



UNIVERSIDAD DE PANAMÁ  
VICERRECTORÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSTGRADO  
FACULTAD DE MEDICINA  
PROGRAMA DE MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

“VARIACIÓN GEOGRÁFICA DE LA ACTIVIDAD FARMACOLÓGICA Y TÓXICA  
DEL VENENO DE *Bothrops asper* DE PANAMÁ”

POR:

**SARA MARÍA VÉLEZ PARRA**

TESIS PRESENTADA COMO UNO DE LOS REQUISITOS PARA  
OBTENER EL GRADO DE MAGÍSTER EN CIENCIAS BIOMÉDICAS  
CON ÉNFASIS EN FARMACOLOGÍA

PANAMÁ, REPÚBLICA DE PANAMÁ

2016

UNIVERSIDAD DE PANAMÁ  
VICERRECTORÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSTGRADO  
FACULTAD DE MEDICINA  
PROGRAMA DE MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

HOJA DE APROBACIÓN

“VARIACIÓN GEOGRÁFICA DE LA ACTIVIDAD FARMACOLÓGICA Y TÓXICA  
DEL VENENO DE *Bothrops asper* DE PANAMÁ”

DIRECTORA

MAGISTER HILDAURA ACOSTA DE PATIÑO

CENTRO DE INVESTIGACIÓN E INFORMACIÓN DE MEDICAMENTOS Y  
TÓXICOS (CIIMET)

Tesis presentada para optar por el grado de Master en Ciencias Biomédicas con  
énfasis en Farmacología.

Por la Doctora Sara María Vélez Parra

2016

## **DEDICATORIA**

Dedico esta tesis a mi motor principal, mi familia, que con esfuerzo y sacrificio siempre me han acompañado y apoyado. Son lo más valioso que Dios me ha dado.

## **AGRADECIMIENTOS**

Mis agradecimientos a Dios quien es mi fortaleza y guía en este camino.

Especial agradecimiento a la Profesora Hildauro Acosta de Patiño, quien me dio la oportunidad de realizar este trabajo en el Centro de Investigación e Información de Medicamentos y Tóxicos acompañándome con paciencia y docencia brindándome conocimientos invaluable que me servirán para toda mi vida profesional.

Al Doctor José María Gutiérrez, del Instituto Clodomiro Picado de la Universidad de Costa Rica, que siempre estuvo apoyándonos con su experiencia y amabilidad desde el inicio de este trabajo.

Al Doctor Rafael Otero por la asesoría brindada y por compartir los conocimientos y procedimientos para comenzar esta línea de investigación.

A mis profesores de la maestría en Ciencias Biomédicas, que me apoyaron y creyeron en mí, en especial a la profesora Leandra Gómez, con la que siempre he podido contar con sus conocimientos y amistad. A los profesores Juan Morán, Estela Guerrero e Ivonne Torres por sus enseñanzas y apoyo incondicional. A la profesora Estelina Ortega por su apoyo y enseñanzas en Bioestadística.

A mis compañeros de la Maestría en Ciencias Biomédicas, por su apoyo y amistad.

A mis compañeros del CIIMET, que me acompañaron y ayudaron en los ensayos y gestión, a Alina, Marcos, Maykell, Karla, Jairo, Adolfo, Alexandra, Yenikarina, José y Miguel de los cuales aprendo cada día.

Al Departamento de Bioquímica y Nutrición, por permitirme el uso de sus equipos e instalaciones para la realización de este trabajo.

Agradezco a la Facultad de Medicina, Facultad de Medicina Veterinaria, al Serpentario del Centro Regional Universitario de Veraguas, a la Vicerrectoría de Investigación y Postgrado de la Universidad de Panamá (Proyectos VIP-UP CUF1-2015-CS-P-010, CE-PT-327-15-02-15-33), a SENACYT (INF10-051, COL06-017) y al Instituto Clodomiro Picado de la Universidad de Costa Rica, por el apoyo recibido como parte del Programa Nacional de Ofidismo.

## ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE TABLAS.....	i
ÍNDICE DE FIGURAS.....	ii
ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS .....	iv
RESUMEN.....	1
SUMMARY .....	2
INTRODUCCIÓN.....	3
CAPÍTULO I: GENERALIDADES DE LA INVESTIGACIÓN.....	5
1.1. Planteamiento del problema.....	6
1.2. Justificación.....	8
1.3. Impacto.....	10
1.4. Objetivos .....	12
Objetivo General .....	12
Objetivos Específicos.....	12
1.5. Hipótesis de trabajo.....	12
CAPITULO II: FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA .....	13
2.1. Epidemiología del accidente ofídico .....	14
2.2. Serpiente Bothrops asper.....	19
2.3. Características del veneno de Bothrops asper.....	22
2.4. Variación intraespecie del veneno.....	28
2.5. Fisiopatología del envenenamiento por Bothrops asper .....	32
2.5.1. Hemorragia .....	32
2.5.2. Alteraciones de la hemostasia .....	35
2.5.3. Edema.....	36
2.5.4. Miotoxicidad .....	37
2.5.5. Letalidad .....	39
2.6. Aspectos clínicos del accidente ofídico .....	40
2.6.1. Diagnóstico .....	40
2.6.2. Exámenes paraclínicos.....	45

2.6.3. Complicaciones.....	45
2.6.4. Manejo del accidente ofídico.....	48
CAPITULO III: ASPECTOS METODOLÓGICOS .....	54
3.1. Tipo de investigación.....	55
3.2. Materiales.....	55
3.2.1. Recolección de especímenes de serpientes y extracción del veneno. ....	55
3.2.2. Animales de experimentación .....	56
3.3. Procedimientos experimentales .....	57
3.3.1. Componente 1: Variación geográfica de la actividad y tóxica del veneno de Bothrops asper de Panamá.....	57
3.3.1.1. Actividad hemorrágica .....	58
3.3.1.2. Actividad coagulante.....	59
3.3.1.3. Actividad hemolítica indirecta. ....	61
3.3.1.4. Actividad desfibrinante.....	61
3.3.1.5. Actividad edematizante.....	62
3.3.1.6. Actividad miotóxica .....	64
3.3.1.7. Actividad letal .....	65
3.3.1.8. Patrón electroforético.....	66
3.3.1.9. Inmunoelectrotransferencia .....	66
3.3.2. Componente 2: Estudio preclínico de la eficacia del antiveneno. ....	67
3.3.2.1. Antiveneno.....	67
3.3.2.2. Ensayo preclínico .....	67
3.4. Manejo estadístico de los datos .....	68
CAPÍTULO IV: RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	70
4.1. Componente 1: Variación geográfica de la actividad tóxica del veneno de Bothrops asper de Panamá .....	74
4.1.1. Dosis Hemorrágica mínima.....	74
4.1.2. Dosis Coagulante mínima .....	76
4.1.3. Dosis Hemolítica Indirecta mínima.....	79

4.1.4. Dosis Desfibrinante mínima .....	80
4.1.5. Dosis Edematizante mínima .....	81
4.1.6. Actividad miotóxica .....	82
4.1.7. Dosis Letal 50 .....	85
4.1.8. Patrón electroforético .....	87
4.1.9. Inmunoelectrotransferencia.....	89
4.2. Componente 2: Estudio preclínico de la eficacia del antiveneno.....	90
4.2.1. Neutralización de la actividad letal de cada zona .....	90
CONCLUSIONES.....	93
RECOMENDACIONES.....	95
BIBLIOGRAFÍA.....	96
ANEXOS.....	102
ANEXO 1. Análisis estadístico de la DHm con el Programa GRAPH PAD	
PRISM .....	103
ANEXO 2. Análisis estadístico de la DCm con el Programa GRAPH PAD	
PRISM .....	105
ANEXO 3. Análisis estadístico de la Actividad miotóxica con el Programa	
GRAPH PAD PRISM .....	106
ANEXO 4. Análisis estadístico de la DHIm con el Programa GRAPH PAD	
PRISM .....	108
ANEXO 5. Casos de mordedura de ofidio por región, años 1984-2014 .....	109
ANEXO 6. Defunciones por contacto traumático con serpientes y lagartos	
venenosos según provincia y comarca indígena de residencia. Años	
2001-2012. ....	111

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Clasificación según la OMS de las especies de serpientes de mayor importancia médica en Panamá .....	18
<b>Tabla 2.</b> Familia de proteínas descritas en el veneno de <i>B. asper</i> .....	23
<b>Tabla 3.</b> Proteínas más relevantes descritas en el veneno de <i>B. asper</i> .....	27
<b>Tabla 4.</b> Principales pruebas de laboratorio y frecuencia de aparición de sus alteraciones en el paciente con envenenamiento por mordedura de <i>B. asper</i> .....	47
<b>Tabla 5.</b> Clasificación clínica del envenenamiento bothrópico y cantidad de ampollas de antiveneno requeridas.....	52
<b>Tabla 6.</b> Guía para la administración Intravenosa del Suero Antiofídico Polivalente según el Instituto Clodomiro Picado, Universidad de Costa Rica.....	53
<b>Tabla 7.</b> Clasificados por zona geográfica zona geográfica y número de ejemplares de serpientes utilizados.....	55
<b>Tabla 8.</b> Actividades tóxicas del veneno de <i>Bothrops asper</i> de diferentes zonas geográficas de Panamá. ....	73
<b>Tabla 9.</b> Dosis Hemorrágica mínima del veneno de <i>B. asper</i> de cada zona geográfica de Panamá.....	74
<b>Tabla 10.</b> DCm determinada para el veneno de <i>B. asper</i> proveniente de cada zona geográfica de Panamá. ....	76
<b>Tabla 11.</b> DHIm determinada para el veneno de <i>B. asper</i> proveniente de cada zona geográfica de Panamá. ....	79
<b>Tabla 12.</b> DEm determinada para el veneno de <i>B. asper</i> proveniente de cada zona geográfica de Panamá. ....	81
<b>Tabla 13.</b> Actividad miotóxica determinada para el veneno de <i>B. asper</i> proveniente de cada zona geográfica de Panamá. ....	83
<b>Tabla 14.</b> Dosis Letal 50 determinada para el veneno de <i>B. asper</i> proveniente de cada zona geográfica de Panamá. ....	86
<b>Tabla 15.</b> Dosis de Reto utilizada para la neutralización de la letalidad.....	90
<b>Tabla 16.</b> Resultados obtenidos para la neutralización del efecto letal por el antiveneno polivalente elaborado por el Instituto Clodomiro Picado de Costa Rica. ....	91

