizada
(+) Una DHR
(++) ug/tubo

(**) 2DL50
(\$) ug/tubo

4.8.1 Neutralización de la actividad letal

Los resultados obtenidos son mostrados en la Tabla. 7 y la figura 21. La DE50 antiletal del suero antilachésico (INS, lote 10) fue de 59 uL (límites fiduciales 95% de 39,9 y 87,2 uL respectivamente). La potencia de suero expresada en términos de DE50 antiletal/mL fue de 16,9

TABLA 7
NEUTRALIZACIÓN DE LA ACTIVIDAD LETAL DEL VENENO DE *Lachesis muta muta* POR SUERO ANTILACHESICO (INS, LOTE 10) (+)

Grupo	Veneno <i>L. muta</i> (mg/kg)*	Antiveneno (uL)	NaCl 0,85% (uL)	Mortalidad (48h, %)
1	9,25	400	100	0
2	9,25	200	200	0
3	9,25	100	300	33
4	9,25	50	350	50
5	9,25	30	370	83
6	9,25	12	388	100
control veneno	0,00	0	500	100

(*) Dosis de reto = 2DL50, ip., 48 horas.
(+) Volumen final de inyección = 0,5mL.

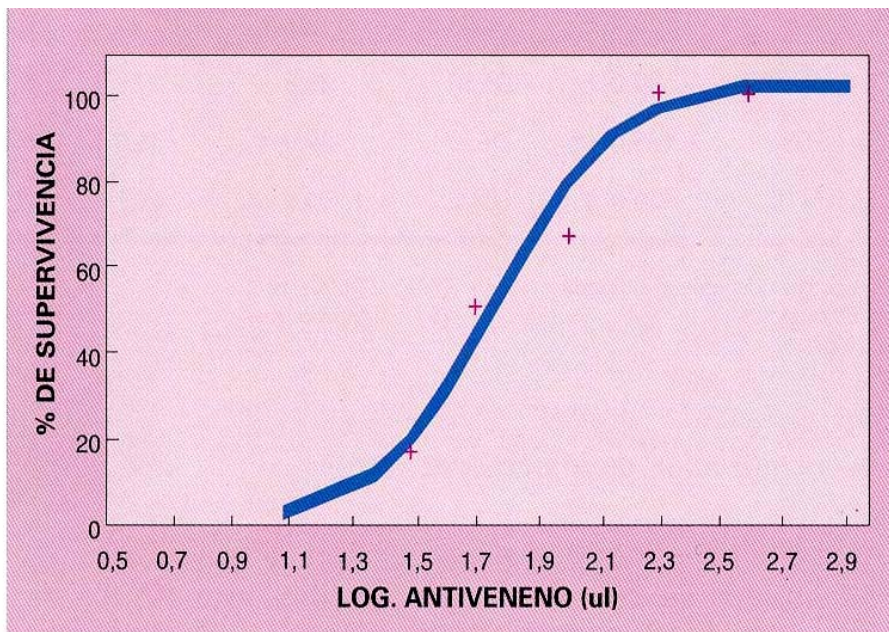


FIGURA 21.- Curva de neutralización de letalidad del veneno de *Lachesis muta muta* por suero antilachésico monovalente (INS, Perú, Lote 10).

4.8.2 Inhibición de la actividad mionecrótica en ratón

El incremento de la actividad de CPK plasmática observado a las 3 horas de la inyección im de 500 ug de veneno ofídico fue inhibido parcialmente por el suero antilachésico comercial concentrado 3,3 veces (figura 22). Se observaron convulsiones en algunos ratones inyectados con la mezcla veneno y suero durante la primera hora del envenenamiento.

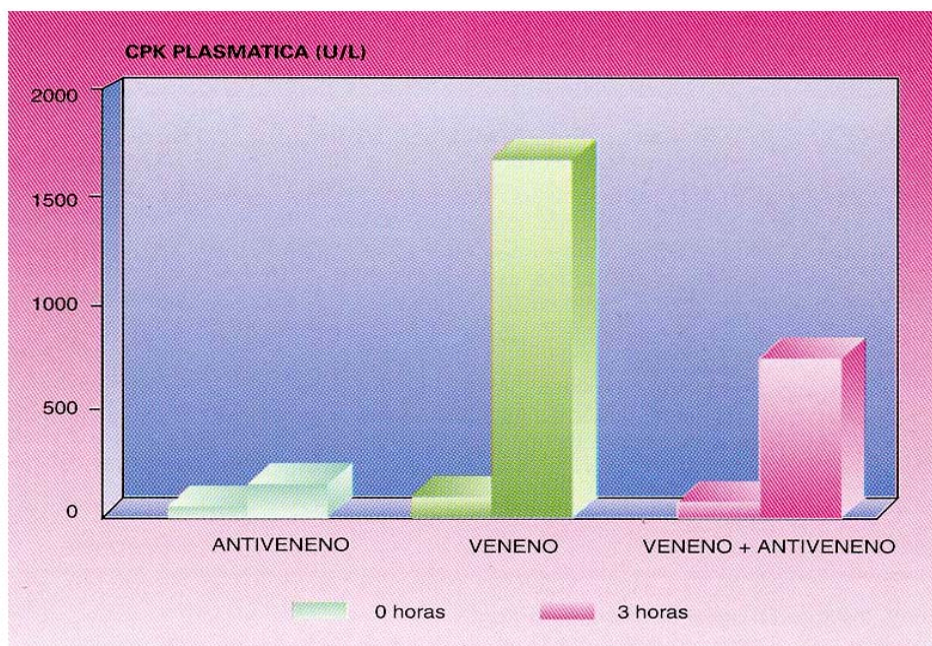


FIGURA 22. Inhibición de la actividad mionecrótica del veneno de *Lachesis muta muta* (500 ug/ratón) por el suero antilachésico monovalente a las 3 horas posteriores a la inyección (INS, lote 12; 25 ul 3,3X)

4.8.3 Inhibición de actividad hipotensora

Una ampolla de 10 mL neutraliza *in vitro* el efecto hipotensor de 24 mg de veneno desecado de *L. muta*. (Tabla 8). Luego de repetidas inyecciones de la mezcla de veneno y antiveneno, es necesaria la inyección de dosis de concentración elevada de veneno lachésico (43 ug/kg, ev) para obtener hipotensión en el perro. La inyección endovenosa de 2 mL de suero antilachésico previa a la inyección del veneno de *L. muta* (15 ug/kg, ev) no impidió el efecto hipotensor del veneno (figura 23)

TABLA 8
ACTIVIDAD ANTIHIPOTENSORA DEL SUERO ANTILACHESICO (*)

Veneno (+) <i>L. muta</i> (ug/0,5 mL)	Suero antilachésico (mL)	NaCl 0,85% (mL)	Volumen final (mL)	Hipotensión Arterial en perros
75	0,5	---	1,0	Ausente
150	0,5	---	1,0	Ausente
300	0,5	---	1,0	Ausente
600	0,5	---	1,0	Ausente
1200	0,5	---	1,0	Ausente
2400	0,5	---	1,0	Presente
75	---	0,5	1,0	Presente
2400	---	0,5	1,0	Presente

(*) Lote 9, Instituto Nacional de Salud, Lima Perú

(+) Dosis inyectada al perro equivalente a 15 ug/kg ev fue ajustado a la dosis requerida.

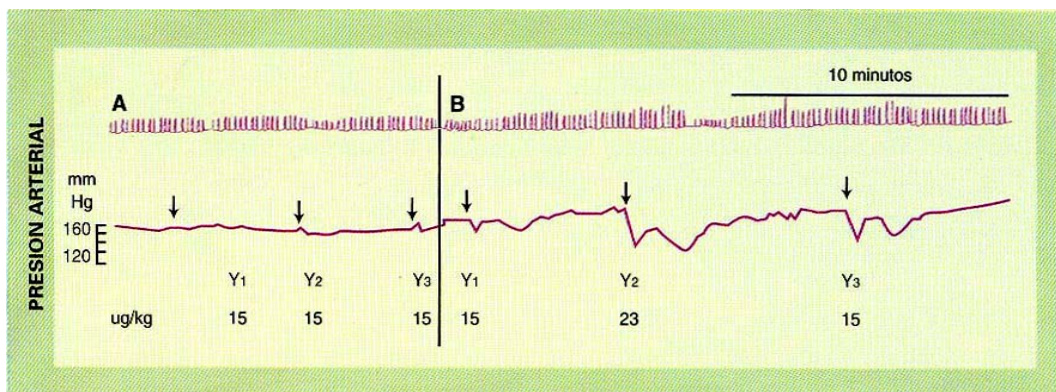


FIGURA 23.- Acción hipotensora del veneno de *L. muta muta*: neutralización *in vitro* por el suero antilachésico peruano: En un experimento típico se incubó una cantidad variable de veneno (Y₁=150 ug; Y₂=300 ug; Y₃= 600 ug de veneno/mL suero, C.F.) en presencia de 0,5 mL de suero antiveneno a 37°C durante 30 minutos. A continuación se procede a la prueba de titulación en perros, fijando una dosis equivalente de veneno de 15 ug/kg ev. En A se inyectó 0,5 mL de suero antilachésico (S) por vía endovenosa, y veneno ofídico incubado con suero antiveneno (Y₁, Y₂, Y₃). En B se inyectó veneno preincubado en presencia de NaCl 0,85% (Y₁, Y₂, Y₃) en similares condiciones experimentales a las empleadas para el suero antiveneno. El suero antiveneno inhibió *in vitro* al veneno, impidiendo su efecto hipotensor.

4.8.4 Inhibición de lo Actividad hemorrágica

En la Tabla 9 y la figura 24 se muestran los resultados obtenidos en los experimentos de inhibición del efecto hemorrágico de veneno lachésico por suero antilachésico (Lote 13). La unidad antihemorrágica (UAH) fue estimada mediante análisis de regresión lineal en 12.88 uL para el antiveneno diluido 1/10. La potencia antihemorrágica estimada del antiveneno correspondió a 98 uL/mg de veneno lachésico (Tabla 6). La potencia neutralizante *in vitro* fue estimada en 775 UAH por mililitro de suero antilachésico del lote analizado, equivalentes a 7 752 UAH por vial.

Volumen de suero (uL) incubado con 1 DHR*	Log Volumen (uL)	Diámetro Promedio Hemorrágico (mm)	Diámetro Promedio Eesperado (mm)
6,20	0,78	20,00	19,52
7,28	0,86	16,89	17,16
8,1	0,90	16,10	15,97
8,80	0,94	14,00	14,80
10,64	1,03	12,54	12,44
12,57	1,10	10,71	10,36

* Una DHR=13.1 ug de veneno

+ Una UAH=1.288 uL de antiveneno sin diluir/13.1 ug de veneno

ø Suero antilachésico diluido 1/10

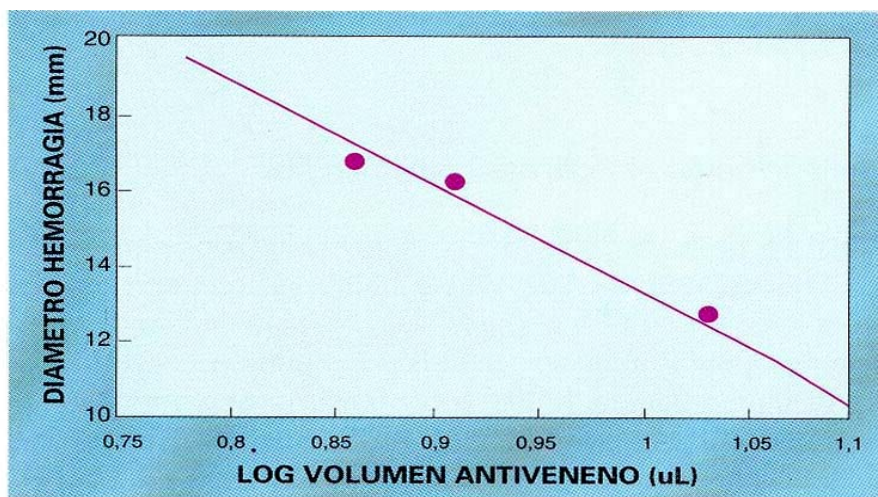


Figura 24.- Curva de inhibición de la actividad hemorrágica del veneno de *Lachesis muta muta* por suero antilachésico monovalente (INS, Perú, Lote 10). La actividad hemorrágica fue ensayada en piel de cobayo.

4.8.5 Inhibición de la actividad de fosfolipasa A2

El suero antilachésico (INS, Lote 13) presentó actividad inhibitoria para la actividad de la enzima fosfolipasa del veneno lachésico. La DE50 antifosfolipásica del suero estudiado,

obtenida mediante el método de transformación en Probits fue de 35,8 uL/80 ug de veneno equivalentes a 0,32 uLjug de veneno. (figura 25).

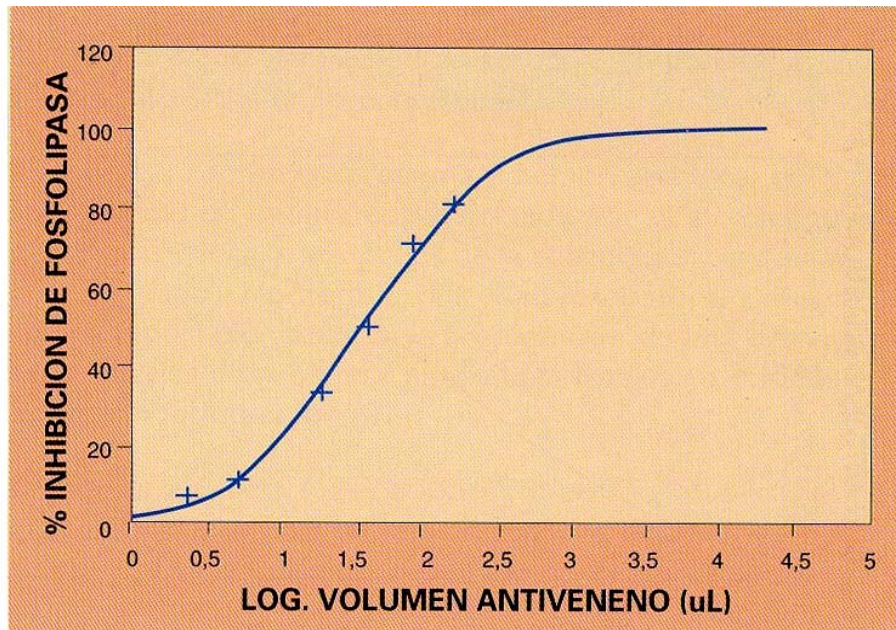


FIGURA 25.- Curva de inhibición de la actividad fosfolipásica A2 del veneno *Lachesis muta muta* por suero antilachésico monovalente (INS, Perú, Lote 10). Para ensayo se empleó la técnica turbidimétrica de Marinetti.