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Frecuencia del sitio anatómico involucrado en el accidente ofídico.....	16
<b>Figura 2.</b> <i>Bothrops asper</i> adulta.....	20
<b>Figura 3.</b> Características morfológicas de <i>Bothrops asper</i> . ....	21
<b>Figura 4.</b> Metaloproteinasas (SVMPs) involucradas en la fisiopatología de la hemorragia en el envenenamiento por <i>Bothrops asper</i> . ....	34
<b>Figura 5.</b> Principales hallazgos clínicos y su frecuencia de aparición en el envenenamiento por mordedura de <i>Bothrops asper</i> . ....	44
<b>Figura 6.</b> Suero antiofídico polivalente producido por el Instituto Clodomiro Picado de Costa Rica. ....	50
<b>Figura 7.</b> Mapa geográfico de Panamá con la división según la zona de captura de los especímenes para el estudio. ....	56
<b>Figura 8.</b> Método experimental para determinar la Dosis Hemorrágica mínima.....	59
<b>Figura 9.</b> Método para la evaluación de la Dosis Coagulante mínima. ....	60
<b>Figura 10.</b> Método para determinar la Dosis Desfibrinante mínima (DDm) del veneno de <i>B. asper</i> .....	62
<b>Figura 11.</b> Método experimental para evaluar la Dosis Edematizante mínima (DEm). ....	64
<b>Figura 12.</b> Método de evaluación de Actividad mitotóxica. ....	65
<b>Figura 13.</b> Ensayo de neutralización del veneno de <i>B. asper</i> por el antiveneno polivalente. ....	68
<b>Figura 14.</b> Valores de DHm del veneno de <i>B. asper</i> cada zona geográfica de Panamá. ....	75
<b>Figura 15.</b> Diámetro de los halos hemorrágicos en la piel de ratón de cada zona geográfica evaluada.....	77
<b>Figura 16.</b> Valores de DCm del veneno de <i>B. asper</i> de cada zona geográfica de Panamá.....	78
<b>Figura 17.</b> Valores de DHim obtenidas para el veneno de <i>B. asper</i> de las diferentes zonas geográficas de Panamá.....	80

<b>Figura 18.</b> Comportamiento del edema posterior a la inyección subcutánea a nivel podal de 1 µg de veneno de <i>Bothrops asper</i> de las zonas geográficas de Panamá a través del tiempo.....	82
<b>Figura 19.</b> Actividad mitotóxica al inyectar 50 microgramos de veneno I.M. de <i>B. asper</i> según zona geográfica de Panamá y veneno patrón de Costa Rica y de Panamá. ....	84
<b>Figura 20.</b> Valores de la DL <sub>50</sub> del veneno de <i>B. asper</i> de cada zona geográfica de Panamá.....	87
<b>Figura 21.</b> Electroforesis SDS-PAGE del veneno de serpiente <i>B. asper</i> de diferentes zonas de Panamá y veneno patrón de Costa Rica y de Panamá.....	88
<b>Figura 22.</b> Inmunolectrotransferencia a partir de SDS-PAGE del veneno de <i>B. asper</i> de diferentes zonas geográficas del Panamá y veneno patrón de Costa Rica y Panamá.....	89
<b>Figura 23.</b> DE <sub>50</sub> .de la neutralización del efecto letal del veneno por el antiveneno fabricado por el Instituto Clodomiro Picado.....	92

## ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

<b><i>B. asper</i></b>	<i>Bothrops asper</i>
<b>CK</b>	Creatina quinasa
<b>CRISPs</b>	Proteínas secretoras ricas en cisteína
<b>DCm</b>	Dosis Coagulante mínima
<b>DDm</b>	Dosis Desfibrinante mínima
<b>DE<sub>50</sub></b>	Dosis Efectiva 50
<b>DEm</b>	Dosis Edematizante mínima
<b>DHm</b>	Dosis Hemorrágica mínima
<b>DL<sub>50</sub></b>	Dosis Letal 50
<b>ICP</b>	Instituto Clodomiro Picado
<b>IRA</b>	Insuficiencia Renal Aguda
<b>LAO</b>	L-Aminoácido Oxidasas
<b>LC</b>	Límite de confianza
<b>PBS</b>	Buffer fosfato salino
<b>PLA<sub>2</sub></b>	Fosfolipasa A <sub>2</sub>
<b>SAO</b>	Suero Antiofídico
<b>SNC</b>	Sistema Nervioso Central
<b>SSN</b>	Solución Salina Normal
<b>SVMPs</b>	Metaloproteinasas de veneno de serpiente
<b>PI- SVMPs</b>	Metaloproteinasas del veneno de serpiente del grupo PI
<b>PIII-SVMPs</b>	Metaloproteinasas del veneno de serpiente del grupo PIII
<b>WHO/OMS</b>	World Health Organization/Organización Mundial de la Salud

## RESUMEN

El veneno de serpiente es una mezcla compleja, compuesta principalmente por proteínas biológicamente activas que cumplen la función de inmovilizar, matar y digerir a la presa, dicha mezcla varía en proporción de los componentes y con ello en las actividades biológicas y tóxicas. En serpientes con amplia distribución geográfica, como es el caso de *Bothrops asper*, se describe que la composición del veneno puede cambiar según la localización geográfica y la edad, principalmente, existiendo variación intraespecie sin que varíe la morfología de la misma. Conocer dicha variación para la serpiente *B. asper* de Panamá, la cual es la responsable del 70% de los casos ocurridos en nuestro país, permite valorar las diferencias en la toxicidad del veneno, lo que podría explicar diferencias en la clínica y epidemiología de las mordeduras de serpientes en las diferentes zonas geográficas del país. Para este estudio se recolectaron 76 especímenes adultos, provenientes de la Zona 1 (Bocas del Toro, Norte de Veraguas, Colón y Guna Yala), de la Zona 2 (Chiriquí y el Sur de Veraguas), de la Zona 3 (Azüero y Coclé) y de la Zona 4 (Panamá y Darién). Se evaluaron las principales actividades tóxicas y la capacidad del antiveneno polivalente producido por el Instituto Clodomiro Picado para neutralizar la actividad letal del veneno de cada una de las zonas de estudio. Los venenos de cada zona presentaron un perfil toxicológico similar sin diferencias en la actividad letal, desfibrinante y edematizante. La variación encontrada fue una mayor miotoxicidad en el veneno de la Zona 2 y una menor actividad hemorrágica y coagulante en el veneno de la Zona 4. No se encontró diferencia estadísticamente significativa en los valores de las dosis efectivas 50 de la neutralización del efecto letal por el antiveneno.

Palabras clave: Ofidismo, *Bothrops asper*, Veneno, Toxicidad, Variación geográfica del veneno, Panamá

## SUMMARY

Snake venom is a complex mixture composed mainly of biologically active proteins that play a role in immobilizing, killing and digesting the prey. This mixture varies in the proportion of components and thus in the biological and toxic activities. In snakes with wide geographical distribution, as in the case of *Bothrops asper*, it is described that the composition of the venom changes according to the geographical location and age. There is intra-species variation in the composition of the poison without varying the morphology of the same.

Knowing this variation for the snake *B. asper* of Panama, which is responsible for 70% of cases in our country, allows knowing the differences in toxicity of the venom, which may explain differences in the clinical and epidemiology outcomes of snakebites in different geographical areas of the country. 76 specimens of adult snakes were collected from Zone 1 (Bocas del Toro, North of Veraguas, Colon, and Guna Yala), Zone 2 (Chiriqui and Southern Veraguas), Zone 3 (Azüero and Cöcle) and Zone 4 (Panama and Darien). The main toxic and the capacity of the polyvalent antivenim produced by the Institute Clodomiro Picado activities were evaluated to neutralize the lethal activity of the venom of each one of the studied zones. Venoms in each zone showed a similar toxicological profile with no differences in lethal, defibrinating, and edematizing activities. The greater variation was found in the myotoxicity of venom in Zone 2 and a less bleeding and clotting activity in the venom of the Zone 4. No statistically significant difference was found in the values of the ED50 of neutralization of the lethal effect by the antivenin.

Keywords: Ophidism, *Bothrops asper*, Venom, Toxicity, Geographical variation of venom, Panama.

## INTRODUCCIÓN

El envenenamiento por mordedura de serpiente ha sido tradicionalmente descuidado por las autoridades de salud, las agendas de investigación y las grandes empresas farmacéuticas del mundo, por lo que la Organización Mundial de la Salud la ha incluido en la lista de "Enfermedades desatendidas" (1). Es una patología que afecta principalmente a adultos jóvenes de comunidades rurales dejando secuelas físicas y psicológicas importantes de por vida en los pacientes afectados (2). La serpiente *Bothrops asper* (*B. asper*), de la familia Viperidae, es la especie a la cual se le atribuyen el mayor número de casos clínicos en Panamá, caracterizada por ser una serpiente agresiva, distribuida en todo el territorio nacional y en contacto con poblaciones humanas (3). El veneno de dicha familia de serpientes, se caracteriza por ser predominantemente hemotóxicos e histotóxicos causando daño local extenso y manifestaciones sistémicas con incoagulabilidad de la sangre, sangrados sistémicos activos que pueden llevar un compromiso hemodinámico, shock hipovolémico y muerte (4).

Los venenos de serpientes son las secreciones más ricas en enzimas y toxinas en la naturaleza y están compuestos por múltiples moléculas tóxicas. Se ha descrito en la literatura científica que dicha composición de toxinas varía entre

especies de la misma familia, e incluso se ha descrito que pueden variar en una misma especie sin que la morfología de la serpiente cambie, debido a factores como la edad, la ubicación geográfica en serpientes que poseen una amplia distribución, entre otros factores. Dicha variación puede afectar el contenido y la potencia de las toxinas que lo componen, implicando posibles variaciones en la sintomatología y en la eficacia del antiveneno (5).

A través de técnicas experimentales in vivo e in vitro se puede evaluar las actividades tóxicas y farmacológicas para determinar dicha variaciones, generando conocimiento para la adquisición o producción de un antiveneno más adecuado. Debido a la relevancia médica en la cantidad anual de casos de envenenamiento ocasionados por la mordedura de *B. asper* a nivel de todo el país, el objetivo de este trabajo es determinar la posible variación de las actividades tóxicas y farmacológicas del veneno de la serpiente *B. asper* de cada zona geográfica estudiada, así como la neutralización del efecto letal por el antiveneno.

## **CAPÍTULO I: GENERALIDADES DE LA INVESTIGACIÓN**

### 1.1. Planteamiento del problema

El envenenamiento por serpientes constituye un serio problema de salud pública en el Sur de Asia, África Sub-sahariana y Latinoamérica (6,7). Panamá cuenta con la incidencia más alta en ofidismo, en Latinoamérica (8). Las especies de serpiente con la mayor importancia en Salud Pública en América Latina pertenecen a la familia Viperidae, género *Bothrops* siendo la especie *B. asper* la responsable del 50-70% de los casos anuales por envenenamiento ofídico en Panamá (9,10). Dicha especie se encuentra en todo el territorio nacional, ubicada principalmente en los centros de alta densidad de población humana, en regiones agrícolas y ganaderas (11). El envenenamiento por *B. asper* se caracteriza por causar un prominente daño tisular localizado en el sitio de la mordedura, manifestándose con dolor, edema, formación de ampollas, hemorragia, necrosis de tejidos blandos, en los casos moderados o severos, ocurren las manifestaciones sistémicas caracterizadas por sangrados, coagulopatías, hipotensión, shock cardiovascular e incluso puede llevar a la muerte (12).

La tasa de fatalidad varía de acuerdo a factores antropológicos, dificultades geográficas y sociopolíticas relacionadas con el traslado de las víctimas, disponibilidad de recursos terapéuticos y programas específicos de atención primaria, variedad de especies causantes de las mordeduras y diferencias del veneno entre serpientes de la misma especie (13).