4.8.6 Actividad inhibitoria de la actividad coagulante del veneno de *Lachesis muta muta*

El suero antilachésico a dosis de 1,8 uL/ug de veneno, y en un volumen final de 0,5 mL/tubo, fue capaz de retardar el tiempo de coagulación de 82 a 164 segundos. En la Figura 26 se muestran los resultados de inhibición de la actividad coagulante por suero antilachésico. El valor de una unidad inhibitoria de coagulación (UIAC) correspondió a 21,87 uL.

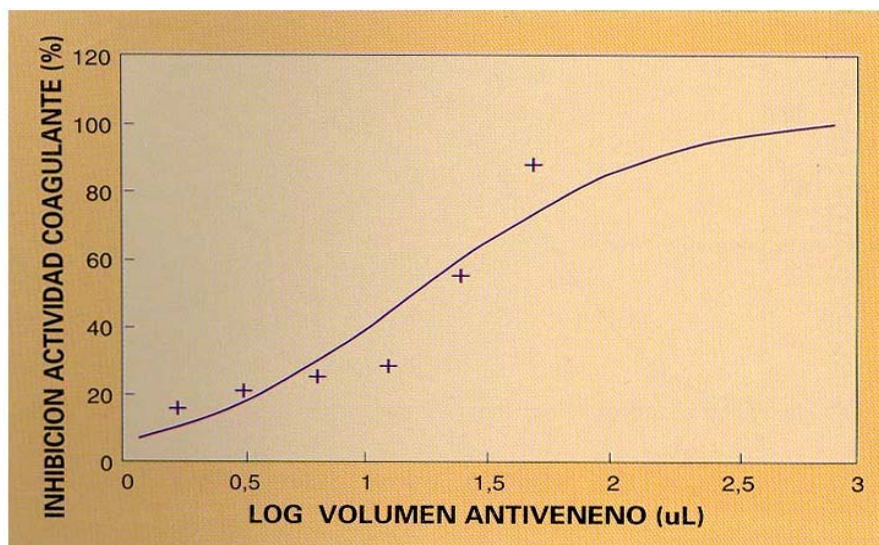


Figura 26.- Curva de inhibición de la actividad coagulante del veneno de *Lachesis muta muta* por suero antilachésico (INS, Perú, Lote 12).

DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en el presente estudio demuestran que el veneno de *Lachesis muta* es hemorrágico, mionecrótico, hipotensor arterial, procoagulante *in vitro* y aglutinante plaquetario, además de letal para ratones y perros. Asimismo, carece de actividad relajante de músculo liso vascular (aorta), es poco activo sobre músculo cardíaco y carece de actividad bloqueante neuromuscular, siendo sin embargo un potente agente estimulante de músculo liso uterino e intestinal.

El veneno de *L. muta* provocó edema y hemorragia local en el sitio de la inyección, además de mionecrosis detectada por el incremento de actividad de CPK plasmática, trastornos de la coagulación sanguínea (anticoagulación y sangrado), hipotermia, dificultad respiratoria y muerte. Previamente se ha reportado, además, la presentación de una disminución marcada de los niveles de proteínas plasmáticas totales en ratones envenenados (49) y hemoaglutinación (37)

Los estudios de Zavaleta (124) e Incio e Incio (53) publicados en 1985 y 1986. respectivamente, así como los resultados obtenidos en este trabajo muestran que el veneno de *L. muta muta* posee baja toxicidad. Estos resultados son similares a los obtenidos en Costa Rica por Bolaños y colaboradores (12). Sin embargo, podría esperarse un incremento en la toxicidad del veneno si consideramos la elevada cantidad de veneno que puede ser obtenida de ejemplares adultos de tamaño promedio, las que fluctúan entre 250 y 350 mg. por serpiente. Esta cantidad representa una producción de veneno 6 a 8 veces mayores que las observadas para otros géneros de serpientes (13, 14).

La hemorragia local es uno de los efectos biológicos más importantes ocasionados por la mordedura de serpientes, y es particularmente importante en el caso de las serpientes vipéridas y crotálicas (16,17, 38, 39,40, 53). En los casos menos severos, la hemorragia se limita al tejido cutáneo y subcutáneo del sitio de inyección, pero en los casos más graves puede afectar la capa muscular pudiendo en algunos casos observarse, además, intenso sangrado en diversos órganos internos, como los pulmones, el corazón, los riñones, los intestinos y el cerebro (59, 96, 108). Sin embargo los mecanismos fisiopatogénicos para este efecto a distancia no han sido esclarecidos aún.

El reporte más temprano sobre estudios del efecto hemorrágico del veneno de *Lachesis muta* fue realizado en el Perú en 1954 por Vellard (112), señalándose que este veneno era fuertemente hemorrágico, pero sin llegar a cuantificarse esta actividad.

Hasta hace poco tiempo se creía que algunos factores de coagulación eran responsables de la hemorragia; y que las proteasas del veneno eran capaces de lesionar los capilares y provocar el sangrado. Ambos conceptos son aparentemente erróneos; la hemorragia es provocada por toxinas específicas que lesionan el endotelio capilar provocando extravasación sanguínea. Estas toxinas son conocidas como factores hemorrágicos o hemorraginas, aceptándose que el estado de anticoagulación coadyuva a la hemorragia, pero por sí solo no es capaz de provocarla; y que las proteasas del veneno eran capaces de lesionar los capilares y provocar el sangrado. Ambos conceptos son aparentemente erróneos; la hemorragia es provocarla (59, 108). Kondo y colaboradores en colaboradores en 1960 diseñaron una prueba sencilla y práctica en conejos, en la que se inyectan diluciones del veneno (o de la hemorragina) por vía subcutánea y después de un tiempo fijo se mide el área hemorrágica en la cara interna de la piel. Una unidad hemorrágica fue definida como la menor cantidad de veneno que produce una lesión hemorrágica de 10 mm de diámetro en 24 horas (58).

Por los estudios histológicos de las lesiones hemorrágicas producidas por venenos de serpientes a nivel cutáneo se conoce que las hemorraginas de estos venenos provocan dos tipos de efectos en los capilares:

- a) La destrucción de porciones del endotelio, formando rupturas por donde escapan los hematíes.
- b) La formación de espacios virtuales entre las células endoteliales, por donde migran los eritrocitos.

La presencia de fracciones hemorrágicas en el veneno de *L. muta muta*. se ha demostrado en los tres modelos ensayados: piel de ratón y cobayo, así como la superficie pleural del perro. En cobayo de DHM obtenida fue de 2.2 ug. la que es mayor que la reportada recientemente por Aguirre y col para veneno de otra serpiente peruana *B. barnetti* (3). La DHM obtenida por Incio e Incio (53) para veneno crudo cristalizado de *L. muta* en ratones fue de 2.5 ug. la que es la ligeramente mayor que la obtenida por nosotros en cobayos.

Las potencias hemorrágicas de una serie de venenos ofídicos en ratón fue reportada por Gutiérrez y Chaves (40). Dichos resultados coinciden con los obtenidos por nosotros, demostrándose que el veneno de *L. muta* es poseedor de una potente actividad hemorrágica en comparación con la mayoría de venenos botrópicos y el veneno de *C. durisus durisus*. El veneno de *B. picadoi* de Costa Rica, resultó el veneno más hemorrágico de aquéllos estudiados de centro y sudamérica.

La comparación realizada empleando el sistema 2 de filtración. entre el efecto hemorrágico producido por la técnica de Kondo en ratón y la técnica de Bonta en pulmón canino. sugieren que el método de Kondo podría ser más sensible que el método de Bonta, por lo que podría utilizarse para estudios de identificación de las fracciones hemorrágicas en las diferentes etapas de purificación de estos factores.

Estudios no publicados realizados por Castillo en nuestro laboratorio. han mostrado que la piel del abdomen del cobayo es más adecuada que la piel del conejo para el estudio cuantitativo de la hemorragia inducida por veneno de *L. muta*. Esta técnica ha sido aplicada en el estudio de las fracciones obtenidas al utilizar el sistema 3 de filtración en Sephadex, demostrándose la existencia de por lo menos 4 fracciones con actividad hemorrágica en el veneno de *L. muta muta*.

Flores y colaboradores aislaron y caracterizaron recientemente una proteína hemorrágica del veneno de *L. muta* colectado en Brasil. Esta hemorragina correspondió a una proteína básica de 100 KD de peso molecular que carece de actividad proteolítica sobre caseína. A pesar de haber empleado una técnica diferente de fraccionamiento a la empleada por nosotros. esta hemorragina parecería corresponder a la primera hemorragina eluida de la columna de Sephadex G-100 en nuestro sistema 3 (resultados no publicados).

Diversos tratamientos han sido ensayados en el intento de reducir este efecto (38. 59. 84. 90. 108) de ellos el más aceptado es el seroterápico utilizando antivenenos mono y polivalentes. semejantes al utilizado en el presente estudio. No obstante. a pesar de lo sugerido por la OMS (119). la potencia antihemorrágica de los diferentes antivenenos no es tomada en cuenta cuando se realizan los ensayos de evaluación de su capacidad antitóxica. Investigadores costaricenses han demostrado que de todos los efectos farmacológicos que provocan los venenos estudiados por ellos. el más fácilmente neutralizado por el suero antiofídico es la hemorragia (16).

Puesto que en el Perú no se han realizado aún estudios sistemáticos de la actividad neutralizante de los antivenenos comerciales disponibles localmente, resultaba imprescindible la realización de un estudio que verificara dicha potencia protectora frente a los diferentes efectos locales y sistemáticos del veneno. En este estudio utilizamos por primera vez al cobayo como modelo experimental para la titulación de la potencia antihemorrágica de sueros comerciales, obteniéndose resultados altamente reproducibles y a bajo costo. De los resultados obtenidos se puede deducir que los factores hemorrágicos, mionecróticos y letales de este veneno son inmunogénicos, lo que es demostrado por la presencia de actividad inhibitoria observada en la fracción gamaglobulínica del suero antilachésico monovalente (Tabla 6).

La potencia del suero antilachésico monovalente fue estimada en 98 uLjmg de veneno, lo que representa una elevada actividad antihemorrágica en comparación con aquellas reportadas en la literatura para otros antivenenos comerciales (16, 41, 71). Esta puede ser atribuida a las elevadas dosis de veneno utilizadas en la inmunización de equinos en nuestro país (alredor de 4 gramos por equino), en comparación con los 50 a 100 mgj equino utilizados en otros países como Brasil, México y Costa Rica (16).

La mionecrosis al igual que la hemorragia local, constituye otro de los efectos locales de mayor importancia médica en el ofidismo, conduciendo en casos extremos a la pérdida total del músculo (108).

La actividad de CPK plasmática se incrementó significativamente en ratones tratados con veneno, observándose el efecto dosis dependiente y máximo entre las 6 y las 9 horas. Bolaños (16) ha demostrado en el envenenamiento experimental por *Bothrops asper* que cuando el CPK alcanza los valores más altos, el cuadro histológico todavía no ha evolucionado totalmente, es decir la determinación de CPK puede predecir la severidad del evento, aun cuando todavía no haya manifestaciones histológicas visibles, por lo que resulta un indicador de utilidad en la práctica médica.

El antiveneno nacional (suero antilachésico monovalente) inhibió parcialmente al efecto mionecrótico del veneno. Sin embargo, se necesitó concentrarlo 3.3 veces para obtener este efecto. Estos resultados son similares a los reportados por Ownby, empleando antiveneno crotálico polivalente en la neutralización de la actividad mionecrótica del veneno de diversas especies norteamericanas del género *Crota/us* (83, 84, 85, 86).

Puesto que el veneno es aplicado accidentalmente durante la mordedura por vía casi siempre intramuscular, el efecto mionecrótico ocurre precozmente. La mayoría de las miotoxinas conocidas, son proteínas con o sin actividad fosfolipásica, de bajo peso molecular y característicamente poco inmunogénicas, de ello la pobre eficacia de los antivenenos actualmente disponibles en forma comercial, para neutralizar este efecto (44).

Pocos son los estudios descritos en la literatura especializada, sobre los efectos tóxicos del veneno de *L. muta muta* por diferentes vías de inyección. Incio e Incio (53) y Siles y col. (101) no obtuvieron resultados satisfactorios al inyectarlo por vía endovenosa en ratones debido a la ocurrencia de muertes inmediatas ocurridas después de la inyección de veneno por esta vía. Este efecto ha sido atribuido a la acción inmediata del factor hipotensor del veneno (124), y pudiera ser responsable de la progresiva dificultad para la obtención de las muestras de sangre de la cola del ratón, observada por nosotros durante el envenenamiento.

El modelo de plaquetas lavadas y formolizadas permite estudiar su rol en la homeostasia. La aglutinación se define como la adherencia de las plaquetas entre sí, y constituye la etapa inicial

dentro de un proceso mucho más complejo: la agregación plaquetaria. En este último proceso intervienen además los procesos de exocitosis plaquetaria de numerosos agentes vasoactivos (serotonina, ADP, etc.) y la fusión de las membranas para constituir el tapón plaquetario. El fenómeno de aglutinación de plaquetas fijadas constituye una resultante de la interacción de diferentes sustancias que actúan selectivamente sobre la membrana de la plaqueta. Tanto la ristocetina, como la trombina, el ADP y el colágeno son potentes factores agregantes plaquetarios y requieren de la integridad de su sistema metabólico para inducir la agregación. Las plaquetas formolizadas carecen de actividad agregante, debido a que no cuentan con la totalidad de sus sistemas metabólicos funcionantes. Nuestros resultados muestran que tanto el veneno de *B. brazilli* como el de *L. muta*, poseen factores capaces de aglutinar plaquetas humanas fijadas, lo que sugiere la existencia de factores capaces de interactuar con las membranas de estas células. Algunos autores consideran que la aglutinación plaquetaria estaría asociada a la acción de enzimas líticas como las fosfolipasas cuya presencia ha sido demostrada en ambos venenos (4). Los resultados obtenidos en este trabajo, corroboran reportes previos, confirmándose la menor capacidad aglutinante plaquetaria del veneno de *L. muta* con respecto a otros venenos ofídicos peruanos (129).