En Panamá, según datos de la Contraloría General de la República, en el periodo de 2001 a 2012 se registró un promedio de 16 muertes por año debidas al envenenamiento por mordedura de serpiente.

La administración parenteral de antiveneno de origen animal constituye el único tratamiento científicamente validado para los envenenamientos por mordedura de serpiente. Estos productos inmunobiológicos se obtienen al inmunizar principalmente a caballos con el veneno de una o varias especies de serpientes, generando antivenenos monoespecíficos o poliespecíficos, respectivamente (3). Cabe mencionar que la inmunoterapia con antiveneno no ha podido resolver todos los problemas relacionados con el accidente ofídico, especialmente la miotoxicidad, el edema y el daño tisular local, por ello, el problema real es que muchas víctimas de la mordedura de *B. asper* sufren de importantes secuelas de por vida, debido al daño causado por el veneno a los tejidos (14).

La sintomatología y la efectividad del antiveneno pueden verse afectada debido a que se ha descrito que los venenos de una misma especie pueden variar principalmente según la edad del espécimen y su distribución geográfica. Debido a dicha variación es necesario el estudio más exhaustivo de los venenos de acuerdo a la zona geográfica que habite la serpiente para conocer sus características y las implicaciones que puedan presentarse (5).

## 1.2. Justificación

El veneno de serpiente es una mezcla compleja de proteínas desarrolladas en algunas especies para la inmovilización y digestión de su presa, como también una forma de defensa contra depredadores (5), para el cual se ha descrito variación ontogenética y geográfica en otros países (15,16). Es así como en Costa Rica, el estudio de la variabilidad entre *B. asper* del Caribe y del Pacífico reveló importantes diferencias, en donde los especímenes provenientes del Caribe exhibieron mayores efectos miotóxicos y hemorrágicos, mientras que los especímenes del Pacífico mostraron una gran actividad proteolítica (17).

En el trabajo de Uribe (2014, comunicación personal) se evidenciaron ciertas diferencias en las bandas electroforéticas, por lo que la realización del estudio comparativo del veneno de las diversas zonas geográficas de nuestro país es muy relevante.

Se requiere estudiar el envenenamiento por mordedura de serpiente de forma integral, el cual se ve influenciado por características regionales, sociales y étnicas. De tal manera que sí se analizan los datos por región y no por tendencia general, se pueden detectar asimetría en la incidencia del accidente ofídico y en la inequidad en la atención de las mismas por parte de los sistemas de salud (18). Uno de las características regionales importantes a estudiar es la variación, descrita en la literatura, que existe para el veneno de serpientes de una misma especie que tengan una amplia distribución geográfica, como es el caso de la

serpiente *B. asper*. Así, con el fin de tener un panorama más amplio de esta posible variación y entender mejor los mecanismos fisiopatológicos por los cuales el veneno actúa, es necesario profundizar en el estudio de los venenos de las serpientes de las diferentes regiones geográficas. Esta tarea de investigación debe extenderse al conocimiento de los perfiles clínicos de envenenamientos, al análisis de la eficacia y seguridad de los antivenenos y a la obtención de información epidemiológica más rigurosa, que permita detectar regiones de alta vulnerabilidad en esta patología, particularmente grupos de población que por su posición geográfica no puedan recibir una atención temprana (19).

Un problema que complica el diseño y el uso de antivenenos es la gran variabilidad bioquímica e inmunológica del veneno de las serpientes. Por lo que la variación intraespecífica del veneno es un fenómeno común en las serpientes. Así mismo, el análisis proteómico de estas secreciones ha revelado patrones complejos de variación ontogenética y regional no solo entre especies, sino también dentro de una misma especie, particularmente en aquellas que presentan una distribución geográfica amplia (5,15). La diversidad intraespecie, que puede llevar a una variabilidad clínica de envenenamiento, merece mayor consideración, ya que las mordeduras por poblaciones específicas de serpientes pueden requerir tratamientos diferentes. Por lo que es necesario determinar si existen variaciones importantes según la distribución geográfica que tengan trascendencia en el manejo clínico del accidente ofídico.

En América Latina se ha prestado especial atención a la evaluación preclínica de los antivenenos que se emplean en la región, en la misma línea, se han efectuado diversos proyectos colaborativos para evaluar la reactividad cruzada de los antivenenos de varios países, es decir, valorar la capacidad del antiveneno para neutralizar los venenos de diversas especies de la región con su consecuente uso potencial en los diversos países (18). Aludiendo que solo un cuidadoso análisis preclínico de la reactividad cruzada y la neutralización cruzada podría decir si el antiveneno es capaz de neutralizar la toxicidad del veneno de serpiente.

El trabajo realizado por Alina Uribe, recomienda la realización de un estudio exhaustivo para valorar la diferencias intraespecie del veneno de *B. asper* de Panamá (Uribe, 2014. Comunicación personal).

### **1.3. Impacto**

Con este proyecto se pretende evaluar las actividades farmacológicas y tóxicas del veneno, según las zonas geográficas de procedencia, de *B. asper* de Panamá, y luego valorar la efectividad neutralizante del antiveneno para la actividad letal de cada una de ellas.

Cabe mencionar que es la primera vez que en el país se generaría información comparativa de la variación geográfica del veneno de *B. asper*, lo cual genera un

impacto de evaluación ambiental, con implicaciones económicas y sociales ya que se podrá hacer un acercamiento hacia poblaciones de mayor vulnerabilidad.

De encontrarse resultados de importante diferencia entre la actividad neutralizante de un antiveneno según zona geográfica, se podrá dar un aporte a las autoridades de salud para que esta información sea considerada en la gestión de un antiveneno con mayor especificidad lo cual tendría importantes repercusiones económicas, entre ellas cabe mencionar la cantidad de viales de antiveneno a utilizar, periodo de hospitalización, reacciones adversas, secuelas entre otras.

De igual manera se espera generar conocimiento sobre la variación geográfica del veneno de *B. asper* de Panamá y como este estudio pudiera compararse con el cuadro clínico del envenenamiento que se presenta en las diferentes regiones del país. Por lo que esta información es de relevancia para el sistema de salud, para los profesionales, para los tomadores de decisión, los grupos comunitarios, las instituciones de respuesta rápida como el Cuerpo de Bomberos y SINAPROC, entre otros.

Además se podrá apoyar la formación científica y la actualización de todos los profesionales de la salud vinculados a la investigación, la vigilancia epidemiológica y la atención del accidente ofídico.

## 1.4. Objetivos

### Objetivo General

- ❖ Determinar la variación geográfica de la actividad farmacológica y tóxica del veneno de *B. asper* de Panamá y su neutralización por el antiveneno.

### Objetivos Específicos

- ❖ Determinar las actividades farmacológicas y tóxicas (locales y sistémicas) del veneno de *B. asper* de Panamá según las diferentes zonas geográficas del país.
- ❖ Evaluar la capacidad del antiveneno para neutralizar la letalidad del veneno de *B. asper* provenientes de cada zona geográfica de Panamá.

## 1.5. Hipótesis de trabajo

Existe variación geográfica de la actividad farmacológica y tóxica del veneno de *B. asper* de Panamá.

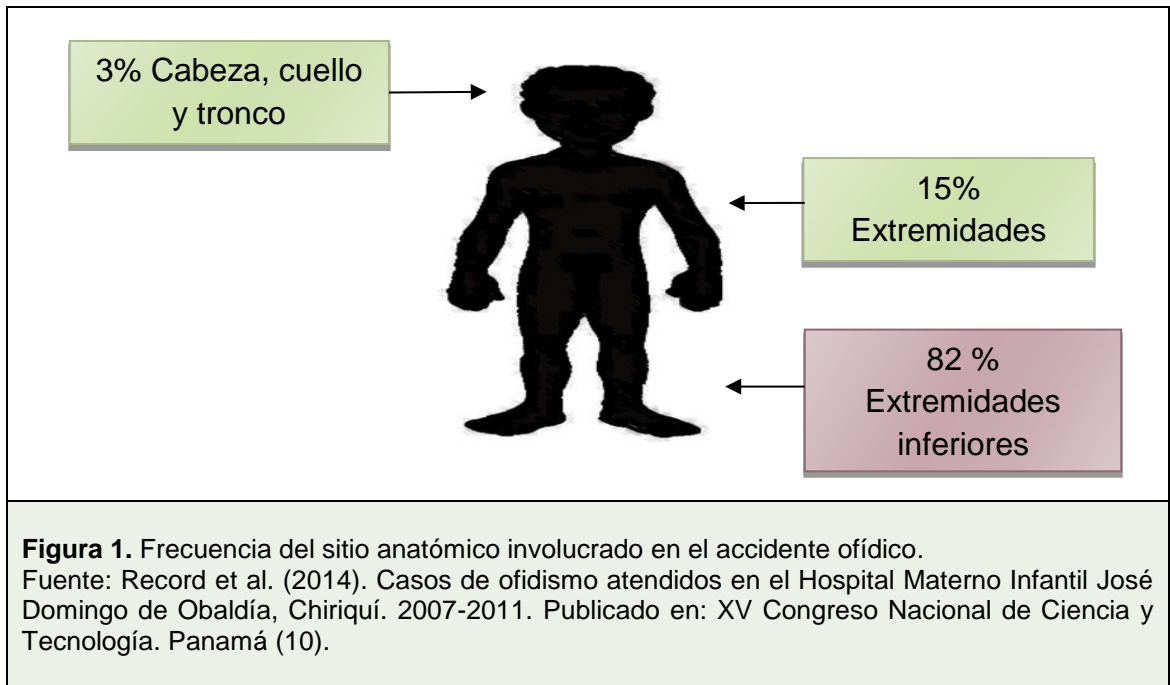
## **CAPITULO II: FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA**

## 2.1. Epidemiología del accidente ofídico

La epidemiología del accidente ofídico en América Latina cuenta con muchos vacíos por llenar, con problemas de registro, recolección y manejo de datos sobre todo en las regiones más apartadas y en las comunidades indígenas, en las cuales no se evalúa por completo la magnitud del problema incluyendo el impacto en la calidad de vida de los afectados que desarrollaron secuelas físicas y psicológicas como consecuencia del envenenamiento (13). La incidencia del envenenamiento por mordedura de serpientes, independiente de la especie involucrada, varía entre regiones de un mismo país, dependiendo de diversos factores como el clima, los parámetros ecológicos, la biodiversidad, la distribución de las serpientes venenosas, la densidad poblacional, las actividades económicas de cada región y el tipo de vivienda, entre otros (12).

Panamá registra la mayor incidencia de casos, no solo en Centroamérica sino de toda Latinoamérica, con un estimado de 1 300- 1 800 casos por año y una incidencia de 40-65 casos por cada 100 000 habitantes (19). Las provincias que presentan el mayor número de casos en los últimos 5 años han sido Chiriquí, Coclé y Veraguas, cada una con un promedio de más de 200 casos anuales según las estadísticas del Ministerio de Salud de Panamá. Esta cifra puede ser más alta, debido a que esta patología cuenta con un importante problema de subregistro, ya que afecta en su mayoría a población con poca accesibilidad a los sistemas de salud y por lo tanto, estos casos no entran en las estadísticas oficiales (1).

El accidente ofídico en Panamá afecta principalmente a trabajadores agrícolas, predominantemente varones adultos, a mujeres y niños residentes en zonas rurales (19). Con respecto a la edad, el grupo de 20 a 44 años es el más afectado con un 44%, seguido por adolescentes de 10 a 19 años con un 23% y los niños menores de 9 años con un 18%. Cabe mencionar que el número de accidentes ofídicos presenta un pico estacional en la época lluviosa que abarca de mayo a noviembre (9), quizás asociado al patrón reproductivo de la serpiente, la cual prefiere la época lluviosa lo que le asegura un mejor ambiente para sus crías además de ser una época donde los predadores de estas disminuyen (ej. halcones) (20). Con respecto al sitio anatómico afectado en más de un 82% de los casos se reporta que la mordedura fue en las extremidades inferiores, principalmente en pies (50%) y manos (30%), seguido por las extremidades superiores y en menor proporción se presentan casos con mordedura en cabeza, cuello y tronco (Ver **Figura 1**) (6,10). Otra perspectiva del problema es el desarrollo de secuelas permanentes físicas o psicológicas y la falta de seguimiento a los afectados (6).



Dentro de las regiones con la mayor vulnerabilidad al accidente ofídico causado por *B. asper* en Panamá, se identificó a las comarcas indígenas Emberá-Waunaan, Gnäbe- Buglé y a la provincia de Darién. De tal manera que los corregimientos con un índice muy alto de vulnerabilidad, se caracterizaron por registrar al menos 1 defunción en el período de estudio (2006-2007), con un 68% de su población dedicada a actividades agrícolas, 62% de etnia indígena, 6% de población afrodescendiente, 84% de los hogares con ingresos mensuales menores a US\$ 100.00 y además el 78% de la superficie de corregimiento es considerada como área de potencial presencia de *B. asper* (21).

Al igual que la incidencia y la severidad, la mortalidad del envenenamiento por mordedura de serpiente varía entre países y entre regiones del mismo país. Estas diferencias se deben a factores antropológicos, dificultades geográficas

para el traslado temprano del paciente al hospital, la disponibilidad del recurso terapéutico y programas de prevención primaria en zonas remotas con alta incidencia, la especie de serpiente que cause la mordedura y también la variabilidad intraespecie en la composición del veneno (relacionada a la edad, al tamaño, al sexo, a la dieta y a la distribución de la serpiente) (22).

En Centroamérica, la gran mayoría de serpientes que existen pertenecen a familias de especies no venenosas (8), sin embargo, existen dos familias de serpientes venenosas que abarcan las principales especies responsables de los envenenamientos en nuestra región; estas son la familia Elapidae (corales y serpiente marina) y la familia Viperidae (víboras). Panamá cuenta con 25 especies de serpientes venenosas distribuidas en estas dos familias, de las cuales el 88% de los casos se atribuyen a la familia Viperidae en especial a la especie *Bothrops asper* la cual representa el 72 % de todos los casos siendo la especie de mayor importancia médica en nuestro país (23,24). La OMS (Organización Mundial de la Salud) al evaluar el riesgo relativo de cada especie de serpientes, divide las especies más prevalentes en cada país en dos categorías principales para su manejo dentro de las directrices sobre la producción, el control y la regulación de los sueros antiofídicos lo cual se describe en la **Tabla 1**.

**Tabla 1.** Clasificación según la OMS de las especies de serpientes de mayor importancia médica en Panamá

### CATEGORIA 1

- La mas alta de importancia en salud publica
- Son serpientes muy venenosas que son comunes y causan numerosas mordeduras, lo que resulta en altos niveles de morbilidad, discapacidad o mortalidad.
- **En Panama: *Bothrops asper*.**

### CATEGORIA 2

- Importancia médica secundaria
- Altamente venenosas que pueden causar morbilidad, discapacidad o mortalidad, pero para la cual no existen datos epidemiológicos o clínicos registrados y/o están implicadas en menor frecuencia.
- **En Panama: *Atropoides* spp, *Atropoides mexicanus*, *Bothriechis* spp, *Bothriechis lateralis*, *Bothriechis schlegelii* , *Cerrophidion godmani*, *Lachesis acrochorda*, *Lachesis stenophrys*, *Porthidium nasutum*, *Porthidium lansbergii*, *Porthidium* spp.**

Fuente: World Health Organization (2010). Guidelines for the Production, Control and Regulation of Snake Antivenom Immunoglobulins (3).

Como parte del Programa Nacional de Ofidismo de Panamá, se han logrado avances en el estudio de la composición del veneno, de la neutralización por el antiveneno usado actualmente en nuestro país, así como estudios descriptivos retrospectivos con expedientes clínicos en los principales hospitales del país con el desarrollo del Sistema de notificación obligatorio del accidente ofídico. En Panamá se ha avanzado en la investigación del accidente ofídico y los aspectos básicos del veneno, actualmente se cuenta con bases de datos de los hospitales regionales para identificar variables de relevancia para el estudio del accidente ofídico y su atención de salud, siendo esto parte de los objetivos del proyecto

nacional de ofidismo dentro del cual, además se realizó la caracterización del veneno patrón de *B. asper* de Panamá empleado modelos experimentales in vitro e in vivo para evaluar los principales efectos; a saber: hemorrágico, hemolítico, desfibrinante, coagulante, proteolítico, edematizante, miotóxico y letal. El veneno patrón utilizado se conformó de venenos extraídos de 78 ejemplares adultos procedentes de las provincias de Panamá, Darién, Coclé, Los Santos, Veraguas, Chiriquí y Bocas del Toro (25).

## **2.2. Serpiente *Bothrops asper***

El género *Bothrops*, de la familia Viperidae, comprende cerca de 37 especies, las cuales se refiere la literatura como serpientes de cabeza en forma de lanza y fosetas loreales como termo-receptores (11), y cuerpo de gran tamaño (algunas especies pueden alcanzar hasta más de 200 cm de largo) (20). Siendo las especies principales *Bothrops asper*, *Bothrops atrox* y *Bothrops jararaca*. Dichas serpientes son las responsables de la gran mayoría de mordeduras en Centro y Sur América (26).

Las serpientes de la familia Viperidae se caracterizan por poseer un aparato inoculador (colmillos y glándulas) bien desarrollado, además de tener, entre los ojos y las fosas nasales, las fosetas loreales las cuales cumplen su función como termorreceptores. De esta familia, la serpiente *Bothrops asper*, conocida como “Terciopelo”, “Equis”, “Fer de lance” entre otros, es la responsable de la mayoría

de casos en Costa Rica, Nicaragua, Honduras, Panamá, Venezuela, Colombia (Región del Caribe, Pacífico y Andina) y Ecuador (22). Es una serpiente agresiva, que no rehúye al contacto humano y presenta una amplia distribución en territorios húmedos principalmente acoplados a zonas de agricultura, cerca de los trabajadores de las viviendas.



**Figura 2.** *Bothrops asper* adulta.

Fuente: Otero-Patiño R. (2014). Snake Bites in Colombia. [Figura 1]. Publicado en la revista Clinical Toxinology (22).

La especie *B. asper* es catalogada como la serpiente venenosa más peligrosa en el sur de México, en Centro América y en la parte Norte de Suramérica (11). Su nombre hace referencia a su distintiva foseta con sensor de calor en la región loreal y al aspecto de su piel áspera debido a las escamas gruesas en forma de

quilla en su región dorsal (del griego: bothros que significa fosa u ojos y del latín asper que significa áspero) (**Figura 2**). En general es una serpiente moderadamente grande, la cual posee un fuerte dimorfismo sexual ya que las hembras son significativamente más grandes (20). La coloración dorsal es marrón, oliva, gris a gris oscuro, mientras que el vientre es a menudo de color crema y puede presentarse sin marcas o con puntos oscuros. Presentan una característica línea postorbital que se extiende desde detrás del ojo hasta el ángulo de la boca y un patrón dorsal con una serie de 14 a 28 manchas triangulares oscuras con sus ápices hacia la línea vertebral, a lo largo de cada lado del cuerpo (**Figura 3**).



**Figura 3.** Características morfológicas de *Bothrops asper*.

**A.** Foseta loreal y línea postorbital característica. **B.** Posición de ataque y patrón de escamas dorsales con manchas triangulares. **C.** Especimen juvenil con terminación de la cola con fuerte coloración amarilla.

Fuente: Sasa M et al. (2009). Natural history of the terciopelo *Bothrops asper* (Serpentes: Viperidae) in Costa Rica.[Figura 1] Publicado en la revista Toxicon (20).

La serpiente *B. asper* prefiere ambientes húmedos, aunque está presente en la mayoría de zonas ubicadas en elevaciones bajas a medias, excepto en aquellos ambientes que tengan fuertes periodos estacionales secos. En bosques secos, esta especie se mantiene principalmente restringida a las vegetaciones cerca de ríos que pueden servirles como refugio para los largos periodos secos. La dieta de dicha serpiente es un reflejo del oportunismo, consumiendo una gran variedad de tipos de presas como roedores y aves. Para las serpientes juveniles se describen como sus principales presas: ciempiés, lagartijas, serpientes y peces. Respecto a su actividad diurna y nocturna, se ha observado que se trata de serpientes principalmente activas de noche y completamente inactivas en el día (20).

### **2.3. Características del veneno de *Bothrops asper***

El veneno de serpiente es una mezcla compleja de toxinas; es producido por un par de glándulas exocrinas especializadas conectadas con los colmillos a través de ductos (27). El veneno de los vipéridos, es una secreción viscosa de color amarillo o incoloro formado por enzimas, proteínas y polipéptidos no enzimáticos que sirven para iniciar la digestión de los tejidos de la presa. El veneno está constituido por más de 50 sustancias que incluyen: hemorraginas, miotoxinas, fosfolipasa A<sub>2</sub>, proteasas, inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina, kalicreína, metaloproteinasas que interfieren principalmente con la cascada de

la coagulación, el sistema hemostático normal y la reparación de tejidos (15). Esta naturaleza heterogénea de la composición fue evidenciada al asociarse a una gran variedad de efectos biológicos demostrados *in vitro* e *in vivo* a nivel experimental y clínico. Al principio se creía que un efecto específico podía ser atribuido a una sola proteína, si bien, ahora se sabe que no siempre es un principio válido, ya que se ha visto que puede haber efectos que son causados por dos o más toxinas actuando en combinación, de forma sinérgica. Por otra parte se ha comprobado también que una toxina puede desempeñar múltiples funciones en los efectos globales del envenenamiento (27). Los análisis proteómicos han revelado la presencia de 8 familias de proteínas en el veneno de *B. asper*, las cuales se describen en la **Tabla 2**.

<b>Tabla 2.</b> Familia de proteínas descritas en el veneno de <i>B. asper</i> .	
<b>Familias de Proteínas</b>	<b>Proporción</b>
Metaloproteinasas	(41-44%)
Fosfolipasas A <sub>2</sub>	(29-45%)
Serina Proteinasas	(4-18%)
L-aminoácido oxidasas	(5-9%)
Desintegrinas	(1-2%)
Proteínas parecidas a lectina tipo C	(0.5%)
Proteínas secretoras ricas en cisteína	(0.1%)
Fragmentos DC	(0.1%)

Fuente: Alape-Girón et al. (2008). Snake Venomics of the Lancehead Pitviper *Bothrops asper*: Geographic, Individual, and Ontogenetic Variations publicado en la revista Proteome (15).