La enzima acetilcolinesterasa que cataliza la hidrólisis del grupo éster del neurotransmisor acetilcolina, ha sido encontrada asociada a la actividad neurotóxica de los venenos de serpientes de las familias Elapidae e Hydrophiidae. La presencia de esta enzima es excepcional en los venenos de serpientes de la Familia Viperidae (59). La ausencia de esta enzima en el veneno de *L. muta muta* confirmaría lo mencionado en la literatura. Por otro lado, este resultado aleja la posibilidad de que el veneno de *L. muta* sea neurotóxico. Los resultados obtenidos por nosotros concuerdan con los obtenidos previamente por Ave 11 o y col. en 1985 (7) Y Olascoaga en 1987 (82) para otros vipéridos peruanos no neurotóxicos. Avello y col. demostraron también que el veneno de *L. muta muta* no posee actividad inhibitoria sobre colinesterasa plasmática humana (7).

El sitio de acción del efecto neurotóxico producido por venenos de serpiente, puede ser identificado a dos niveles fundamentales: central o periférico. Las neurotoxinas más conocidas y caracterizadas de veneno de serpiente, corresponden a polipéptidos activos sobre el sistema nervioso periférico, que actúan impidiendo la transmisión del impulso nervioso en la placa neuromuscular. Asimismo, se han definido tres niveles probables de acción: a nivel del axón, a nivel presináptico y a nivel postsináptico, respectivamente, (59,108). Nuestros estudios en órganos aislados tendientes a verificar el probable efecto neurotóxico sugerido por Vellard (112) en 1948, confirman la hipótesis de que el veneno lachésico no es capaz de bloquear la transmisión neuromuscular periférica, quedando por aclararse su posible efecto a nivel central. El veneno lachésico presenta además marcadas diferencias con otros venenos neurotóxicos de crotálicos, como el de la serpiente de cascabel sudamericana *Crotalus durisus terrificus*, que produce parálisis neuromuscular además de efectos sobre el sistema nervioso central. (59, 108). Las observaciones realizadas por nosotros al inyectar dosis letales del veneno de *L. muta* en ratones, mostraron la ausencia de parálisis motora, lo que es consistente con la ausencia de efectos neurotóxicos periféricos en este veneno.

La pérdida súbita de la conciencia de los perros envenenados por vía endovenosa, así como la presentación de convulsiones en perros no anestesiados reportados por Vellard (108) pudieran corresponder a efectos secundarios a la hipotensión arterial marcada y al shock observado por nosotros en el presente trabajo.

Nosotros no hemos podido observar convulsiones en los perros anestesiados con pentobarbital sódico, inyectados con dosis letales de veneno lachésico.

En el presente estudio hemos detectado la presencia de cinco enzimas en el veneno desecado cristalizado de *L. muta muta* procedente de la zona del Alto Marañón. Departamento de Amazonas (Perú): endopeptidasa caseinolítica. TAMEsterasa. Kininogenasa, coagulante sobre fibrinógeno y fosfolipasa A2. Las tres primeras son enzimas típicas de los venenos crotálicos y vipéridos (27. 59) Y la última (fosfolipasa A2) se ha confirmado que se encuentra en la mayoría de los venenos de serpientes (59.91). La determinación de estas enzimas ratifica que el veneno de *L. muta muta* es proteolítico, lipolítico y además actúa a nivel de este res fosfatados y el fibrinógeno bovino.

El veneno de *L. muta muta* provocó hipotensión arterial en el perro, en forma similar a la reportada previamente por Vellard (108). La duración del efecto hipotensor y su severidad en dosis-dependiente. Con dosis elevadas (mayores a 100 ug/Kg) los animales experimentales presentaron hipotensión severa asociada a marcadas alteraciones de la dinámica respiratoria que conducen a la muerte; por lo que se deduce que el factor responsable del efecto hipotensor estaría relacionado con el efecto tóxico letal en el perro. Las alteraciones respiratorias registradas en los perros inyectados con dosis elevadas de veneno lachésico fueron observadas en todos los casos. luego que el efecto hipotensor se ha iniciado, por lo que consideramos que este es un efecto secundario a los cambios hemodinámicos que ocurren luego de la inyección del veneno. Los resultados obtenidos con el empleo de la respiración artificial en 4 perros que recibieron dosis letales de veneno lachésico (≥ 200 ug/Kg. ev), permiten concluir que la muerte registrada en etapas tempranas del envenamiento lachésico se debe al arresto respiratorio secundario, a hipotensión severa.

El ofidismo por *Lachesis muta* es un accidente frecuente en las poblaciones nativas de la Comunidad Aguaruna y Huambisa (Dpto. Amazonas. Perú), refiriéndose muertes desde minutos a horas después del accidente. (Meneses. 1982. comunicación personal). La mortalidad precoz estaría relacionada a la hipotensión arterial y arresto respiratorio consecutivos al paso de veneno de los tejidos mordidos al torrente circulatorio en forma similar a lo observado en el perro.

La hipotensión no fue bloqueada por vagotomía bilateral ni tratamiento con hexamethonio, cloroprofenpiridamina, atropina ni propranolol; lo que descarta la participación de acetilcolina, histamina y agonistas Beta adrenérgicos en el mecanismo de la acción hipotensora del veneno lachésico. El factor hipotensor tiene naturaleza proteica, es inmunogénico y se eluye en el cuarto y quinto pico proteico obtenido mediante filtración en Sephadex G-100 superfino; tiene un PI ácido (124), no es dializable y posee un peso molecular aparente mayor de 30,000 Daltons.

La aprotinina (Trasylol) es un potente agente inhibidor de un grupo de enzimas que poseen el aminoácido serina en su núcleo activo, (serinoproteasas), entre las que se destacan las enzimas tripsina, quimiotripsina, colinesterasas y enzimas liberadoras de kininas (32, 33). Este es un polipéptido básico de peso molecular aproximado de 6700 Daltons, extraído de tejido pulmonar y parotideo de rumiantes (100). La aprotinina es un poderoso inhibidor de las kalikreínas no glandulares como la kalikreína sanguínea (52). De allí su capacidad para afectar diferentes respuestas biológicas provocadas por la estimulación de sistemas relacionados al de kalikreína - kinina, como son los sistemas de coagulación de la sangre, fibrinolítico y del complemento (99, 118). Este inhibidor no es capaz de afectar a la trombina, ni a las enzimas similares a ésta, obtenidas de venenos de serpiente (73) y ha sido utilizado en este trabajo para el estudio de la acción hipotensora y su diferenciación de la enzima similar a la trombina presente en el veneno crudo de *L. muta*.

Hasta la fecha se han detectado cuatro actividades proteolíticas en el veneno de *L. muta*:

coagulante (enzima similar a trombina), fibrinolítica y dos enzimas caseinolíticas (63, 64, 65, 78, 115, 120). Loayza reportó previamente la presencia de actividad similar a kalikreína en el veneno (60), lo que ha sido confirmado por nuestros resultados. De las 4 enzimas mencionadas, sólo 2, la enzima caseinolítica y la enzima similar a kalikreína serían serinoproteasas, susceptibles de ser inhibidas por la aprotinina.

El mecanismo íntimo de acción del factor hipertensor estaría relacionado con la liberación de Kininas. Esta hipótesis se basa en los siguientes resultados experimentales:

- Farmacológicos: por su sitio de acción intravascular, posibilidad de bloqueo por aprotinina *in vivo* y la imposibilidad de bloquear este efecto con los otros bloqueantes utilizados.
- Bioquímicos: perfil de elusión similar para la actividad hipotensora y la enzima similar a kalikreína, e inhibición por aprotinina *in vitro*.

Aun cuando en venenos se ha descrito la presencia de factores enzimáticos con acción liberadora de kininas (kininogenasas o enzimas similares a Kalikreína) simultáneamente con enzimas kininolíticas, sin lugar a dudas la acción hipotensora producida por la primera es de mayor importancia biológica (8, 27, 34, 59, 60, 63, 69, 110).

En el caso particular del veneno de *L. muta*, la enzima similar a trombina que coagula el fibrinógeno humano *in vitro* e *in vivo*, posee también capacidad de hidrolizar los enlaces ester del substrato sintético TAME (Tosil-arginina-metilester). Esta propiedad ha sido utilizada por Yarlequé (120) para evaluar los diferentes pasos de la purificación de la enzima similar a trombina. La fracción hipotensora y las fracciones que poseen actividad similar a kalikreína carecen de actividad TAMEsterásica importante. Las proteínas

que poseen esta actividad en el veneno de *L. muta* se eluyen separadas de la actividad hipotensora en el sistema de filtración en Sephadex G-100, constituyendo el segundo pico proteico en el sistema 3 de filtración en Sephadex G-100 superfino. Nuestros resultados concuerdan con los reportados previamente por Campos (19) y Yarleque (120), empleando buffer TrisHCl a pH 8, Y siguen un patrón similar al reportado por Viljoen y Col. para el veneno de *Bitis gabonica* (114). La enzima liberadora de kininas del veneno de *B. gabonica* es una glicoproteína con actividad serinoesterásica que sería responsable de la hipotensión producida por la infusión de veneno crudo en perros (2, 22), la enzima sialoglicoproteica crotalasa aislada del veneno de *Crotalus adamanteus*, constituye una excepción debido a que posee simultáneamente, actividad similar a kalikreína y coagulante similar a trombina (69).

En un estudio reciente, Herrera ha estudiado la influencia de la radiación gama sobre diferentes actividades enzimáticas presentes en el veneno crudo de *L. muta* y sobre la actividad letal para el ratón (47, 48), concluyendo que la actividad enzimática que ejerce mayor influencia sobre la actividad tóxica es la actividad de TAMEsterasa. Las otras actividades liberadora de kininas y/o hipotensora, que no se halla asociada a actividad estudiadas fueron: exonucleasa, endonucleasa, S'nucleotidasa, fosfolipasa, enzima coagulante, fibrinolítica y caseinolítica. Queda por demostrar que la actividad liberadora de kininas y/o hipotensora, que no se halla asociada a actividad TAMEsterásica, es también tóxica para el ratón como lo es para el perro. Becerra (10) ha demostrado que las actividades hemorrágica y necrótica pueden ser reducidas mediante irradiación neutrónica del veneno ofídico.

Meier (73) estudió recientemente el rol de los sistemas de coagulación, fibrinolítico y de Kininas en la letalidad del veneno de *B. atrox* sobre ratones y ratas, demostrado que la inyección de batroxobina (enzima similar a trombina del veneno de *B. atrox*) no aumenta por sí

sola, la letalidad del veneno crudo.

La inhibición simultánea de los sistemas de coagulación, fibrinolítico y de kininas producidas por batroxobina y aprotinina redujo, sin embargo, la letalidad del veneno crudo moderada, pero significativamente.

En ratas, Meier demostró que la letalidad obtenida rápidamente durante el envenamiento botrópico, es una consecuencia de severos disturbios cardiocirculatorios (caída inicial de la presión arterial, bradicardia y disnea) (73). Dichos efectos al igual que los observados en perros en el presente trabajo, pudieron ser prevenidos completamente mediante la preincubación del veneno con la aprotinina. Utilizando experimentos *in vivo* Meier observó que el veneno no puede ser directamente inhibido con aprotinina, en forma similar a lo observado en el presente trabajo (Figura 10). Meier dedujo de sus resultados en ratones y ratas, que el veneno de *B. atrox* actuaría activando mayormente las kininogenasas endógenas, lo que finalmente produciría hipotensión. Nuestros resultados son consistentes con la hipótesis de que las kininogenasas del veneno podrían ser inhibidas por aprotinina *in Vitro*, impidiéndose la liberación del nonapéptido bradikinina a partir del kininógeno *in vivo*, al inyectar la mezcla veneno y aprotinina al perro anestesiado. Puesto que la acción de la kininas sobre el músculo liso vascular es breve y la acción hipotensora del veneno es de larga duración (hasta 25 a 30 minutos), no se puede descartar la existencia de otros factores presentes en el veneno, o factores endógenos resultantes de la activación de otros sistemas en el organismo del animal experimental luego de la inyección del veneno, que perpetúen el efecto hipotensor. La existencia en el veneno de algunos crotálicos, de péptidos con acción inhibitoria de las enzimas degradativas del sistema de kininas, como la enzima convertasa, explicaría la larga duración del efecto hipotensor (31, 57).

Una de las características del envenamiento por crotálicos es la presencia de alteraciones en el sistema de coagulación, produciendo el síndrome de coagulación intravascular diseminada (CID) (59,96,108), el que es definido como una entidad clínica de etiología multifactorial caracterizada por hipofibrinogenemia, trombocitopenia y niveles elevados de productos de degradación de la fibrina en la sangre (59). Los factores desencadenantes del CID presentes en el veneno de *L. muta* son la enzima similar a trombina y la enzima fibrinolítica (108). Durante el envenamiento debido a la estimulación del sistema fibrinolítico se elevan los niveles circulantes de la plasmina lo que a su vez provoca la activación paralela de los sistemas del complemento y el sistema de la kininas con un incremento final en el nivel de las kininas y péptidos similares en la circulación (96) constituyendo un factor adicional involucrado en la prolongación del efecto hipotensor y el shock. El suero antilachésico producido en nuestro país por el Instituto Nacional de Salud, posee anticuerpos capaces de inhibir *in vitro* a la fracción hipotensora del veneno de *L. muta*, en una proporción de 2,4 mg/mL de antiveneno. Lamentablemente, los estudios de neutralización *in vivo* no han sido exitosos, por lo que se hace prioritaria en el momento actual, la realización de un estudio posterior, que permita la obtención del factor hipotensor en forma pura, el que pudiera ser utilizado en la elaboración de un suero específico con el que podría enriquecerse el antiveneno comercial actualmente disponible cuya potencia *in vivo* es baja. Es indispensable la estandarización de los venenos (36, 119) y la producción de antivenenos más potentes y específicos, que sean capaces de neutralizar rápidamente los efectos de las fracciones hipotensora, mionecrótica y fosfolipásica del veneno, responsables de la letalidad y de los efectos locales, así como la búsqueda de nuestras alternativas terapéuticas para el tratamiento de los pacientes envenenados con esta ponzoña.

ABSTRACT

The lethally, local hemorrhagic, and other pharmacological actions from *Lachesis muta muta* snake crude dried venom was studied in *vivo* and in *in vitro* experiments. The intraperitoneal DL50 of the crude venom was 10,98 mg/kg in mice. The venom produced contraction of smooth muscle from ileum and uterus; not affected aortic smooth muscle; and is free of neuromuscular blocking effect upon phrenic nerve- diaphragm preparation of rat. The hemorrhagic effect was detected by subcutaneous injection in mouse and guinea pig skin, and by topical application in dog exposed lungs. The initial steps of purification of the hemorrhagic, hypotensive, thrombin-like coagulant enzyme, TAMEsterase, caseinolytic, kinin releasing and phospholipase activities is described.