Como ocurre en otras especies de vipéridos, el veneno de *B. asper* contiene una porción significativa de las enzimas **fosfolipasas A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>)**, que pueden clasificarse según sus propiedades en ácidas y básicas (15). Dentro de las PLA<sub>2</sub> ácidas, se encuentran la PLA I y PLA II, con aproximadamente una masa molecular de 32 kDa y 16 kDa, respectivamente. Ambas presentan actividad letal en las pruebas in vivo. Se conoce que estas enzimas ácidas pueden presentar efectos principalmente sobre la agregación plaquetaria y la miotoxicidad (27). Por otra lado, las PLA<sub>2</sub> básicas, son las proteínas más abundantes en el veneno de *B. asper* y se han aislado numerosas isoformas (15), todas ellas han demostrado daño en el tejido músculo esquelético con tan solo minutos después de inyectarlas de forma intramuscular en el ratón. Este grupo de proteínas ha recibido el nombre común de miotoxinas PLA<sub>2</sub>, las cuales se ha visto que pueden ser neutralizadas por el uso de anticuerpos específicos anti-miotoxinas anulando casi todo el daño muscular inducido por el veneno completo de la especie *B. asper*, por lo que indica que estas toxinas son los principales componentes responsables de dicho efecto (28). La caracterización bioquímica y la determinación de la secuencia de aminoácidos revelaron que estas proteínas básicas, pertenecen a dos subgrupos distintivos. El primero es el subgrupo Asp49 PLA<sub>2</sub> que incluye isoformas que son catalíticamente activas, mientras el segundo subgrupo que son los homólogos Lys49 PLA<sub>2</sub> no presenta dicha actividad enzimática. De las miotoxinas aisladas en el veneno de *B. asper* las miotoxinas I y III son isoformas Asp49, mientras que las miotoxinas II y IV son miembros del subgrupo homólogo LYS49 (27).

La familia de las **metaloproteinasas (SVMPs)** son proteínas dependientes de zinc y se encuentran de forma abundante en el veneno de serpiente. Se clasifica en 4 grupos estructurales, desde P-I a P-IV respecto a lo básico de la composición de su dominio. En el veneno de *B. asper* se ha demostrado la presencia de los primeros tres grupos, sin embargo solo el grupo P-I y P-III han sido representativos (15,27). En el grupo SVMP P-III al principio se describió 3 toxinas llamadas BaH1, BH2 y BH3 que en pruebas de laboratorio, evidenciaron tener actividad hemorrágica. Luego aislaron la BaH4, otra metaloproteinasa con actividad hemorrágica, demostrando que al inyectarse por vía intravenosa causa una prominente hemorragia pulmonar llevando a la muerte, por lo que se sugiere que la BaH4 juega un papel relevante en la toxicidad sistémica en el envenenamiento bothrópico. De este mismo grupo, la proteína aislada más recientemente ha sido la Basparina A, la cual presenta activación protrombótica con inhibición de la agregación plaquetaria in vitro, causando desfibrinación y trombosis en el ratón (27). Posteriormente en el grupo SVMP P-I aislaron la metaloproteinasa BaP1, una proteína de 23 kDa con gran actividad proteolítica, la cual se ha asociado a un papel predominante en la fisiopatología local, causando leve hemorragia y una miotoxicidad moderada (29,30).

La familia de las **serina proteinasas** que componen el veneno de *B. asper* son proteínas que han demostrado poseer actividad parecida a la trombina. La primera serina proteinasa aislada fue la Asperasa, con un peso molecular de 30 kDa desempeñando un papel menor en la trombosis con respecto a la Basparina

A. En esta familia se ha encontrado variaciones según edad y distribución geográfica en serpientes de la misma especie (15,22).

De la familia **L-aminoácido oxidasas** se han aislado tres isoformas con peso molecular similar de 125 kDa, aún no se le atribuye actividades biológicas o perfiles de toxicidad a estas proteínas. La familia de las toxinas **parecidas a lectina tipo C** cuenta con la proteína aspercetina aislada en veneno de *B. asper* a la cual se le atribuye que es un potente agente activador de la agregación plaquetaria, con posterior trombocitopenia, prolongando el tiempo de coagulación y potenciando la actividad hemorrágica de las metaloproteinasas, lo que sugiere que es una proteína involucrada significativamente en los efectos hemorrágicos prominentes del envenenamiento bothrópico (27). Las **Desintegrinas** son polipéptidos no enzimáticos ampliamente distribuidos en los venenos de vipéridos, la proteína más conocida es la Bothrasperina la cual se sugiere que inhibe la agregación plaquetaria (15). En la **Tabla 3** se resumen las principales proteínas y las actividades tóxicas que se le atribuyen (27).

**Tabla 3.** Proteínas más relevantes descritas en el veneno de *B. asper*.

Familia de la proteína	Propiedades	Nombre de la toxina (Peso molecular)	Actividad tóxica asociada				
<b><u>Metaloproteinasas (SVMP)</u></b>	Básicas	BaP1 (23 kDa)	Actividad proteolítica Hemorrágica leve localizada Miotoxicidad Dermonecrosis Edema				
		BaH1 (64 kDa) BH2 (26 kDa) BH3 (55 kDa) BaH4 (69 kDa)	Actividad hemorrágica				
<b>Grupo P-III (P-III SVMP)</b>	Ácidas	Basparina A (70 kDa)	Agregación plaquetaria (Inhibición) Actividad desfibrinante Actividad protrombótica				
<b><u>Fosfolipasas (PLA<sub>2</sub>)</u></b>	Ácidas	PLA I (32 kDa) PLA II (16 kDa)	Letalidad, Agregación plaquetaria (Inhibición) Miotoxicidad				
	Básicas	Miotoxinas <sup>†</sup>	<table border="0" style="width: 100%;"> <tr> <td style="text-align: center;">PLA<sub>2</sub> Asp49</td> <td style="text-align: center;">Miotoxina I Miotoxina III</td> <td rowspan="2" style="border-left: 1px solid black; padding-left: 10px;">Daño local a tejido musculo esquelético</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">PLA<sub>2</sub> Lys49</td> <td style="text-align: center;">Miotoxina II Miotoxina IV</td> </tr> </table>	PLA <sub>2</sub> Asp49	Miotoxina I Miotoxina III	Daño local a tejido musculo esquelético	PLA <sub>2</sub> Lys49
PLA <sub>2</sub> Asp49	Miotoxina I Miotoxina III	Daño local a tejido musculo esquelético					
PLA <sub>2</sub> Lys49	Miotoxina II Miotoxina IV						
<b><u>Serina proteinasas</u></b>	Ácidas	Asperasa (30 kDa) Parecida a la trombina (27 kDa)	Actividad coagulante				
<b><u>L-amino acido oxidasa</u></b>	Ácidas	Lao 1 (125 kDa) Lao 2a (125 kDa) Lao 2b (125 kDa)	No actividad biológica atribuida				
<b><u>Desintegrinas</u></b>	Ácidas	Bothrasperina (8 kDa)	Agregación plaquetaria (inhibición)				
<b><u>Proteínas parecidas a la lectina tipo-C</u></b>	Ácidas	Aspercetina (30 kDa)	Agregación plaquetaria (activación), trombocitopenia, potencia actividad hemorrágica por SVMPs				

<sup>†</sup> Son las PLA<sub>2</sub> más abundantes.

Fuente: Angulo y Lomonte (2009). Biochemistry and toxicology of toxins purified from the venom of the snake *Bothrops asper*. Publicado en *Toxicon* (27).

#### **2.4. Variación intraespecie del veneno**

La variabilidad de los venenos de serpientes fue observada por primera vez en los casos clínicos en la antigüedad y su variabilidad se atribuía a factores naturales exógenos. Aristóteles creía que el calor era el factor predisponente en aumentar la toxicidad del veneno de las víboras cuando comparaba el envenenamiento por víboras en Grecia y en el Norte de África, pero no describía de qué especies se trataba. En tiempos modernos, inicialmente se comenzó a estudiar la variabilidad del veneno de serpiente en cuanto a su toxicidad y reacción cruzada como un esfuerzo para dilucidar las relaciones filogenéticas de estas. Sin embargo, la variabilidad del veneno ha demostrado tener muchas más implicaciones (5).

Cada población de serpientes tendrá sus requerimientos particulares para la acción del veneno y la mezcla proporcional de toxinas que serán al menos determinadas por el tipo de presa que busca, para así lograr el resultado final que es el matar la presa o digerirla. Los venenos pueden contener una mezcla de diferentes actividades tóxicas como lo son la actividad miolítica, coagulante, hemorrágica entre otras. Conocer las combinaciones de actividades dentro de los venenos y el uso de métodos experimentales desarrollados para identificar estas actividades, por ejemplo a través de técnicas inmunológicas, químicas y tóxicas, con un correcto análisis estadístico de tales observaciones, ha permitido la determinación del nivel de variaciones de veneno y sus orígenes. La

importancia de estos estudios es obvia, en la terapéutica, el conocimiento de la variabilidad intraespecífica permitirá un tratamiento más eficaz para las víctimas por mordedura de serpiente, beneficiando a las víctimas de localidades específicas al recibir un antiveneno adecuado. Por lo que la producción de antiveneno depende del conocimiento de la variabilidad de los venenos dentro y entre localidades específicas en un país, ya que cuando se preparan las fracciones farmacológicas activas en base al veneno crudo, es esencial que el veneno que se escoja sea rico en el componente de interés que se quiere neutralizar. Por lo tanto, el conocimiento de la distribución de las toxinas dentro de las especies y sus distintas localidades geográficas es esencial para el éxito de la producción de antiveneno. Estas variaciones en las propiedades del veneno pueden traer como consecuencia diferentes sintomatologías en el envenenamiento generado por una misma serpiente o, en el peor de los casos, la ineficacia del antiveneno en neutralizar los efectos del envenenamiento (5).

El análisis proteómico del veneno de serpiente en otras latitudes han demostrado complejos patrones en la variación ontogenética (Con veneno de especímenes juveniles y adultos) no solo entre especies sino también entre una sola especie, particularmente en aquellas que cuentan con una amplia distribución geográfica. La variación a este nivel aporta a la evidencia de que la composición del veneno está bajo control genético (5,15). La variación intraespecie se ha descrito para diferentes serpientes sin que varíe la morfología de la misma, dicha diferencia se atribuye a las condiciones geográficas, edad,

hábitos alimenticios y cambios estacionales (5). Por ejemplo, en Costa Rica, las diferencias en la composición proteica del veneno de especímenes del Caribe y del Pacífico ha sido estudiada, encontrando que los especímenes de *B. asper* que habitan en la vertiente del Caribe de Costa Rica muestran una producción de veneno que es más hemorrágico y miotóxico que los especímenes que habitan la vertiente del pacífico, los cuales muestran una actividad proteolítica más alta (17). Al realizar la caracterización proteómica de cada zona geográfica encontraron grados de variabilidad en varias familias de proteínas como las desintegrinas, las fosfolipasas  $A_2$  (PLA<sub>2</sub>), las serina proteinasas, las lectinas tipo C, las proteínas secretoras ricas en cisteína (CRISPs), L-aminoácido oxidasas (Lao) y las metaloproteinasas (SVMPs) como es el caso de la proteína BaP1 (15).