KEYWORDS: snake venom; *Lachesis muta*; DL50; hemorrhagic; isolated organs.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ABALOS. JORGE. W. (1977). ¿Qué sabe Ud. de Víboras? Losada. Buenos aires. 175p.
2. ADAMS Z.S.. GATTULO D. et. al. (1981). The effect of *Bitis gabónica* (Gaboon viper) snakevenom won blood pressure. stroke volume and coronary circulation inthe dogo TOXICO 19(2): 263-270
3. AGUIRRE SANTA CRUZ. C. EDUARDO; GARCIA SOCOLA. JAIME; SALAS ARRUZ. MARIA; ZA VALETA MARTINEZ- VARGAS. A (197). Método cuantitativo para la determinación de la actividad hemorrágica de veneno de la serpiente peruana *Bothrops barnetti*. IV CONGRESO DE JOVENES CIENTIFICOS. (Lima). Resumen 10.
4. AMUNARRIZ. MANUEL. (1984). Salud y enfermedad. Patologla tropical en la región amazónica Ecuatoriana. Capitulo 10: Patologla agresiva: fieras, serpientes, rayas, carneros. Cicame. Navarra. P: 88-93
5. AREVALO. JULIO. (1965). Ofidismo en Loreto. Tesis Bachiller Medicina. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima. 60 p.
6. AVELLO CANISTO. A; COLARROSSI SALINAS. AC.; FRANCO. J.; ZA VALETA MARTINEZ- VARGAS. A (1985). Determinación de la actividad de colinesterasa y anticolinesterasa en venenos de serpientes y arácnidos. Libro de resúmenes. 111 JORNADAS CIENTIFICAS. UNIVERSIDAD PERUANA CAYETANO HEREDIA Lima p.283.
7. BAYLEY. G. and SHIPOLINI. R. (1976). Purification and Properties of a kininogenin from the venom of *Vipera ammodytes ammodytes*. BIOCHEM J. 153:409-414
8. BECERRA RUSCONI. PAUL PATRICK. (1987). Efecto de la irradiación neutrónica por U-235 sobre la actividad biológica del veneno de la serpiente *Lachesis muta muta* "Shushupe". Tesis. Licenciado en Biología. Universidad Ricardo Palma. lima. 87 p.
9. BENNETT.E. and ROSENZWEIG. G.M. (1981). Behavioral and biochemical methods to study brain responses to environent and experience. En: Methods in Neurobiology (Lahoe. R.. Ed). Vol 2. New York. Plenum Press.: 128-138
10. BERGMAYER. H.U. (1974). Measuremet with casein as substrate (Kunitz). en: Methods of enzymatic analysis. Vol 2. New York. Academic Press: 1018-1020.
11. BOLAÑOS R. (1972). Toxicity of Costa Rican Snake venoms for the white mouse. THE AMER J TROPICAL MEDICINE HYG. 121 (3): 360-363
12. BOLAÑOS R.; MUÑOZ G. Y CERDAS L. (1978).Toxicidad. neutralization e inmunoelectroforesis de los venenos de *Lachesis muta* de Costa Rica y Colombia. TOXICON. 16: 295-300.
13. BOLAÑOS. R. y CERDAS. L. (1980). Producción y control de sueros antiofídicosen Costa Rica. BOL. OF. SANITARIA PANAMERICANA, 88 (3): 189-196.
14. BOLAÑOS, ROGER. (1984). Serpientes, veneno y ofidismo en Centro América. San José. Editorial Universidad de Costa Rica, 136 p.
15. BOLAÑOS, ROGER (1972). Toxicity of Costa Rican snake venoms for the white mouse. THE AMER. J. OF TROPICAL MEDICINE AND HYGIENE, 21(3):360-363.
16. BONTA, I.L.: VARGAFTIG, B.B.; BHARGAVA,N. and DE VOS, e. J. (1970). Method for study of snake venom induced hemorrhages. TOXICON, 8:3-10
17. CAMPOS S. y YARLEQUE A (1974).5' Nucleotidasa en el veneno de la serpiente *Laches;s muta*. BOL. SOe. QUIMICA DEL PERU, 40(3): 202-212.
18. CAMPOS, S.; MERINO, F. Y YERLEQUE A (1979). Fraccionamiento del veneno de *Laches;s muta* y *Bothrops atrox*. VI CONGRESO NACIONAL DE BIOLOGIA, Chiclayo, p:13.
19. CAMPOS, S.; ESCOBAR, E.; LAZO, F.; YARLEQUE, A; MARSH, N.A.; PEYSER, P.M.; WHALER, B.e. and CREIGHTON, N. (1985). Partial separation and characterization of a trombin like enzyme from the venom of the peruvian bushmaster snake *Laches;s muta*. TOXICON, 23 (4):558.

20. CARRILLO DE ESPINOZA, NELLY. (1983). Contribución al conocimiento de las serpientes venenosas del Perú de las Familias Viperidae Elapidae e Hydrophiidae. Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima. PUBLICACIONES MUSEO DE HISTORIA NATURAL J. PRADO, SERIE A, 30:1-55.
21. CEVESE, A and GATULLO, D. (1983). The effect of *B;t;s gabóica* (Gaboon viper) snake venom on external iliac and mesenteric arterial circulation in the dogo TOXICON,21 (1): 67-74.
22. CHANG NEIRA, JAIME Y ZAVALETA MARTINEZ- VARGAS, ALFONSO. (1987). Ofidismo en el Hospital general de La Merced: estudio retrospectivo de 116 casos. DIAGNOSTICO (Lima), 20(4): 115-120.
23. CHANG NEIRA, OSCAR JAIME y ZAVALETA MARTINEZ- VARGAS, ALFONSO. (1988) ¿Que hacer en caso de una mordedura de víbora? Instituto Nacional de Salud (CIS), Folleto Mimeografiado, 9 págs.
24. COCHRAN, W.G. y COX, G.M. (1983). Diseños experimentales. México, Trillas. 80 pags.
25. CRUZ, L. Y YARLEQUE, A (1984). Hemólisis de citrocitos humanos por acción del veneno de *Laches;s muta* y *Bothrops atrox*. BOLETIN DE LA SOCIEDAD QUIMICA DEL PERU, 50(1):41-48.
26. DEUTSCH, H.F. and DINIZ, e.R. (1955). Some proteolytic activities of snake venoms. JOURNAL BIOL. CHEM., 5(1):17-26.
27. DIAZ CASTILLO, JORGE LUIS. (1987). Efecto del ácido glutámico sobre la actividad proteolítica del veneno de la serpiente *Laches;s muta* "Shushupe". Tesis licenciatura en Biología, Universidad Ricardo Palma, Lima. 47 págs.
28. DINIZ e.R.; TORRES IM. (1968). Release of an Acetylcholine Like substance from guinea pig ileum by scorpion venom. TOXICON, 5: 227-281
29. DRAPER,N. R. and SMITH, H. (1986). Applied regression analysis. New York,John Wiley & Sons. 300 págs.
30. FERNANDEZ LANCHO, MANUEL. (1969). La picadura de serpiente como problema en la selva peruana. TRIBUNA MÉDICA, 5:1-2.
31. FERREIRA, S.H. (1965). Bradykinin potentiating factor (BPF) present in the venom of *Bothrops jararaca*. BRIT. J. PHARMACOL., 24: 163-169.
32. FRITZ, H. and WUNDERER, G. (1983). Biochemistry and applications of aprotinin, the kalikrein inhibition from bovine organs. ARZNEIMITTLE FORSCHUNG DRUG RESEARCH, 33 (1):479-492.
33. FUSS, F. (1980). Aprotinin: Mechanism of action and therapeutical uses. BULLCHIM FARM, 119:631-646.
34. GEIGER, R. and KORTMANN, H. (1977). Estereolytic activities of snake venoms and their inhibition by proteinase inhibitors. TOXICON, 15:257-259.'
35. GEIGY S.A. (1950). Probits transformation. En: Documenta Geigy, Tables scientifiques. 5th Ed. Basle, Geigy Department pharmaceutique.
36. GENE, JOSE A. (1985). Cambios en el patrón electroforético del veneno de la serpiente cascabel muda (*Lachesis muta stenophyrs*) almacenado bajo diferentes condiciones. REV. BIOL. TROP., 33(1): 63-65.
37. GOMEZ, M. and ARAGON, F. (1985). Purification and some properties ofthe hemaglutinating protein (mutina) from *Lachesis muta*. Abstracts Firtst American Symposium on Animal, Plant and Microbial Toxins, Stillwater, Oklahoma. TOXICON, 23 (1): 28.
38. GUTIERREZ, J. y BOLAÑOS, R (1980). El problema de los efectos hemorrágico y mionecrótico por mordeduras de serpientes en el Continente Americano. BOL. OFIC. SANITARIA PANAMERICANA, 89 (2):149-156.
39. GUTIERREZ, J. M.; ARROYO, O. y BOLAÑOS, R. (1980). Mionecrosis, hemorragia y edema inducidos por el veneno de *Bothrops asper* en rato n blanco. TOXICON, 18:603-610.
40. GUTIERREZ, JOSE MARIA Y CHAVES, FERNANDO. (1980). Efectos proteolítico, hemorrágicos y mionecrótico de los venenos de serpientes costarricenses de los generos

- Bothrops, Crotalus y Lachesis. TOXICON, 18: 315-321.
41. GUTIERREZ, J. M.; GENE, J.A. ROJAS, G. Y CERDAS, L. (1985). Neutralization of proteolytic and hemorrhagic activities of Costa Rican snake venom by a polyvalent antivenom. TOXICON, 23(6): 887-893.
 42. GUTIERREZ, J. M., ROJAS, G. LO MONTE, B. GENE, J. and CERDAS, L. (1986). Comparative study of the edema-forming activity of Costa Rican snake venoms and its neutralization by a polivalent antivenom. COMP. BIOCHEM. PHYSIOL, 85C (1): 171-176.
 43. GUTIERREZ, J. M., (1986). Myonccrosis induced by Bothrops asper venom: parhogenesis and treatmen. PROC. 2nd AMERICAN SYMPOSIUM ON ANIMAL, PLANT & MICROBIAL TOXINS, Stillwater, Oklahona. (Ownby, C, Ed.) págs 27-39.
 44. GUTIERREZ, JOSE MARIA y CERDAS, LUIS. (1984). Mecanismo de acción de miotoxinas aisladas de veneno de serpiente. REV. BIOL. TROP., 32(2): 213-222.
 45. GUTIERREZ, JOSE MARIA; ROJAS, G. Y CERDAS, L. (1984). Ability of a polivalent antivenom to neutralize the venom of L. m melanocephala, a new Costa Rica subspecies of the bushmaster. TOXICON, 25(7): 713-720.
 46. HEREDIA, V.; CAMPOS, S. y YARLEQUE, A (1982). Actividad de una 5' nucleotidasa en el veneno de la serpiente Bothrops atrox. (L.) "Jergon". ACTA CIENTIFICA VENEZOLANA, 31: 148-153.
 47. HERRERA CABRERA, ERMELINDA (1985). Efectos de la radiación gama sobre la actividad biológica del veneno de las serpientes Lachesis muta y Bothrops atrox. Tesis Licenciado en Biología. Universidad Ricardo Palma, Lima. 66 págs.
 48. HERRERA, E.; YARLEQUE, A; CAMPOS, S. y ZAVALA, A (1986). Efecto de la radiación gama sobre la actividad biológica y propiedades enzimáticas de los venenos de las serpientes Lachesis muta y Bothrops atrox. INFORME NUCLEAR, 3 (1):1-14.
 49. HIDALGO, IA; GUERRA G, R. Y ZAVALA MARTINEZ-VARGAS, A (1985). Farmacología del veneno de Lachesis muta: efectos sobre los niveles de proteínas plasmáticas. REVISTA DE LA ANBIOP, (Lima), 3(2): 47-52.
 50. HOGE, AR. (1965). Preliminary account on neotropical Crotalinae (Serpentes: Viperidae). MEM. INST. BUTANTAN 32:109.
 51. HOGE, AR. and ROMANO, S.A (1971). Neotropical pit Vipers sea snake Coral snake. En: Venomous Animals and their venoms. Vol 11: Venomous Vertebrates, (Bucherl W, and Buckley, Z.; Ed.). New York, Plenum Press, p. 211.
 52. HUMMEL, B.C.W. (1974). Measurement With N-p-toluenesulfonyl-L -argininemetyl ester as substrate (Humell). en: Methods of enzymatic analysis. Vol 2.(Bergmeyer, H.U. Ed). New York, Academic Press, págs.: 1021-1024.
 53. INCIO RUIZ, ROSA ELENA e INCIO RUIZ, LUIS ENRIQUE. (1986). Efectos letal y hemorrágico de los venenos de serpientes peruanas de los géneros Lachesis y Bothrops. Tesis Licenciado (Microbiología- Parasitología). Universidad Nacional "Pedro Ruiz Gallo", Lambayeque. 57 págs.
 54. INSTITUTO BUTANTAN (1986). Normas gerais para o tratamento dos acidentes humanos por animais peconhentos. Sao Paulo, BANESPA 20 págs.
 55. JIMENEZ PORRAS, J.M. (1970). Biochemistry of snake venom. CLINICAL TOXICOL, 3: 389-431.
 56. KAISER, E. and MICHL, H. (1971). Chemistry and pharmacology of the venoms of Bothrops and Lachesis. En: Venomous Animals and their Venoms. Vol 2: Venomousvertebrates. (Bucherl, W. and Buckley, E, Eds). New York, Plenum Press.: 307.
 57. KATO, W. and SUSUKI, T. (1971). Bradykinin potentiating peptides from the venom of Agkistrodon halys blomhoffi: isolation of five bradykinin potentiators and the aminoacidic sequence of two of them: Potentiators B and C. BIOCHEMISTRY 10 (6): 972-980.
 58. KONDO, H.; KONDO, S.; IKEZAWA, H. and MURATA R. (1960) Studies on the quantitative method for determination of hemorrhagic activity of habu snake venom. JAPAN J. MEDICAL SCIENCES & BIOL, 13:43-51.
 59. LEE, C. y (Ed). (1979). Snake venom. New York, Springer Verlag. HANDBROOK OF

- EXPER. PHARMACOLOGY, 49: 1150 p.
60. LOAYZA BENZAQUEN, SIMY LIS (1983). Efecto del veneno de las serpientes *Lachesis muta* y *Bothrops atrox* sobre fibrinógeno bovino y substratos sintéticos. Tesis, Licenciado en Biología, Universidad Ricardo Palma, Lima, 30 págs.
 61. LOMONTE, B, (1985). Edema-forming activity of bushmaster *Lachesis muta stenophrys* and Central American rattlesnake *Crotalus durisus terrificus* venoms and neutralization by a polyvalent antivenom. *TOXICON*, 23 (1):173-176.
 62. LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, NJ.; FARR, AL and RANDALL, R. (1951). Protein measurement with the folin phenol reagent. *JOURNAL BIOL.CHEM.*193:265.
 63. MAGALHAES, A; MARIA, L. and DINIZ, C.R. (1973). Prótases de veneno de serpientes brasileiras. 11.- Separacao de cininogenases do veneno de *Lachesis mutus*. *CIENCIA E CULTURA*, 25 (9): 873.
 64. MAGALHAES, A; OLIVEIRA, G. and DINIZ, C.R. (1981). Purification and partial characterization of a thrombin like enzyme from the venom of the bushmaster snake *Lachesis muta noctivaga*. *TOXICON* 19:279-294.
 65. MAGALHAES, A; SOUSA, AJ. y DINIZ, C.R. (1973). Proteases de serpientes brasileiras. 1.- Separacao de enzima coagulante dotase do veneno de *Lachesis mutus*. *CIENCIA E CULTURA*, 25 (9): 872.
 66. MAGALHAES, ARINOS and DINIZ, C.R. (1979). Purification and partial characterization of the thrombin like enzyme from the venom of *Lachesis muta noctivaga*. *TOXICON* 17 (SUPPL. N.1): 112.
 67. MARGOLIS, I; BRUCE,S. (1965). Release of bradykinin-like substance (BKLS) in sheep by venom of *Crotalus atrox*. *AUST. J.EXP. BIOL.MED. SCI.*, 43: 237-244.
 68. MARINETTI, G.V. (1965). The action of phospholipase A on lipoproteins. *BIOCHIMICA ET BIOPHYSICS ACTA*, 98: 554-565.
 69. MARKALAND E.S.; KETTNER, C and SCHIFFMAN S. (1982). Kallikrein like activity of crotalase, a snake venom enzyme that degrades fibrinogen. *PROC NATLACAD SCI USA*, 79: 1688-1692.
 70. MEBS, D.; EHRENFELS, N. and SAMEJIMA, Y. (1983). Local necrotizing effect of snake venoms on skin and muscle: Relationships to serum creatine kinase. *TOXICON*, 21 (3): 393-404.
 71. MEBS, D.;POHLMANN,S. and VON TENSPOLDE,W. (1988). Snake venom hemorrhagins: neutralization by commercial antivenoms. *TOXICON*. 26 (5): 453-458.
 72. MEIER, J. (1984). Study on the *Bothrops atrox* and its modification after interventions in the coagulation, fibrinolytic and kallikrein like system of prey animals.6TH. EUROPEAN SYMPOSIUM ON ANIMAL PLANT AND MICROBIAL TOXINS, International Society on Toxinology. Basle (Maier J; Stocker, K. and Freyvogel, T. Eds.): 112 p.
 73. MENESES, O.G. (1974). Ofidios y ofidismos en el Perú 11: Aspectos ecológicos de la fauna ofídica ponzoñosa. *REV.INST. ZONOSIS E INVESTIGACION PECUARIA*, 2(3-4): 79-84.
 74. MENESES, OSWALDO. (1974). Los animales venenosos y sus peligros. Publicación 2, Ministerio de Salud. Institutos Nacionales de Salud. 20 págs.
 75. MENESES, OSWALDO. (1974). Ofidios y ofidismos en el Perú 1: Las serpientes venenosas del Perú. *REV.INSTITUTO ZONOSIS E INVESTIGACION PECUARIA*, 2(3-4): 69-77.
 76. MEZA VELEZ, MYRIAM LUZ. (1977). Caracterización bioquímica del veneno de diversas especies de serpientes del género *Bothrops*. Tesis Bachiller Biología,Universidad Nacional Mayor de San Marcos, 40 Págs.
 77. MORANTE, Y. y YARLEQUE A. (1980). Proteasas de veneno de serpientes. Influencia de algunos agentes químicos en la actividad proteolítica del veneno de *Lachesis muta* "Shushupe". *ACTA CIENTIFICA VENEZOLANA*, 31 148-153.
 78. MORI, NOBUHIRO; NIKAI, T.; SUGIHARA, H. and TU, A. (1987). Biochemical characterization of hemorrhagic toxins with fibrinogenase activity isolated from *Crotalus*

- ruber ruber venom. ARCHIVES BIOCHEMISTRY AND BIOPHYSICS, 253(1): 108-121.
79. NAKADA, K.; NAKADA, F.; ITO, E. and INOUE, F. (1984). Quantification of myonecrosis and comparison of necrotic activity of snake venom determination of creatine phosphokinase activity in mice sera. TOXICON, 22 (6): 921-930
 80. NEW, R.R.C.; THEAKSTON, R.D.G.; ZUMBUEHL, O.; IDDON, D. and FRIEND, J. (1985). Liposomal immunisation against snake venoms. TOXICON, 23(2): 215-220.
 81. OLASCOAGA M., MARIA ENRIQUETA. (1987). Estudio del veneno de Bothrops pictus: Bioquímica, toxicidad, neutralización y efectos biológicos. Tesis Licenciado Biología, UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA, "LA MOLINA". Lima, 68 págs.
 82. OWNBY, C.; COLBERG, T.; CLAYPOOL, L. and ODELL, G. (1984). In vivo test ability of antiserum to myotoxin A from prairie rattlesnake Crotalus viridis viridis venom to neutralize local myotoxin A and homologous crude venom. TOXICON, 22 (1) : 99-105.
 83. OWNBY, CH.; COLBERG, T.; and ODELL, G. (1985). Ability of a mixture of anti-myotoxin A serum and polyvalent (Crotalidae) antivenin to neutralize myonecrosis, hemorrhage and lethality induced by prairie rattlesnake Crotalus viridis viridis venom. TOXICON, 23 (2): 317-324.
 84. OWNBY, CH.; COLBERG, T. and ODELL, G. (1986). In vivo ability of anti myotoxin A serum plus polyvalent (Crotalidae) antivenom to neutralize prairie rattlesnake (Crotalus viridis viridis) venom. TOXICON, 24 (2): 197-200
 85. OWNBY, CH. and COLBERG, T. (1986). Ability of polyvalent (Crotalidae) antivenom to neutralize local myonecrosis induced by Crotalus atrox venom. TOXICON, 24 (2): 201-203.
 86. PEARSON, E.S. and HARTLEY, H.O. (1970). Biometrika tables for statisticians. Londres. Cambridge University Press. 690 págs.
 87. PERNAZ LINSUY, GUILLERMO ANTONIO. (1982). Ofidismo: Estudio retrospectivo de 103 casos en el hospital general de la Merced (Chanchamayo Junin). Tesis Bachiller en Medicina, Universidad peruana Cayetano Heredia. Lima 50 págs.
 88. QUEIROZ, L.; SANTO NETO, H.; RODRIGUES SIMIONI, L. and PRADO FRANCESCO, J. (1984). Muscle necrosis and regeeration after envenenation by; Bothrops jararacusu snake venom. TOXICON, 22 (3): 339-346.
 89. RAMMING, K. (1981). Mordeduras y picaduras. En: Sabiston, D.e. Tratado de Patología Quirúrgica (Davis Christopher) México. Interamericana. Vol 1; Cap.17:331-335
 90. ROSEBERG, P. (1976). Pharmacology of Phospholipase A2 from snake venoms. TOXICON, 14: 416-417.
 91. ROSENFELD, G.; DE LANGLADE, EG. and KELEN, E. (1969). Experimental treatment of necrosis produced by proteolytic snake venoms. 11 actions of dexametaxone. REVISTA INSTMED. TROPICAL (SAO PAULO). 11 (6): 387.
 92. RUSSELL, E and PUFFER, H. (1970). Pharmacology of snake venoms. CLINICAL TOXICOLOGY. 3(3): 433-444.
 93. RUSSELL, EE. (1967). Comparative pharmacology of some animal toxins. FEDN. PROE. AM. SOE. EXP. BIOL, 26: 1206.
 94. RUSSELL, FINDLAY. (1961). Special communication: Injuries by venomous animals in the United States. JAMA. 117(13): 903-907.
 95. RUSSELL, FINDLAY. (1980). Snake venom poisoning. New York, Scholium International. págs. 172-176.
 96. SALAS, MARIA; AGUIRRE, EDUARDO y ZAVALA, ALFONSO. (1987). Mio-necrosis producida por veneno de serpiente. BIOTA (Lima), 94: 52-68.
 97. SATO, T.; IWANAGA, S.; MIZUSHIMA, Y. and SUZUKI, T. (1965). Studies on snake venoms XV: separation of arginine ester hydrolase of agkistrodon halys blomhoffi in three enzymatic entities: Bradykinin releasing, clotting and permeability increasing. J. BIOCHEM. 57 (3): 380-391.
 98. SCHACHTER, M. (1966). Kallikreins and kinins. PHYSIOL. REVIEWS. 49 (3):509-542.
 99. SCHULTZE, M. (1970). The proteinase inhibitor trasylol. twenty five years in research and clinic: A status reporto KLINIKARZT. 8: 83-90.

100. SILES, M.; ZELANTE, E; ROLIMN, R. y DE LORENZO. J. (1981). Posibilidad de la determinación de la toxicidad del veneno de *Lachesis muta* y de la titulación del antiveneno específico. en camundongos. MEMORIAS DO INSTITUTO BUTANTAN (SAO PAULO). 44/45: 281-288.
101. SILVA HAAD. J. (1980). Accidentes humanos por las serpientes del género *Bothrops* y *Lachesis*. MEM. INST BUTANTAN (SAO PAULO), 44/48: 403-423.
102. SILVA, L.M.; DINIZ. C.R. and MAGALHAES. A. (1985). Purification and partial characterization of an arginine ester hydrolase from the venom of bushmaster *Lachesis muta noctivaga*. TOXICON. 23 (4): 708-718.
103. STAUFFER, CLYDE E. (1975). A linear standard curve for the Folin Lowry determination of protein. ANALYTICAL BIOCHEMISTRY. 69: 646-648.
104. SUZUKI, T; IWANAGA. J. and SATO. J (1966). International symposium on vasoactive polypeptides" Bradykinin and related Kinins. Riberão Preto, São Paulo, Brasil, 27p.
105. TAY, JORGE; CASTILLO, LUIS Y ROMERO. LUIS. (1981). Tratamiento de las mordeduras por serpientes venenosas. SALUD PUBLICA (México). Época V; 33 (5): 457-472.
106. THEAKSTON. R.D.G.; REID. HA and IDDON. D. (1982). Standardization test for estimating defibrinating. coagulant. hemorrhagic and necrotizing effects of snake venom. TOXICON, 20 (1): 363.
107. TU. T. ANTHONY. (1977). Venoms: Chemistry and Molecular biology. New York, John Wiley & Sons Inc. 545 págs.
108. UNIVERSITY OF EDIMBURGH. STAFF OF THE DEPARTMENT OF PHARMACOLOGY. (1968). Pharmacological Experiment on Intact Preparations. Edinburgh. E & S Livingstone. 132 págs.
109. UNIVERSITY OF EDINBURGH. STAFF OF THE DEPARTMENT OF PHARMACOLOGY. (1968). Pharmacological experiments. on isolated preparations. Edinburgh. E. & S. Livingstone. 132 págs.
110. URIBE URIBE. LJ. (1985). Ofidismo en el Hospital Regional "Cayetano Heredia" de Piura y fauna ofídica en el Dpto. de Piura. ACTA MEDICA PERUANA, 12(1): 39-46.
111. VELLARD. JEAN. (1948). El veneno de *Lachesis muta* (L.) PUBLICACIONES MUSEO DE HISTORIA NATURAL "J. PRADO". Serie A. (1):1 -52.
112. VIAL, J.L. and JIMENEZ PORRAS. J.M. (1967). The ecogeography of the bushmaster *Lachesis muta* in Central América. ANN MID NAT 78; 182. citado por Bolaños y Col. (1978) TOXICON. 16: 295.
113. VIUOEN. c.; MEEHAN. C. and BOTES. D. (1979). Separation of *Bitis gabónica* (Gaboon adder) venom arginine esterases into kinin-releasing. clotting and fibrinolytic factors. TOXICON. 17: 145-154
114. VILLEGAS VILCHEZ. L.; PAREDES VELA. R.; CONCHA MAURA, N. y ZAVALETA MARTINEZ VARGAS. A. (1986). Actividad proteolítica de venenos de serpientes de los géneros *Bothrops*. *Lachesis* y *Crotalus*. Libro de Resúmenes. IV HORNADAS CIENTIFICAS, UNIVERSIDAD PERUANA CAYETANO HEREDIA. Lima. 76.
115. VILLEGAS VILCHEZ, LEON; HERRERA VELIT. PATRICIA y ZAVALETA MARTINEZ-VARGAS. ALFONSO (1987). Estandarización de la actividad proteolítica del veneno de *Bothrops pictus*. IV CONGRESO DE JOVENES CIENTIFICOS (Lima). Resumen 5.116.
116. WATT. CHARLES. (1978). Poisonous snakebite treatment in the United States. JAMA, 240 (7): 654-656.
117. WEBSTER, M. and PRADO, E. (1970). Gladular kallikreins from horse and human urine and from hog pancreas. Methods and Enzymology, XIX, Proteolytic Enzymes. New York, Academic Press: 681-699.
118. WORLD HEALTH ORGANIZATION (1981). Progress in the characterization of venoms and standardization of antivenoms. WHO Offset publication 58; Ginebra; 20 págs.
119. YARLEQUE CHOCAS, ARMANDO (1987). Enzima silimar a trombina del veneno de la serpiente *Lachesis muta*: aislamiento, caracterización, bioquímica y acción biológica. Tesis Doctoral, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Mayor de San Marcos,

- Lima. 98 págs.
120. YARLEQUE, A Y CAMPOS, S. (1973). Actividad de una fosfodiesterasa en el veneno de la serpiente *Lachesis muta* "shushupe". *BOL. SOCO QUIMICA PERU*, 39 (3)" 141-147.
 121. YARLEQUE, A; ESCOBAR, E. Y CAMPOS, S. (1983). Exonucleasa y otras actividades nucleolíticas en los venenos de *Lachesis muta* y *Bothrops atrox*. *ACTA CIENTIFICA VENEZOLANA*, 34: 336-340.
 122. ZAVALETA. A; PLANAS, M. Y Col. (1981). Estudios preliminares sobre los efectos locales del veneno de *Lachesis muta*, (Shushupe) en ratones albinos. Libro de Resúmenes I CONGRESO NACIONAL DE JOVENES CIENTIFICOS, Lima, resumen 20.
 123. ZAVALETA, ALFONSO. (1985). Estudio farmacológico del veneno de la serpiente *Lachesis muta* "Shushupe". Tesis Magister en Ciencias (Farmacología), Universidad Peruana Cayetano Heredia. Lima, 30 págs.
 124. ZAVALETA, ALFONSO; SALAS, MARIA; MENDOZA, MARY; YUEN, ALBERTO Y ARBAIZA FERNANDEZ, JUAN. (1986). Aglutinación plaquetaria inducida por veneno de serpientes de la Familia Crotalidae. *BOL. INST. NAC. SALUD (LIMA)*; 7 (1-4): 28-31

CAPITULO 2
ANTIVENENOS

Dr. Alfonso Zavaleta M-V
MSc. María Salas Arruz

ANTIVENENOS

Sinonimias:

Suero Antiponzoñoso, Suero Antiveneno, Suero hiperinmune, Inmunosuero, Antiveneno

Definición:

Producto biológico de uso humano o veterinario constituido por la fracción gamaglobulina del suero hiperinmune de un animal previamente inmunizado, que se utiliza con fines terapéuticos para neutralizar el o los efectos de un veneno particular.