Otra variación ontogenética reportada es entre especímenes neonatos caracterizados por una proporción alta en las metaloproteinasas del grupo P-III (P-III SVMPs) mientras que en especímenes adultos se encuentra una alta proporción es en las metaloproteinasas del grupo P-I (P-I SVMPs) y en homólogos de Lys49 PLA<sub>2</sub>. Este fenómeno parece estar asociado a los hábitos alimenticios debido a que los especímenes juveniles se alimentan más de ranas y lagartijas en comparación a los adultos cuya alimentación es principalmente pequeños mamíferos (15). Estas variaciones en la composición proteica del veneno tienen implicaciones en las manifestaciones clínicas del envenenamiento. Al tener, el veneno de especímenes adultos, mayor contenido

en la PLA<sub>2</sub> y en P-I SVMPs, involucra que existe un riesgo mayor de envenenamiento grave con dermonecrosis y mionecrosis que con especímenes juveniles (22).

El impacto de la variación regional en la composición del veneno de las serpientes se debe tener en cuenta tanto para el diseño del suero antiofídico como para la selección y adquisición del suero antiofídico producido por otros países de la región. Esta variabilidad puede afectar la actividad neutralizante de los antivenenos y demanda el uso de diferentes venenos en la preparación de la mezcla antigénica para así poder cubrir el espectro de la diversidad del veneno de las serpientes con mayor relevancia médica (3).

A pesar de la variabilidad, se ha descrito que diferentes antivenenos tienen la capacidad de neutralizar no solo venenos homólogos si no también venenos heterólogos de otras especies relacionadas, fenómeno inmunológico que se conoce como reactividad cruzada (31). Solo un análisis preclínico cuidadoso de la reactividad cruzada y la neutralización cruzada de los antivenenos, nos orienta con certeza a la capacidad de cada antiveneno para neutralizar los efectos tóxicos de venenos de serpientes homólogos y heterólogos relacionados. En países, donde no se tiene producción local de antiveneno, como es el caso de Panamá, se debe rigurosamente evaluar los perfiles de neutralización cruzada del antiveneno importado para garantizar la efectividad en la neutralización de los venenos de las especies de mayor importancia médica en el país (32).

El estudio de la variabilidad en la composición del veneno de serpiente agrega conocimiento importante a diferentes áreas de estudio, como biología, farmacología, bioquímica, medicina y toxicología, generando bases científicas para la evaluación del antiveneno que se utiliza en el país (19).

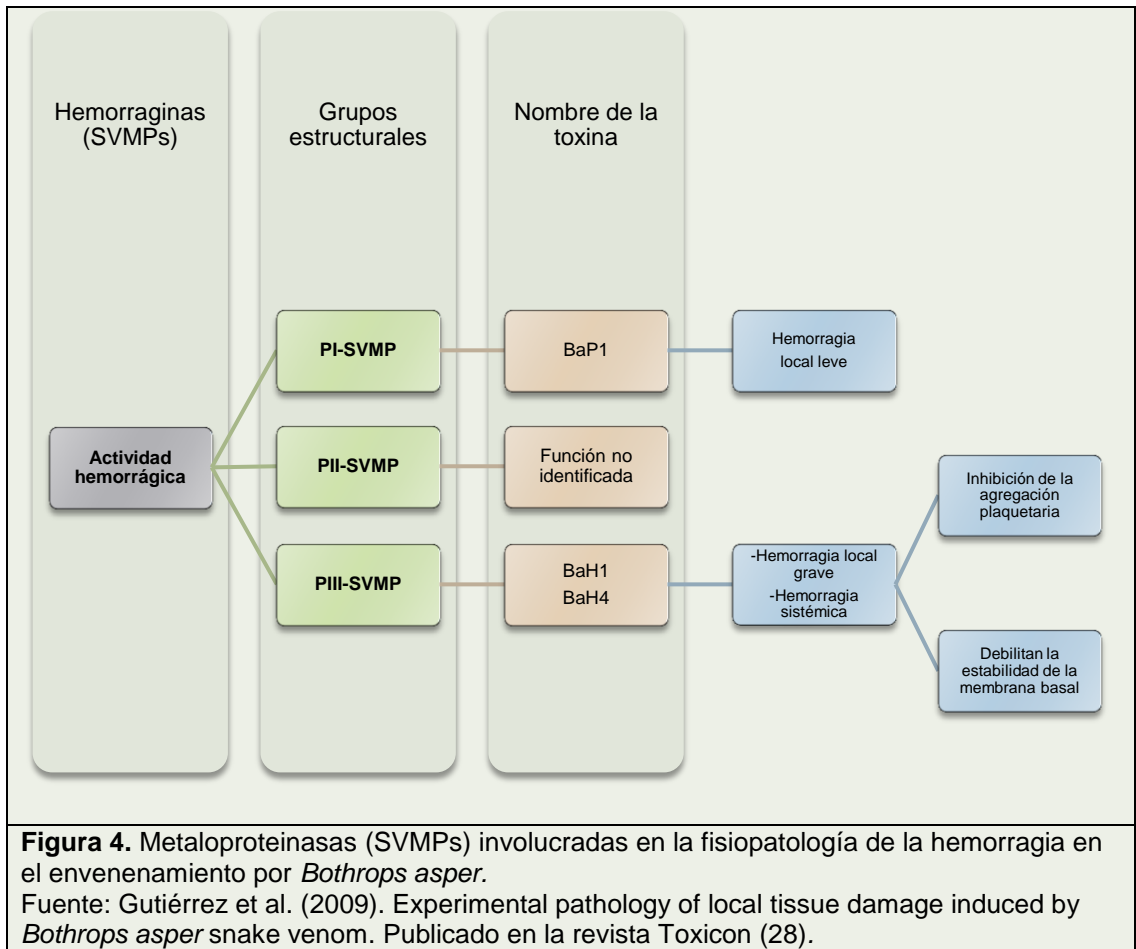
## **2.5. Fisiopatología del envenenamiento por *Bothrops asper***

Las toxinas que presentan mayor importancia en el envenenamiento humano, contenidas en el veneno de *B. asper*, afectan principalmente a nivel sistémico, la hemostasia, causando cuadros de desfibrinación, hemorragia, coagulación intravascular diseminada y trombocitopenia que pueden llevar a la muerte (29,33). A nivel local son capaces de producir daño tisular con edema, miotoxicidad y ampollas que en conjunto pueden llevar a necrosis de tejidos blandos causando disfunción o amputación de la extremidad afectada. Dichos efectos pueden ser el resultado de la acción de: una sola toxina responsable de una alteración específica o de que varias toxinas actúen en sinergia o a que una sola toxina posea múltiples efectos tóxicos (28,34).

### **2.5.1. Hemorragia**

El sangrado sistémico es una de las manifestaciones clínicas más severas en los envenenamiento por mordedura de *B. asper* en humanos. La hemorragia puede

afectar varios órganos, siendo la responsable de la hipovolemia, hipotensión, la hipoperfusión tisular, el shock cardiovascular y los accidentes cerebrovasculares presentados en los pacientes (35). Se han identificado que las proteínas más involucradas en la fisiopatología de la hemorragia son las metaloproteinasas las cuales son los componentes con mayor potencia hemorrágica en el veneno. Se ha descrito que las P-I SVMPs contribuyen más a la hemorrágica local, en el sitio de la mordedura, siendo lo opuesto para las P-III SVMPs la cual se ha visto que tiene mayor potencia y capacidad de inducir sangrado sistémico probablemente por contar con dominios capaces de unirse a objetivos relevantes en la matriz extracelular o en las células endoteliales, además de ser pobremente inhibida por los mecanismos de hemostasia y tener la capacidad de inhibir la agregación plaquetaria, efecto del cual carece el grupo P-I SVMPs (ver **Figura 4**).



Al evaluar la capacidad hemorrágica de forma experimental con SVMPs aisladas, se ha observado el mismo efecto que con el veneno crudo, lo cual indica que las metaloproteinasas son un requerimiento absoluto para inducir el efecto hemorrágico, afectando directamente a las células endoteliales de los capilares, arterias y arteriolas además de debilitar la estabilidad de la membrana basal al hidrolizar parte de los componentes que forman dicha membrana (28).

### 2.5.2. Alteraciones de la hemostasia

La desfibrinación, que altera consecuentemente las pruebas de laboratorio como tiempos de coagulación alargados y una drástica disminución en la concentración de fibrinógeno con aumento de sus productos de degradación, como consecuencia de la activación del sistema fibrinolítico, es descrita comúnmente en los pacientes mordidos por serpientes de la familia Viperidae.

Se han detallado dos enzimas presentes en el veneno de *B. asper* como las responsables de la desfibrinación: la **asperasa**, la cual pertenece a la familia de serina proteinasas parecidas a la trombina y la **basparina A**, del grupo estructural P-III SVMPs que activa la protrombina siendo la proteína con mayor importancia en el efecto desfibrinante y procoagulante descritas para el veneno de *B. asper* (15). En estudios a nivel experimental se ha observado que la inyección intravenosa de ambas proteínas puede variar dependiendo de la dosis. A dosis altas, estas enzimas producen una muerte rápida probablemente al inducir una coagulación intravascular diseminada. Por otro lado, a dosis subletales, en ensayos experimentales in vivo, los animales desarrollan desfibrinación con caída de los valores sanguíneos de fibrinógeno (34).

En los pacientes con envenenamiento bothrópico, se ha observado una disminución importante en el conteo plaquetario, efecto principalmente atribuido a la **aspercetina** de la familia de proteínas parecidas a lectina tipo C al inducir la activación de la agregación plaquetaria dependiente del factor von Willebrand

obteniendo como resultado una trombocitopenia trombótica, con formaciones de pequeños agregados plaquetarios que quedan atrapados en la microcirculación y como consecuencia potencian el sangrado sistémico. Las SVMPs también contribuyen en menor medida a la trombocitopenia debido al daño que generan en la microvasculatura promoviendo allí la agregación y secuestro de plaquetas. Además se ha observado también la capacidad de algunas proteínas del veneno de disminuir la agregación plaquetaria, posiblemente debido al consumo del fibrinógeno, disminuyendo sus interacciones con las plaquetas o debido a que los productos de degradación del fibrinógeno bloqueen estas interacciones (34).

### **2.5.3. Edema**

El edema local acompañado con el dolor aparece rápidamente después de la inyección del veneno de *B. asper* en animales de experimentación. En este tipo de ensayos se observa que a dosis bajas el pico mayor de edema se presenta a la hora y posteriormente comienza a disminuir. Sin embargo, a dosis altas el edema persiste por más tiempo. Probablemente esto refleje diferentes mecanismos en la génesis del edema. La fisiopatología de la formación del edema inducido por el veneno de *B. asper* es multifactorial, existe un daño directo en la microcirculación a través de la acción de toxinas hemorrágicas con la consecuente extravasación. Además, el edema se presenta por la acción de mediadores inflamatorios liberados o sintetizados en el curso del

envenenamiento, como lo son las prostaglandinas, el óxido nítrico, entre otros, los cuales inducen un incremento en la permeabilidad vascular en la microcirculación (28).