TIPOS DE ANTIVENENOS:

Los Antivenenos se clasifican según:

• El tipo de veneno que neutralizan

Antiofídico (antibotrópico, antilachésico, anticrotálico) Antiarácnido
(antilooscélico, antilatrodético) Antiescorpión

• Su especificidad:

Monovalente (contra una especie) Polivalente (contra varias especies)

• Su origen

Homólogo: El suero es fabricado en la misma especie animal, en la cual se va a aplicar el antiveneno.

Heterólogo: El suero es fabricado en una especie animal, diferente a la cual se va a aplicar el antiveneno. (Ej: suero equino. que es aplicado al hombre).

• Forma de preparación

Con digestión enzimática (pepsinizado) sin digestión enzimática

• Forma de presentación

Líquida
Liofilizada

• Forma farmacéutica

Inyectable

PRODUCCION DE ANTIVENENOS

Los antivenenos provienen en su mayoría de sueros de equinos. existiendo antivenenos alternativos procedentes de cabras u otras especies.

En el Perú la producción de antivenenos es un proceso que dura aproximadamente 12 semanas y que comprende por lo general las etapas que se indican a continuación:

- Inmunización del animal experimental con el veneno (antígeno).
- Sangría de animal inmunizado
- Decantación del suero
- Concentración de Ig G

- Precipitación con sulfato de sodio al 40%
- Precipitación con sulfato de amonio al 22%
- Homogenización
- Cristalización (48 horas)
- Diálisis (48 horas)
- Isotonización
- Clarificación
- Envasado en forma líquida
- Control de calidad de producto terminado
- Almacenamiento

Instituciones productoras de antivenenos

- Perú: Instituto Nacional de Salud. Ministerio de Salud.
- Brasil: Instituto Butantán y otros 7 Centros especializados.
- Costa Rica: Instituto Clodomiro Picado
- USA: Wyatt
- México: Instituto Nacional de Higiene.
- Europa y Africa: Instituto Pasteur y otras 40 instituciones en todo el mundo

CONTROL DE CALIDAD DE ANTIVENENOS

Aún cuando no existen normas técnicas oficiales en el Perú para el control de calidad de los antivenenos, se realiza la inspección de rotulado, pruebas fisicoquímicas, microbiológicas y de potencia biológica de acuerdo a lo recomendado por la Organización Mundial de la Salud:

- Rotulado
- Características físicas: turbidez, color, partículas extrañas.
- Control de volumen.
- Identidad inmunológica
- Potencia neutralizante antiletal (otras pruebas de potencia son opcionales)
- Prueba de pirógenos en conejos
- Esterilidad
- Contenido proteico
- Contenido de fenol
- Prueba de estabilidad del producto

Título ó potencia del suero antiveneno:

El Título es la medida de la capacidad neutralizante del antiveneno frente a los efectos del veneno de la serpiente.

Dado que los venenos tienen varias actividades biológicas (neurotoxinas, hemorraginas, mionecrotoxinas, etc.), la capacidad neutralizante del antiveneno o título, varía para cada actividad biológica.

Por lo general los laboratorios productores titulan solo sobre la base de la actividad tóxica letal, y es expresado en miligramos de veneno que son neutralizados por un mililitro de suero antiveneno.

El título de cada lote de suero antiveneno puede variar. A mayor título mayor capacidad neutralizante, por lo que existe un título mínimo establecido por cada laboratorio productor.

RECOMENDACIONES ESPECIALES PARA EL MANEJO DE PACIENTES SENSIBLES AL SUERO HETEROLOGO

La existencia de varios biológicos en el mercado, preparados en equinos. que se utilizan para el tratamiento de entidades relativamente frecuentes en países tropicales y subtropicales como el tétanos (suero antitetánico), la rabia (suero antirrábico) y el loxoscelismo (suero antiloxoscélico) hace que cada vez sea mas frecuente que un paciente mordido por una serpiente, tenga historia de exposición a proteínas del suero de caballo en la década previa. y por tanto el paciente tenga mayor riesgo de presentar reacciones alérgicas al administrarle el suero antiofidico ó antiarácido. Algunas de estas reacciones, como el shock anafiláctico constituyen emergencias médicas y pueden desencadenar la muerte del paciente. Por ello es necesario brindar recomendaciones generales para la ejecución de dos procedimientos que todo personal de salud que administra sueros antiveneno a los pacientes debiera conocer:

- a) Prueba de sensibilidad al suero equino
- b) Desensibilización del paciente sensible al suero equino.

Prueba de sensibilidad al suero equino

Es recomendable realizar la prueba de sensibilidad al suero cada vez que se tenga que administrar suero antiveneno a un paciente. Sin embargo. en situaciones de gran emergencia como en los accidentes neurotóxicos donde la rápida intervención del médico y la administración precoz del suero aún sin esperar los 20 a 30 minutos de la prueba de sensibilidad, tenderá a impedir o disminuir la intensidad de los efectos del veneno mejorando la expectativa de vida del paciente, hace que la decisión de realizar la prueba de sensibilidad al suero antiveneno deba de ser tomada por el médico tratante, previa evaluación de la gravedad del paciente.

Existen dos tipos de prueba según la vía de administración del suero diluido: oftálmica e intradérmica.

- **Prueba oftálmica.** Es más sencilla, y excepto en niños pequeños, es la más recomendable. Para la prueba se aplica una gota de solución de cloruro de sodio estéril al 0,9% en uno de los ojos (control). En el otro ojo se aplica una gota de suero antiveneno diluido 1:10 (v:v) en cloruro de sodio estéril al 0,9%. Una reacción positiva se presenta con lagrimeo y enrojecimiento conjuntival en un lapso de 10 a 30 minutos posteriores a su aplicación en el ojo.
- **Prueba intradérmica:** Se realiza diluyendo el suero antiofidico 1:100 (v:v) en cloruro de sodio estéril al 0,9%. Para ello se debe realizar dos diluciones sucesivas en la jeringa: para ello se toma con 0,1 mL de suero antiveneno puro, en una jeringa de tuberculina, y se completa con cloruro de sodio estéril al 0,9% hasta 1 mL, rotando la jeringa para lograr una mezcla adecuada. Luego se debe eliminar 0,9 mL del contenido de la jeringa, dejando 0,1 mL en ella y completar nuevamente a 1 mL con cloruro de sodio estéril al 0,9%. Rote nuevamente la jeringa para mezclar adecuadamente. Elimine 0,9 mL de la solución 1:100 y deje 0,1 mL de la mezcla en la jeringa, para su aplicación inmediata y cuidadosa por vía intradérmica en el antebrazo del paciente. Luego de 5 a 30 minutos se lee la reacción. La reacción es negativa si el aspecto de la piel inyectada es similar al de las zonas colaterales no inyectadas y no se observa enrojecimiento local, ronchas ni congestión local. La reacción es positiva si aparece eritema (enrojecimiento) y congestión en la zona inyectada. En reacciones positivas severas se forma una roncha de bordes irregulares. La extensión e intensidad de la reacción son un indicativo del grado de sensibilidad del paciente al suero

antiveneno.

Una reacción negativa a la prueba no excluye la posibilidad de que puedan presentarse reacciones alérgicas al momento de la administración de la dosis de suero. Por ello algunas escuelas médicas recomiendan la aplicación endovenosa lenta de un antihistamínico H₁ (ej: clorfeniramina) cinco minutos antes de la aplicación de la dosis terapéutica del antiveneno.

En caso de obtener una reacción positiva en el paciente, se le debe considerar sensibilizado a las proteínas del suero equino. y requiere de desensibilización previa antes de la aplicación de la dosis terapéutica del antiveneno.

No se cuenta con un método único para la administración del suero a personas sensibles ya que cada uno se presenta como un problema individual.

Desensibilización de pacientes sensibles al suero equino

Antes de la desensibilización debe aplicarse un antihistamínico H₁ (ej: clorfeniramina) por vía endovenosa. La desensibilización debe realizarse inyectando diluciones seriadas de suero antiveneno a intervalos de tiempo de aproximadamente 20 minutos entre dosis y dosis, siempre que no ocurra ninguna reacción en el paciente. Para la dilución "del suero se emplea cloruro de sodio estéril al 0.9%.

- 0.05 mL de suero diluído 1:20 en, Subcutáneo
- mL de suero diluído 1:10, subcutáneo
- mL de suero diluído 1:10, subcutáneo
- mL de suero sin diluir, subcutáneo
- mL de suero sin diluir, subcutáneo
- 0.5 mL de suero sin diluir, subcutáneo
- Inyectar la dosis restante del suero (0.9 mL) por vía intramuscular

Si ocurre reacción alérgica con algunas de las dosis de desensibilización. las inyecciones deben detenerse por espacio de una hora. Luego debe reiniciarse el esquema de aplicación cada 20 minutos, iniciando con la repetición de la última dosis que provocó la reacción.

Durante la administración del suero y en especial cuando el paciente ha presentado alguna reacción, el paciente deberá someterse a observación directa del personal de salud por dos horas. y supervisión cercana hasta las 24 horas.

SUERO ANTIBOTRÓPICO POLIVALENTE Heterólogo (Equino)

Descripción:

Se expende en forma líquida (solución incolora o amarillo claro) que contiene la fracción gamaglobulina purificada a partir del suero de equinos hiperinmunizados con veneno de serpientes del género *Bothrops* (*B. atrox*, *B. brazili*, *B. pictus*, *B. barnetti* y *B. hyoprurus*).

Composición:

Cada frasco ampolla por 10 mL de solución contiene inmunoglobulinas de origen equino que

Neutralizan.....40 mg* de veneno de *B. atrox*.
Fenol0,025 g

Condición de venta

Venta bajo receta médica

Tiempo de vida útil

Dos años a partir de la fecha de elaboración.

Indicaciones

Para el tratamiento de envenenamientos causados por serpientes *Bothrops atrox* vg. "Jergón de la Selva", *B. brazili* vg. "Jergón Shushupe", *B. pictus* vg. "Jergón de Costa", *B. barnetti* vg. "Macanche" y *B. hyoprurus* vg. "Jergón".

Caracterización de los accidentes botrópicos:

90 a 95% de los accidentes ofídicos que ocurren en el Perú, son causados por serpientes del género *Bothrops*, y se caracterizan por dolor local discreto, edema local inmediato y progresivo, eritema e hipotensión arterial. Posteriormente se observa a nivel local: equimosis, linfangitis, bulas, necrosis y abscesos en la zona mordida. A nivel sistémico se observan hipotensión y shock, trastornos de la coagulación caracterizados por disminución del fibrinógeno circulante, trombocitopenia. La severidad de los casos varía dependiendo del tipo de serpiente agresora, cantidad y tipo de veneno inyectado, la zona mordida, el área corporal del sujeto y el estado de salud previo al accidente.

Envenenamiento leve

Cuando existe poco dolor en la zona mordida y edema local discreto. Ausencia de signos y síntomas de afección sistémica. El tiempo de coagulación es normal ó ligeramente alterado.