#### **2.5.4. Miotoxicidad**

Tanto en animales de experimentación como en la clínica, se ha observado el prominente daño local a nivel muscular que causa el veneno de *B. asper* que se evidencia con alteraciones histopatológicas del músculo y el aumento de la actividad plasmática de enzimas derivadas del músculo como lo es la creatina quinasa (CK). La CK o CPK (Creatina Kinasa o Creatina Fosfoquinasa) es una enzima intracelular localizada en mayor proporción en músculos cardíaco y esquelético y en menor proporción en cerebro. Un aumento en la actividad sérica, es por lo tanto indicio de lesión celular principalmente a nivel muscular. La fosfolipasa A<sub>2</sub> y sus homólogas son los principales compuestos miotóxicos de dicho veneno, las cuales de forma rápida y drástica generan una perturbación de la integridad del sarcolema con consecuente disrupción de la membrana plasmática y pérdida del control de la permeabilidad al calcio. El mecanismo por el cual las miotoxinas del veneno de *B. asper* alteran la integridad de la membrana plasmática de las células musculares no se conoce al día de hoy (28).

En 1984, Gutiérrez y colaboradores aislaron la primera PLA<sub>2</sub> del veneno de *B. asper*, la cual llamaron “Miotoxina de *B. asper*” asumiendo que su principal actividad era la citotoxicidad sobre las fibras musculares. Sin embargo, estudios recientes evidenciaron todas las PLA<sub>2</sub> presentes en este veneno, muestran un perfil citotóxico más amplio, afectando a diferentes tipos de células. Sin embargo, las células musculares maduras y las miofibrillas son las de mayor susceptibilidad a estas toxinas. Estas miotoxinas presentes en el veneno de *Bothrops asper* y otras serpientes de dicho género son principalmente miotoxinas de efecto local en el sentido que la inyección intramuscular resulta en necrosis de los músculos localizados cerca del sitio de inyección, con muy poca acción en los músculos distantes. Se ha observado que la inyección intravenosa de estas sustancias a nivel experimental resultan en un ligero incremento en la actividad plasmática de la CK (28). Lo que se correlaciona con la clínica de los envenenamiento por estas especies, que resultan en una prominente mionecrosis local pero no se presentan signos de miotoxicidad sistémica (36).

Al incubar el veneno de *B. asper* con los anticuerpos policlonales contra PLA<sub>2</sub> miotóxica, se reduce la actividad miotóxica del veneno en aproximadamente un 70%, confirmando el papel protagónico de estas moléculas en la mionecrosis. Sin embargo, el hecho de que existe un 30% de daño muscular en estas condiciones revela otro componente que contribuye al daño muscular agudo. A nivel experimental se ha demostrado que las SVMPs hemorrágicas causan mionecrosis como lo son las **BaH1** y **BaP1**. Este mecanismo por el cual las

SVMPs hemorrágicas producen mionecrosis no está claramente descrito, sin embargo, se puede pensar que ellas promueven el daño muscular secundario a la isquemia resultante de la acción de las SVMPs en la microvasculatura. El incremento demostrado en los niveles de ácido láctico después de la inyección con BaH1 y la falta de miotoxicidad a nivel in vitro de esta enzima en preparaciones de músculo en condiciones con buen suministro de oxígeno apoyan esta hipótesis (28).

#### 2.5.5. Letalidad

A pesar de que la letalidad es alta en el accidente ofídico, al día de hoy no se tienen claros los mecanismos o la identificación de las toxinas responsables. A nivel experimental, se ha observado que al usar la ruta intravenosa, se provoca la muerte en forma rápida, en un minuto o menos, ya sea por una masiva coagulación intravascular o debido a un efecto hemorrágico diseminado. Las proteínas del veneno de *B. asper* que corresponden a este efecto son principalmente las toxinas P-III SVMPs. Sin embargo, al utilizar a nivel de laboratorio, inhibidores de esta familia de proteínas, no se logra abolir el efecto letal del veneno, y esto debido a que otras proteínas juegan un papel importante en esta fisiopatología, como es el caso de la **asperasa**, de la familia de serina proteinasas involucradas en el efecto coagulante del veneno. Sin embargo, aún no se ha logrado identificar otros componentes del veneno que aunque estén en

menor cantidad puedan influir en el efecto letal. Al usar la ruta intraperitoneal, no se sabe exactamente las toxinas responsables de este efecto, pero si se ha observado una prominente hemorragia peritoneal que sugiere exudado y hemorragia que pueden llevar a un colapso cardiovascular, lo que puede ser la clave del mecanismo letal en este modelo experimental. Por otro lado, las toxinas coagulantes no parecen jugar un papel importante en la letalidad al usar esta ruta de administración (34).

## **2.6. Aspectos clínicos del accidente ofídico**

Estos venenos originan un complejo cuadro clínico, caracterizado por sintomatología local inmediata y, en los casos moderados y severos, por manifestaciones sistémicas diversas. La severidad de estos envenenamientos es muy variable, su correcta evaluación y clasificación clínica son elementos fundamentales para decidir el abordaje terapéutico más adecuado.

### **2.6.1. Diagnóstico**

El diagnóstico de accidente ofídico se puede establecer por tres métodos: el primero es el **diagnóstico etiológico**, en donde se identifica la serpiente agresora, sin embargo son pocos los pacientes que llevan la serpiente hasta el hospital. El segundo es el **diagnóstico inmunológico**, determinado por la concentración de antígenos circulantes de veneno en líquidos corporales como

sangre, orina o contenido de las flictenas, usualmente a través de un inmunoensayo (ELISA) disponible sólo en forma experimental en nuestros países latinoamericanos. Por último, y el más utilizado, el **diagnóstico clínico**, el cual es el más práctico, donde se clasifica la gravedad del envenenamiento, aunque solo permite establecer su clasificación por familia de serpiente (Ejemplo, envenenamiento por vipéridos, envenenamiento elapídico) Para establecer dicho diagnóstico se requiere realizar una historia clínica completa con los detalles que rodearon el accidente, tiempo de evolución, signos y síntomas, tratamientos tradicionales recibidos, acompañado de un buen examen físico y exámenes paraclínicos acordes al envenenamiento (37).

Clínicamente, el envenenamiento se clasifica en ausencia de envenenamiento, envenenamiento leve, envenenamiento moderado y envenenamiento grave. Para dicha clasificación, se agrupa la sintomatología (Ver **Figura 5**) en **signos locales** cuyo signo clásico es el edema, acompañado de hemorragia local o equimosis, flictenas y necrosis y en **signos sistémicos**, cuyo signo clásico es la defibrinación (se presenta como alteraciones de los tiempos de coagulación) acompañada principalmente de trombocitopenia, gingivorragia, hematuria, hipotensión y otras hemorragias tales como hematemesis, epistaxis, hemoptisis, enterorragia, hemorragia vaginal y hemorragia del Sistema Nervioso Central (SNC) principalmente intracraneana (12).

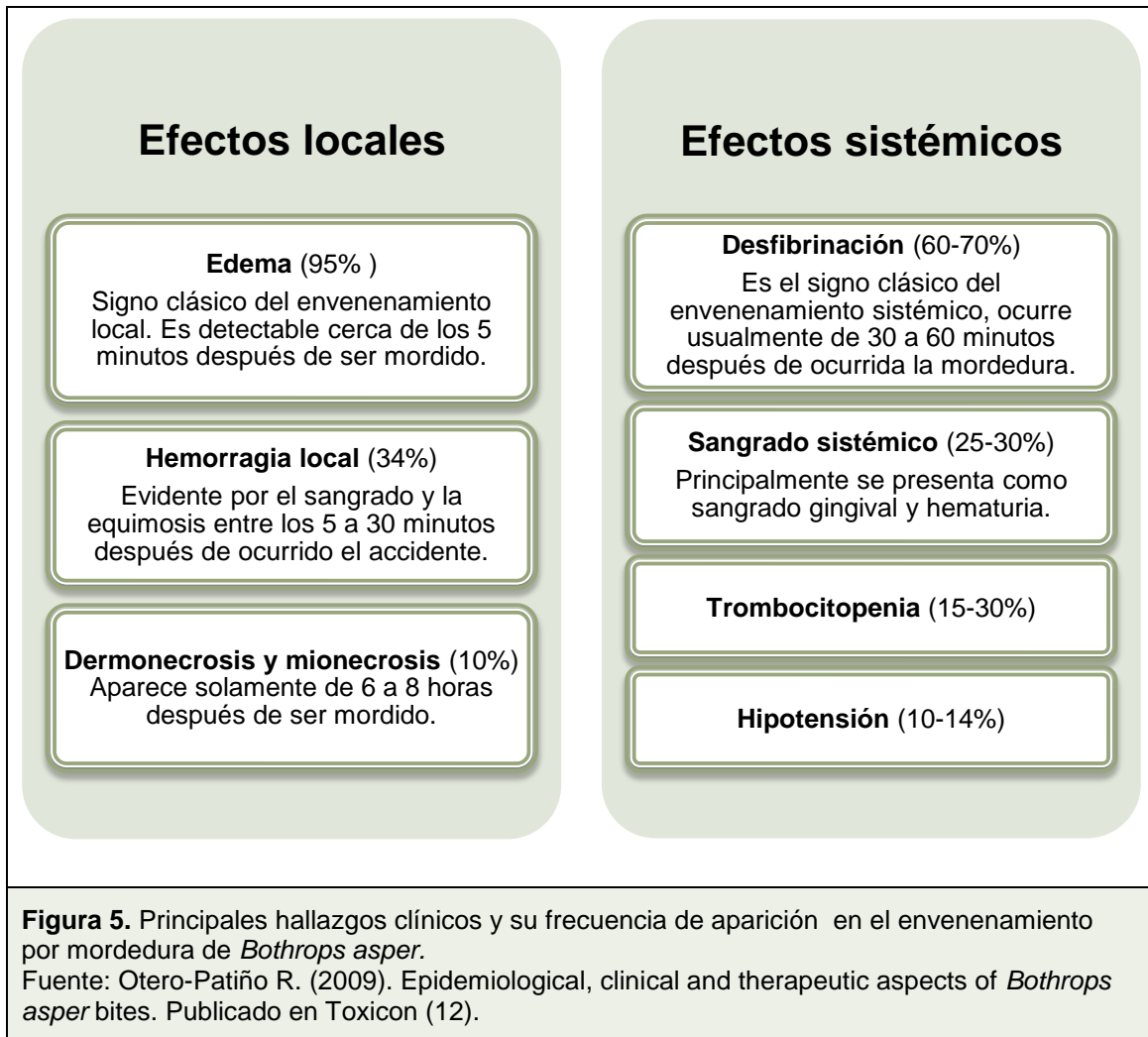
El diagnóstico de accidente ofídico con **ausencia de envenenamiento** se caracteriza por un cuadro de mordedura de serpiente sin signos locales ni

sistémicos. El **envenenamiento leve** lo definirá la intensidad y extensión del edema y la presencia de necrosis, definiéndose como la presencia de edema en 1 o 2 segmentos, aumento del perímetro de la extremidad menor de 4 cm, equimosis, hemorragia escasa en el sitio de la mordedura, usualmente sin ampollas ni necrosis y no presenta signos sistémicos. Con respecto al envenenamiento moderado y severo, son los trastornos de la coagulación, las hemorragias y la presencia de complicaciones que amenazan la vida (choque, lesión de órganos vitales), los que definen el grado de envenenamiento sistémico. En el **envenenamiento moderado**, se presenta edema en 2-3 segmentos, hemorragia local activa, a veces ampollas, no necrosis y con presencia de sintomatología sistémica sin alteración hemodinámica. En el **envenenamiento grave**, se presenta edema de toda la extremidad que se extiende a tronco, también se catalogan como graves las mordeduras en cabeza, cuello, tórax, abdomen y genitales, con sintomatología sistémica caracterizada por hipotensión, choque, hemorragia en SNC o falla multisistémica (37).