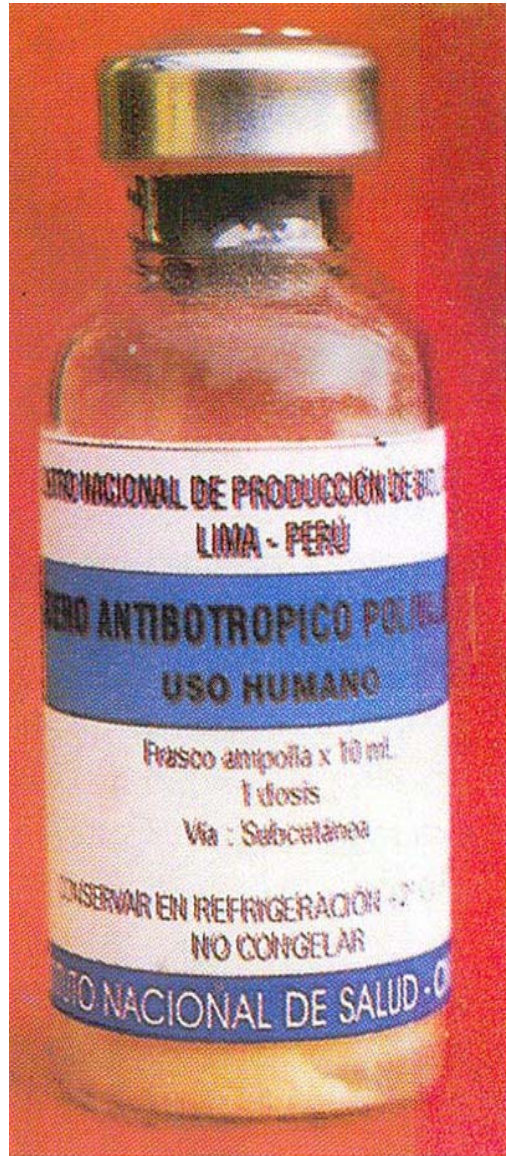
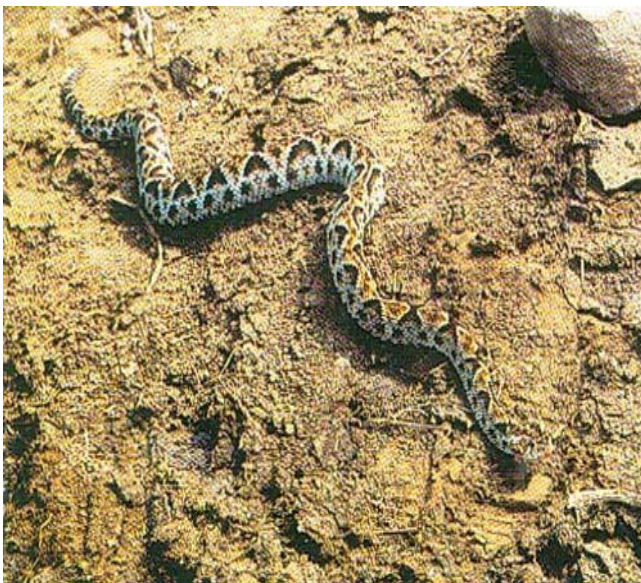
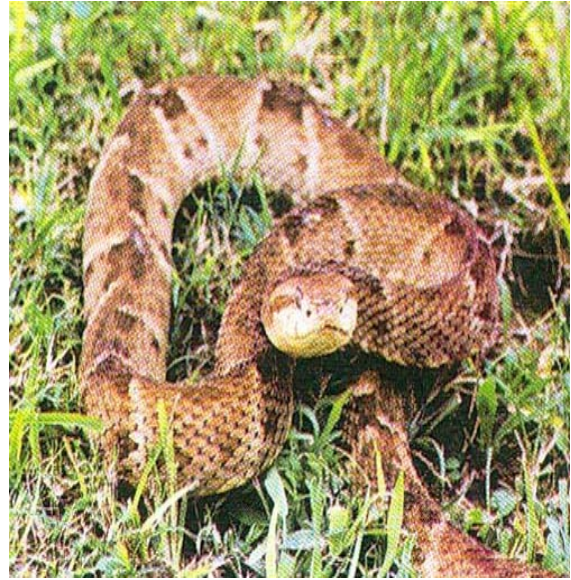
Envenenamiento Moderado

Cuando el paciente tiene dolor acentuado en la zona mordida, edema local evidente, presencia de signos y síntomas sistémicos, tiempo de coagulación alterados ó sangre incoagulable.

Envenenamiento grave o severo

Cuando además de los signos y síntomas locales se presentan hemorragias severas (boca, nariz, riñón -hematuria-), descenso de la presión arterial y síntomas de colapso.

* este valor puede variar en cada lote producido



Reacciones adversas

La administración del suero provoca en algunos pacientes reacciones adversas, las que generalmente ocurren en pacientes tratados previamente con sueros equinos.

Estas reacciones son de diverso grado e incluyen:

- a) Reacción Anafiláctica, que puede ser fatal y se inicia con un brusco malestar, sensación de calor y caída de la presión arterial que puede ocasionar la muerte. En caso de presentación de shock anafiláctico se debe administrar adrenalina por vía endovenosa.
- b) Reacción térmica o febril: generalmente se presenta después de 20 a 30 minutos de la inyección del antiveneno. Se presenta con sensación de frío corporal, ligera disnea y una rápida alza de temperatura.
- c) Enfermedad del Suero, es una reacción tardía que se puede presentar dentro de los 14 días posteriores a la administración del suero antiveneno. Los síntomas incluyen fiebre, erupción dérmica, edema de la piel, dolores articulares y musculares que ceden con la administración de aspirina o acetaminofen. También puede presentarse urticaria. En casos severos de enfermedad del suero se utiliza tratamiento con corticoides.

Contraindicaciones

- Hipersensibilidad al suero equino.
- Mordedura por serpientes no venenosas.

Precauciones

Es muy importante conocer la historia previa del paciente, saber si el paciente ha recibido previamente sueros heterólogos (antirrábico, antiofídico, antitetánico), ó si tiene antecedentes de alergia a medicamentos, alimentos ó si ha sido desensibilizado previamente. En estos casos el médico debe tener especial cuidado, dado que las posibilidades de que el paciente presente reacciones adversas es mayor.

Nunca se debe inyectar suero o hacer la prueba de sensibilidad al suero equino sin tener disponible una ampolla de adrenalina (1 :1000 ó 1 mg/mL).

Antes de aplicar la dosis recomendada del suero antiofídico equino, realice la prueba de sensibilidad al suero equino.

Advertencias

- El suero antiofídico es un producto biológico heterólogo para el ser humano, y puede desencadenar reacciones alérgicas severas en algunos sujetos sensibles.
- Antes de aplicar el suero antiveneno lea las recomendaciones del fabricante.
- En aquellos casos en que la prueba de sensibilidad arroje resultados positivos, proceda a desensibilizar al paciente antes de aplicar la dosis recomendada del suero antiofídico.

Dosis y Vías de Administración

La dosis recomendada depende de la severidad del envenenamiento

Grado de severidad	Número de viales*
Leve	1 a 2
Moderado	3 a 4
Grave o severo	5 a 12

* Para sueros con título de neutralización de 25 mg/mL o más

El suero se aplica por vía endovenosa lenta. También puede aplicarse por vía intramuscular. En aquellos casos en que se requiera aplicar tres o más viales por vía endovenosa, estos pueden ser colocados en un frasco de 500 mL de Cloruro de Sodio al 0,9%, al que se le ha retirado previamente el volumen de suero a inyectar. El suero diluído en Cloruro de Sodio puede ser aplicado en infusión en el lapso de 1 a 2 horas.

Interacciones

No se conocen interacciones con otros medicamentos ó biológicos.

Conservación y Almacenamiento

El suero líquido debe conservarse en refrigeración a temperatura entre 2 y 8° C

Presentación

Caja x 1 Frasco ampolla por 10 mL

SUERO ANTICROTÁLICO MONOVALENTE Heterólogo (Equino)

Descripción:

Se expende en forma líquida (solución incolora o amarillo claro) que contiene la fracción gamaglobulina purificada a partir del suero de equinos hiperinmunizados con el veneno de la serpiente de cascabel sudamericana *Crota/us dur;ssus terr;ficus*

Composición

Cada frasco ampolla por 10 mL de solución contiene inmunoglobulinas de origen equino que

Neutralizan25 mg* de veneno de *C. dur;ssus terr;ficus*
Fenol.....0,025 g

Condición de venta

Venta bajo receta médica

Tiempo de vida útil

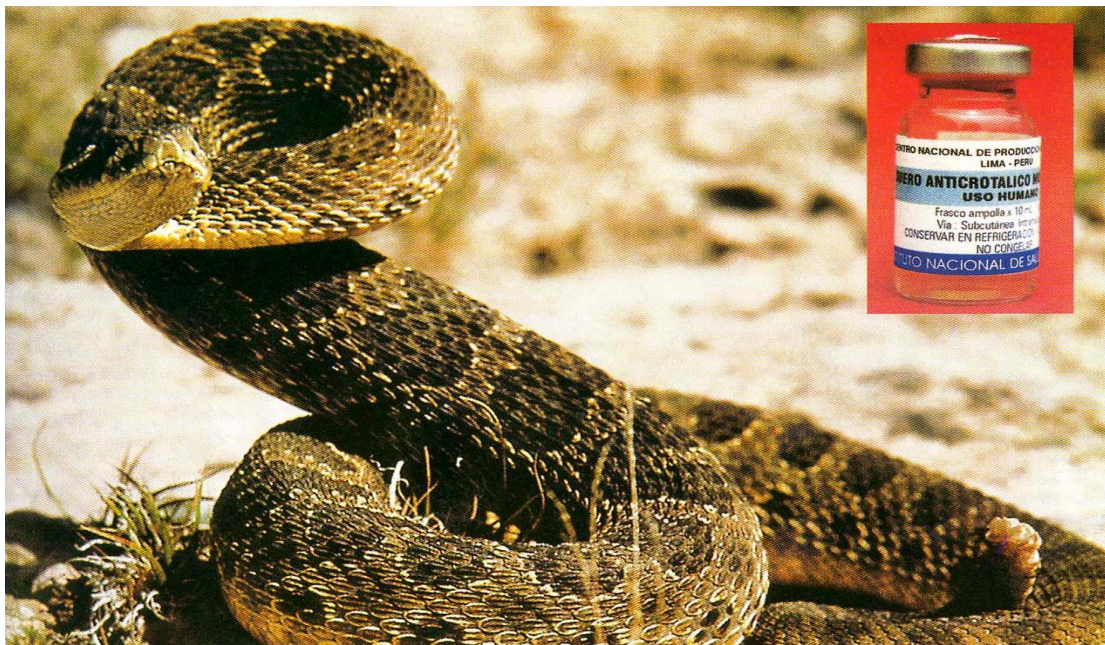
Dos años a partir de la fecha de elaboración.

Indicaciones

Para el tratamiento de envenenamientos causados por serpientes *Crota/us dur;ssus terr;ficus* vg. "Cascabel sudamericano"

El suero debe administrarse lo más rápido posible después del accidente.

En el Perú, la serpiente *C. duissus terrificus* sólo se encuentra en la provincia de Sandía, Departamento de Puno por lo que su uso está restringido a esa zona.



*este valor puede variar en cada lote producido

Caracterización de los accidentes crotálicos:

El envenenamiento por las serpientes *C. durissus terrificus* se caracteriza por neurotoxicidad, mionecrosis, afección renal y efectos locales moderados. La mortalidad de estos accidentes es mayor que la reportada para el accidente botrópico. A nivel local se observa edema, parestesias y dolor leve en la zona mordida, mientras a nivel sistémico el paciente presenta mialgias (dolor muscular) generalizadas, disnea progresiva, "fascies neurotóxica" caracterizada por caída de párpados (ptosis); acompañada de taquicardia, hipertensión arterial leve, hipotermia, vómitos, diarrea, disminución del flujo urinario (oliguria), obnubilación y alteraciones visuales producto de la parálisis de los nervios craneanos (diplopia, anisocoria, cicloplegia), y parálisis progresiva de la musculatura esquelética, que condiciona parálisis respiratoria y muerte. En los sujetos que sobreviven a efecto neurotóxico del veneno, la emisión de orina oscura (mioglobinuria) acompaña a la mionecrosis severa, y frecuentemente se asocia a trastornos de la función renal. La anemia y hemolisis intravascular son poco frecuentes.

Reacciones adversas

La administración del suero provoca en algunos pacientes reacciones adversas, las que generalmente ocurren en pacientes tratados previamente con sueros equinos.

Estas reacciones son de diverso grado e incluyen:

- a) Reacción Anafiláctica, que puede ser fatal y se inicia con un brusco malestar, sensación de calor y caída de la presión arterial que puede ocasionar la muerte. En caso de presentación de shock anafiláctico se debe administrar adrenalina por vía endovenosa.
- b) Reacción térmica o febril: generalmente se presenta después de 20 a 30 minutos de la inyección del antiveneno. Se presenta con sensación de frío corporal, ligera disnea y una rápida alza de temperatura.
- c) Enfermedad del Suero, es una reacción tardía que se puede presentar dentro de los 14 días posteriores a la administración del suero antiveneno. Los síntomas incluyen fiebre, erupción dérmica, edema de la piel, dolores articulares y musculares que ceden con la administración de aspirina o acetaminofen. También puede presentarse urticaria. En casos severos de enfermedad del suero se utiliza tratamiento con corticoides.

Contraindicaciones

- Hipersensibilidad al suero equino.
- Mordedura por serpientes no venenosas.

Precauciones

Es muy importante conocer la historia previa del paciente, saber si el paciente ha recibido previamente sueros heterólogos (antirrábico, antiofídico, antitetánico), ó si tiene antecedentes de alergia a medicamentos, alimentos ó si ha sido desensibilizado previamente. En estos casos el médico debe tener especial cuidado, dado que las posibilidades de que el paciente presente reacciones adversas es mayor.

Nunca se debe inyectar suero o hacer la prueba de sensibilidad al suero equino sin tener disponible una ampolla de adrenalina (1:1000 ó 1 mg/mL).

Antes de aplicar la dosis recomendada del suero antiofídico equino, realice la prueba de sensibilidad al suero equino.

Advertencias

- El suero antiofídico es un producto biológico heterólogo para el ser humano, y puede desencadenar reacciones alérgicas severas en algunos sujetos sensibles.
- Antes de aplicar el suero antiveneno lea las recomendaciones del fabricante.
- En aquellos casos en que la prueba de sensibilidad arroje resultados positivos, proceda a desensibilizar al paciente antes de aplicar la dosis recomendada del suero antiofídico.

Dosis y Vías de Administración

La dosis recomendada depende de la severidad del envenenamiento

Grado de severidad	Número de viales*
Leve - moderado	1 a 4
Grave o severo	5 a 12

* Para sueros con título de neutralización de 25 mg/mL o más.

El suero se aplica por vía endovenosa lenta. También puede aplicarse por vía intramuscular. En aquellos casos en que se requiera aplicar tres o más viales por vía endovenosa, estos pueden ser colocados en un frasco de 500 mL de Cloruro de Sodio al 0,9%, al que se le ha retirado previamente el volumen de suero a inyectar. El suero diluído en Cloruro de Sodio puede ser aplicado en infusión en el lapso de 1 a 2 horas.

Interacciones

No se conocen interacciones con otros medicamentos ó biológicos.

Conservación y Almacenamiento

El suero líquido debe conservarse en refrigeración a temperatura entre 2 y 8°C

Presentación

Caja x 1 Frasco ampolla por 10 mL

SUERO ANTILACHÉSICO MONOVALENTE Heterólogo (Equino)

Descripción:

Se expende en forma líquida (solución incolora o amarillo claro) que contiene la fracción gamaglobulina purificada a partir del suero de equinos hiperinmunizados con el veneno de la serpiente *Lachesis muta muta* "shushupe"

Composición

Cada frasco ampolla por 10 mL de solución contiene inmunoglobulinas de origen equino que

Neutralizan 30 mg* de veneno de *L. muta muta*.

Fenol..... 0,025 g

Condición de venta

Venta bajo receta médica

Tiempo de vida útil

Dos años a partir de la fecha de elaboración.

Indicaciones

Para el tratamiento de envenenamientos causados por mordedura de la serpiente *L. muta muta* vg. "Shushupe"

Caracterización de los accidentes lachésicos

Por las características propias del veneno lachésico, el envenenamiento es parecido en algunas de sus características, al envenenamiento producido por la mordedura de las serpientes del género *Bothrops*. Se distinguen dos etapas principales en el envenenamiento: la etapa inicial caracterizada por severa hipotensión arterial, palidez, obnubilación, pudiendo presentarse shock y colapso circulatorio seguido de muerte precoz. En aquellos sujetos que sobreviven a esta etapa se puede observar una segunda etapa caracterizada por normalización de la presión en 9 a 12 horas, acompañada de trastornos de la coagulación de la sangre (incoagulabilidad) y diversas manifestaciones de sangrado por piel y mucosas. Asimismo se ha reportado la presentación de cólicos gastrointestinales y diarrea acompañada de melena. A nivel local se describe dolor local inicial discreto, edema local inmediato y progresivo y eritema. Posteriormente se observa equimosis, linfangitis, bulas, necrosis y abscesos en la zona mordida. La severidad de los casos varía dependiendo del tipo de serpiente agresora, cantidad de veneno inyectado, la zona mordida, el área corporal del sujeto y el estado de salud previo al accidente.

Envenenamiento leve

Cuando existe poco dolor en la zona mordida y edema local discreto. Ausencia de signos y síntomas de afección sistémica. Presión arterial normal ó ligeramente disminuida. El tiempo de coagulación es normal ó ligeramente alterado.

Envenenamiento Moderado

Cuando el paciente tiene dolor acentuado en la zona mordida, edema local evidente, presencia de signos y síntomas sistémicos, hipotensión arterial moderada, tiempo de coagulación alterados ó sangre incoagulable.



Envenenamiento grave o severo

Cuando además de los signos y síntomas locales se presentan severa hipotensión y shock (en etapa inicial) ó hemorragias severas (boca, nariz, riñón -hematuria-), descenso tardío de la presión arterial y síntomas de colapso en la segunda etapa del envenenamiento.

Reacciones adversas

La administración del suero provoca en algunos pacientes reacciones adversas, las que generalmente ocurren en pacientes tratados previamente con sueros equinos.

Estas reacciones son de diverso grado e incluyen:

- d) Reacción Anafiláctica, que puede ser fatal y se inicia con un brusco malestar, sensación de calor y caída de la presión arterial que puede ocasionar la muerte. En caso de presentación de shock anafiláctico se debe administrar adrenalina por vía endovenosa.
- e) Reacción térmica o febril: generalmente se presenta después de 20 a 30 minutos de la inyección del antiveneno. Se presenta con sensación de frío corporal, ligera disnea y una rápida alza de temperatura.
- f) Enfermedad del Suero, es una reacción tardía que se puede presentar dentro de los 14 días posteriores a la administración del suero antiveneno. Los síntomas incluyen fiebre, erupción dérmica, edema de la piel, dolores articulares y musculares que ceden con la administración de aspirina o acetaminofen. También puede presentarse urticaria. En casos severos de enfermedad del suero se utiliza tratamiento con corticoides.

Contraindicaciones

- Hipersensibilidad al suero equino.
- Mordedura por serpientes no venenosas.

Precauciones

Es muy importante conocer la historia previa del paciente, saber si el paciente ha recibido previamente

sueros heterólogos (antirrábico, antiofídico, antitetánico), ó si tiene antecedentes de alergia a medicamentos, alimentos ó si ha sido desensibilizado previamente. En estos casos el médico debe tener especial cuidado, dado que las posibilidades de que el paciente presente reacciones adversas es mayor.

Nunca se debe inyectar suero o hacer la prueba de sensibilidad al suero equino sin tener disponible una ampolla de adrenalina (1:1000 ó 1 mg/mL).

Antes de aplicar la dosis recomendada del suero antiofídico equino, realice la prueba de sensibilidad al suero equino.

Advertencias

- El suero antiofídico es un producto biológico heterólogo para el ser humano, y puede desencadenar reacciones alérgicas severas en algunos sujetos sensibles.
- Antes de aplicar el suero antiveneno lea las recomendaciones del fabricante.
- En aquellos casos en que la prueba de sensibilidad arroje resultados positivos, proceda a desensibilizar al paciente antes de aplicar la dosis recomendada del suero antiofídico.

Dosis y Vías de Administración

La dosis recomendada depende de la severidad del envenenamiento

Grado de severidad	Número de viales*
Leve	1 a 2
Moderado	2 a 4
Grave o severo	5 a 8

* Para sueros con título de neutralización de 25 mg/mL o más.

El suero se aplica por vía endovenosa lenta. También puede aplicarse en las primeras horas de ocurrido el envenenamiento, por vía intramuscular. En los casos de atención tardía, en que ya existe coagulopatía en el paciente, y en aquellos casos en que se requiera aplicar tres o más viales por vía endovenosa, estos pueden ser colocados en un frasco de 500 mL de Cloruro de Sodio al 0,9%, al que se le ha retirado previamente el volumen de suero a inyectar. El suero diluído en Cloruro de Sodio puede ser aplicado en infusión en el lapso de 1 a 2 horas.

Interacciones

No se conocen interacciones con otros medicamentos ó biológicos.

Conservación y Almacenamiento

El suero líquido debe conservarse en refrigeración a temperatura entre 2 y 8°C

Presentación

Caja x 1 Frasco ampolla por 10 mL

SUERO ANTILOXOSCÉLICO MONOVALENTE Heterólogo (Equino)

Descripción

Se expende en forma líquida (solución incolora o amarillo claro) que contiene la fracción gamaglobulina purificada a partir del suero de equinos hiperinmunizados con el veneno de la araña casera del género *Loxosceles*.

Composición

Cada frasco ampolla por 5 mL de solución contiene inmunoglobulinas de origen equino que

Neutralizan 80 glándulas venenosas de *Loxosceles laeta*.
Fenol 0,0125 g

Condición de venta

Venta bajo receta médica

Tiempo de vida útil

Dos años a partir de la fecha de elaboración.

Indicaciones

Para el tratamiento de envenenamientos causados por picadura de las arañas del género *Loxosceles* (araña casera ó araña violín). Debe administrarse lo más rápido posible después de la picadura y de preferencia dentro de las primeras 24 horas del envenenamiento.

Caracterización de los accidentes loxoscélicos

El accidente loxoscélico ocurre en el Perú fundamentalmente en el interior de la vivienda en las grandes ciudades de la costa y sierra, y también en el área rural. El veneno loxoscélico puede causar necrosis cutánea, hemolisis intravascular, vasculitis, coagulación intravascular diseminada e insuficiencia renal aguda. Los accidente se pueden presentar en una de dos variantes:





- a) Síndrome Cutáneo: (corresponde al 60 a 80% de casos). El síntoma inicial predominante es la sensación de lancetazo o picadura urente, seguida de prurito, dolor indefinido, intranquilidad y sensación de tumefacción en la zona de la picadura. Inicialmente hay eritema y edema en la zona picada. En las siguientes 48 a 72 horas la lesión se va transformando en una placa violácea de aspecto marmóreo veteado y equimótico que recibe la denominación de placa liveloide. Esta lesión posee contornos irregulares y al cabo de los días aparecen flictenas (ampollas) en su interior. El contenido de las ampollas inicialmente seroso amarillento, se torna sanguinolento y con los días se reabsorbe formándose en el lugar una costra negra que se esfacela dejando al descubierto una úlcera de evolución cicatricial tórpida, que demora semanas y aun meses en cicatrizar. La mortalidad de este síndrome es prácticamente inexistente, salvo infección severa agregada.
- b) Síndrome Sistémico (cutáneo - víscero - hemolítico, corresponde al 10 a 30% de los casos). Los síntomas iniciales son similares al loxoscelismo cutáneo y se acompaña además de escalofríos, cefalea, náuseas. Este síndrome se evidencia entre las 12 y 72 horas posteriores a la picadura, y se acompaña de insomnio, sensación febril, astenia y malestar general. Los signos como la ictericia, palidez, hemoglobinuria (emisión de orinas oscuras secundaria a hemolisis intravascular) y hematuria, se acompañan de fiebre, compromiso sensorial con obnubilación progresiva, delirio e incluso coma. Es frecuente observar en las primeras 48 horas del envenenamiento, la presentación de erupción cutánea morbiliforme ó escarlatiniforme. En los casos severos, la hemolisis intravascular y la hematuria son acompañadas de trastornos de la coagulación sanguínea e insuficiencia renal aguda que puede llevar a la muerte al paciente.
- c) Loxoscelismo banal: (3 a 5% de casos) Son asintomáticos.

Reacciones adversas

La administración del suero provoca en algunos pacientes reacciones adversas, las que generalmente ocurren en pacientes tratados previamente con sueros equinos.

Estas reacciones son de diverso grado e incluyen:

- g) Reacción Anafiláctica, que puede ser fatal y se inicia con un brusco malestar, sensación de calor y caída de la presión arterial que puede ocasionar la muerte. En caso de presentación de shock anafiláctico se debe administrar adrenalina por vía endovenosa.
- h) Reacción térmica o febril: generalmente se presenta después de 20 a 30 minutos de la inyección del antiveneno. Se presenta con sensación de frío corporal, ligera disnea y una rápida alza de temperatura.
- i) Enfermedad del Suero, es una reacción tardía que se puede presentar dentro de los 14 días posteriores a la administración del suero antiveneno. Los síntomas incluyen fiebre, erupción dérmica, edema de la piel, dolores articulares y musculares que ceden con la administración de aspirina o acetaminofen. También puede presentarse urticaria. En casos severos de enfermedad del suero se utiliza tratamiento con corticoides.

Contraindicaciones

- Hipersensibilidad al suero equino.
- Picadura de otras arañas e insectos diferentes a las arañas Loxosceles.

Precauciones

Es muy importante conocer la historia previa del paciente, saber si el paciente ha recibido previamente sueros heterólogos (antirrábico, antiofídico, antitetánico), ó si tiene antecedentes de alergia a medicamentos, alimentos ó si ha sido desensibilizado previamente. En estos casos el médico debe tener especial cuidado, dado que las posibilidades de que el paciente presente reacciones adversas es mayor.

Nunca se debe inyectar suero o hacer la prueba de sensibilidad al suero equino sin tener disponible una ampolla de adrenalina (1:1000 ó 1 mg/mL).

Antes de aplicar la dosis recomendada del suero antiofídico equino, realice la prueba de sensibilidad al suero equino.

Advertencias

- El suero antiloxoscélico es un producto biológico heterólogo para el ser humano, y puede desencadenar reacciones alérgicas severas en algunos sujetos sensibles.
- Antes de aplicar el suero antiveneno lea las recomendaciones del fabricante.
- En aquellos casos en que la prueba de sensibilidad arroje resultados positivos, proceda a desensibilizar al paciente antes de aplicar la dosis recomendada del suero antiofídico.

Dosis y Vías de Administración

La dosis recomendada es de 1 a 2 frascos ampollas tanto para niños como adultos. Se recomienda su aplicación preferencial en las primeras 24 horas de ocurrido el envenenamiento.

La vía recomendada es la vía subcutánea, y debe aplicarse en la región inter escapular (en la espalda).

De acuerdo a la evaluación médica del paciente , es recomendable la aplicación previa de un antihistamínico H1 (ej: clorfeniramina) previo a la administración del suero antiloxoscélico.

Interacciones

No se conocen interacciones con otros medicamentos ó biológicos.

Conservación y Almacenamiento

El suero líquido debe conservarse en refrigeración a temperatura entre 2 y 8° C

Presentación

Caja x 1 Frasco ampolla por 5 mL

AMERICAN COLLEGE OF EMERGENCY PHYSICIANS. (1987). snake venom poisoning wall chart. ACEP. USA

CHANG NEIRA. J.; ZAVALETA M-V. . A (1987). Ofidismo en el Hospital general de La Merced: estudio retrospectivo de 116 casos. DIAGNOSTICO (LIMA). 20(4): 115-120

DE LA VEGA. E.; ZAVALETA. A; CARRILLO. N.; TRELLES. L. (1989). Accidentes producidos por animales ponzoñosos: serpientes venenosas del Perú. EN: Anales del Seminario Nacional de Zoonosis y Enfermedades de transmisión alimentaria: 169-188. Lima. Ministerio de Salud. Programa Nacional de Control de Zoonosis.

INSTITUTO BUTANTAN. (1986). Normas gerais para o tratamento dos accidentes humanos por animais peconhentos. Sao Paulo. BANESPA 20 págs.

INSTITUTO NACIONAL DE SALUD. CENTRO NACIONAL DE PRODUCCION DE BIOLÓGICOS. (1996). Vademecum. Catalogo de Productos. Zavaleta A. Cabezas C. Chang J. Llamoga A (Editores). Ministerio de Salud. Instituto Nacional de Salud. Centro Nacional de Producción de Biológicos. Lima. Staff Publicitario. 128 págs.

LEE. CHEN-YUAN. (ED). (1979). Snake venom. New York. . Springer Verlag. Handbook of Exper. Pharmacology. 49: 1150 p.

RUSSELL. F.E. (1980). Snake venom poisoning. J.B. Lippincott. Philadelphia. 562 p.

SILVA HMD. J. (1980). Accidentes humanos por las serpientes de los géneros *Bothrops* y *Lachesis*. MEM. INST. BUTANTAN. 40/45:403-423.

TU, ANTHONY T. (1977). Venoms : Chemistry and Molecular biology. Nueva York. Jhon Wiley & Sons Inc. 545 págs.

ZAVALETA MARTINEZ-VARGAS. ALFONSO; ALVARES BIANCHI. H.; MAGUIÑA VARGAS. c.; SANABRIA. H. (1987). Ofidismo en Lima por *Bothrops pictus* Jergón de la costa: aspectos clínicos epistemológicos. DIAGNOSTICO (LIMA). 20(3): 78-83.

ZAVALETA M-V. . A. (1993). Nuevos aportes al uso racional de los sueros antiofídicos en el Perú. Revista Médica Herediana. 3 (Supl 1): 90. - 93.

ALGUNAS SERPIENTES VENENOSAS DE IMPORTANCIA MEDICA



***Bothrops atrox* “jergón” de la selva.**



***Bothrops pictus* “jergón de la costa”**

ALGUNAS SERPIENTES VENENOSAS DE IMPORTANCIA MEDICA



***Bothrops barnetti* “macanche”**



***Micrurus sp* “serpiente de coral, coralillo, naca naca”**

El libro "FARMACOLOGIA DE VENENOS y ANTIVENENOS DE SERPIENTE"
se imprimió en los talleres gráficos de
FIMART S.A.
en el mes de febrero de 1998



Cápac Yupanqui 1400 – Jesús María
Telf.: 471-9920 471-3254 Fax: 471-7443