En el accidente ofídico por *B. asper*, 36% de todos los pacientes presentarán sintomatología local sin manifestaciones sistémicas, mientras que en los envenenamientos moderados un 45% presentarán un envenenamiento local moderado y envenenamiento sistémico moderado en un 25%. Con respecto a los envenenamientos graves 15% de los pacientes presentan envenenamiento

sistémico grave y 10% envenenamiento local severo (necrosis, edema que se extiende hasta el tronco, mordeduras en cabeza, cuello y tronco) (12).

Se debe realizar una rápida clasificación de la severidad del evento y evaluar las manifestaciones sistémicas que permitan un abordaje terapéutico temprano, sin olvidar que un accidente inicialmente clasificado como leve puede progresar a severo en un lapso de horas. Igualmente, debe disponerse de una buena historia clínica que incluya: tiempo transcurrido desde la mordedura, tamaño de la serpiente, tiempo de evolución de los síntomas y medidas tomadas hasta el momento, debe realizarse un examen físico completo, enfocado hacia los parámetros necesarios para determinar el grado de severidad, como lo son la magnitud del edema, compromiso del tronco, cara o cuello, necrosis, hemorragia local o a distancia y compromiso sistémico (22).



La severidad del envenenamiento dependerá de factores inherentes al paciente, a la serpiente o al lugar o situación donde ocurra, como pueden ser:

- El volumen de veneno inoculado: Un espécimen adulto de *B. asper* puede inocular aproximadamente 3 mL por mordida lo que equivale aproximadamente a 1750 mg/mL de sustancias activas.
- El sitio anatómico afectado: mordeduras en la cabeza o en el tronco tienden a ser más complicadas que cuando son en pies o manos.

- El tamaño y la condición fisiológica de la víctima: Mordeduras en niños son más serias que en los adultos.
- El lapso de tiempo entre la mordedura y la atención médica: Se considera apropiado un lapso no mayor de 6 horas posteriores a la mordedura (8).

### 2.6.2. Exámenes paraclínicos

Los exámenes paraclínicos son de gran apoyo para evaluar de forma temprana el envenenamiento sistémico ayudando en la determinación de la severidad del cuadro junto a la clínica del paciente. De acuerdo a la dependencia de salud, su nivel y la disponibilidad de recursos, en donde llegue la víctima, es que el médico puede conocer que pruebas de laboratorio pedir con pertinencia. En la **Tabla 4** se enlistan los principales exámenes paraclínicos a realizar en el paciente con envenenamiento bothrópico y la frecuencia de aparición de las alteraciones de laboratorio (22).

### 2.6.3. Complicaciones

Las principales complicaciones del envenenamiento por *B. asper* son:

**Infección de tejidos blandos (11-30%):** Caracterizado por presentarse, en el sitio de la mordedura, como impétigo, celulitis, abscesos, fascitis, predominando la celulitis y el absceso causados por bacilos gram negativos como *Morganella*

*morganii*, *Proteus rettgeri*, *Klebsiella spp.*, *Enterobacter spp.*, *Aeromonas hydrophila*, y *Staphylococcus aureus*. La infección puede ocurrir principalmente en el envenenamiento local moderado/severo que puede cursar con extensión del edema, hemorragia, miotoxicidad y necrosis, lo cual genera un ambiente favorable para la multiplicación de la bacteria presente en la boca de la serpiente (12,22,37).

**Insuficiencia renal aguda (IRA) (11-17%):** La IRA puede ser debida principalmente a dos causas, puede tener un **origen prerenal** por la hipotensión que causa el envenenamiento sistémico que compromete el flujo sanguíneo renal y por ende el funcionamiento de dicho órgano, o que sea de **origen renal** debido a un daño directo en la nefrona, que puede ser glomerulonefritis aguda, necrosis tubular aguda o necrosis cortical aguda. Este tipo de daño renal se ha demostrado en autopsias realizadas en Costa Rica, de pacientes mordidos por *B. asper* que constituyen, junto con la hemorragia en el sistema nervioso central, una de las principales causas de muerte en estos pacientes (12,22,37).

**Síndrome compartimental (3%):** En el envenenamiento severo, el extenso edema puede llevar a un síndrome compartimental, principalmente cuando la mordedura fue en un dedo, mano, pie o en el compartimento tibial anterior (12,22,37).

**Tabla 4.** Principales pruebas de laboratorio y frecuencia de aparición de sus alteraciones en el paciente con envenenamiento por mordedura de *B. asper*.

#### Pruebas de coagulación sanguínea

- Realizar en el momento de admitir al paciente y a las 6, 12, 24, 48, 72 y 96 horas después del inicio del tratamiento con el antiveneno.
- **Tiempo de coagulación 20 min (Lee-White):** Prueba de bajo costo, simple y con buena correlación con las concentraciones de fibrinógeno plasmático, efectiva en centros de atención primaria que no cuenten con laboratorio.
- **Tiempo de protrombina (PT)**
- **Tiempo parcial de tromboplastina (PTT)**
- **Fibrinógeno**
- **Dímero D**

#### Hemograma completo

- **Plaquetas:** 15-30% de los pacientes envenenados presentan trombocitopenia.
- **Leucocitosis con neutrofilia:** 60-75% de los pacientes presentarán este hallazgo
- **Hematocrito**
- **Hemoglobina**

#### Reactantes de fase aguda

- **Proteína C Reactiva**
- **Velocidad de eritrosedimentación**
- Usualmente se elevan las primeras 48 horas después del tratamiento, si persiste más de tres días, correlacionar con la clínica del paciente y otros parámetros de laboratorio orientado hacia una complicación.

#### Química sanguínea

- **Actividad Creatín quinasa plasmática (CK total)**
- **Electrolitos**

#### Urinálisis

- **Sedimentación urinaria**
- **Creatinina**
- **Macro o microhematuria:** Pueden presentarse en los casos moderados y severos. El hallazgo de cilindros hemáticos en el sedimento urinario es un indicador de glomerulonefritis, una complicación del envenenamiento severo.
- **Fracción excretada de Na urinario (FeNa):** es un buen indicador de la función renal

#### Saturación de oxígeno

- (Pulsioximetría) Se recomienda en casos severos en vez de la toma de gases arteriales debido al riesgo de hematomas.

Fuente: Otero-Patiño R. (2014). Snake Bites in Colombia. Publicado en Clinical Toxicology (22).

**Hemorragia en el sistema nervioso central (2-3%):** Constituye la complicación sistémica más seria del envenenamiento, puede ser intracerebral, intraventricular, intramedular, subaracnoidea, cerebelar, subdural o extradural. Puede ocurrir de forma espontánea o a causa de un trauma cefálico después de la mordedura. Los síntomas clínicos varían de acuerdo a la localización del sangrado, como parálisis, signos de déficit sensitivo, convulsiones, hipertensión intracraneal, pérdida de la consciencia, signos de irritación meníngea (12,22,37).

**Otras complicaciones del sangrado sistémico:** Como hemartrosis en dedos, rodillas y aumento del riesgo de artritis séptica, y también hematoma distantes del sitio de la mordida como en la región sublingual, submandibular, subcapsular en el hígado o retroperitoneal (12,22,37).

#### **2.6.4. Manejo del accidente ofídico**

El único tratamiento, validado científicamente, para el envenenamiento por mordedura de serpientes es la administración de antivenenos efectivos y seguros (3). Hace más de 100 años que Calmette desarrolló la seroterapia para el tratamiento de esta patología, y al día de hoy se sigue utilizando (38).

Latinoamérica tiene una larga tradición de producción de antivenenos desde que el Instituto Butantan en Brasil fue el pionero al inicio del siglo 20. Actualmente se producen antivenenos en Argentina, Bolivia, Brasil, Colombia, Costa Rica, Ecuador, Perú, México y Venezuela. La mayoría de estos laboratorios

pertenecen a instituciones públicas, ministerios de salud o universidades. A pesar del avance en Latinoamérica en términos de producción de antiveneno, si lo comparamos con otras regiones del mundo, se encuentran vacíos importantes en nuestra región, en términos de disponibilidad del antiveneno (13).

La fabricación del antiveneno es heterogénea en término de plataformas tecnológicas usadas, volúmenes de producción, calidad del producto, personal capacitado e innovación tecnológica (39). En algunos países, la producción local cumple con todas las necesidades locales, mientras que en otros no se garantiza la autosuficiencia y se deben importar antivenenos de otros países productores (13).

Costa Rica produce antivenenos para el tratamiento del envenenamiento por mordedura de vipéridos y corales desde el año 1967, esfuerzo que se consolidó con la creación del Instituto Clodomiro Picado en 1970 en la Universidad de Costa Rica (8). El antiveneno polivalente producido por dicho instituto, es preparado al inmunizar caballos con una mezcla de venenos que incluye el de *B. asper*, *Crotalus simus* (anteriormente clasificada como *Crotalus durissus* y *Lachesis stenophrys* de Costa Rica. La especie de animal seleccionada para la inmunización es el caballo, por su facilidad de manejo y los grandes volúmenes de sangría que permite. Cada animal se somete a un esquema de inmunización que dura aproximadamente 3-4 meses; durante este tiempo se inyecta cada 10 días dosis crecientes del veneno, por vía subcutánea. Posteriormente, se realizan sangrías de producción con el título de anticuerpos neutralizantes

adecuados y se separan los glóbulos rojos del plasma. Seguidamente el plasma hiperinmune de caballo es fraccionado, para la purificación de las inmunoglobulinas, por precipitación química con ácido caprílico y el producto se constituye por moléculas de Inmunoglobulinas G (IgG) completas. Finalmente, el producto es esterilizado mediante filtración de nitrocelulosa de 0.22 micrómetros y envasado asépticamente en frascos de vidrio de 10 mL. El antiveneno contiene una concentración de proteínas totales de  $53.7 \pm 0.3$  g/L determinada por el método de Biuret y su potencia neutralizante estándar para *B. asper* de 3 mg de veneno neutralizados por mL de antiveneno. Cabe mencionar que dicho antiveneno es el que actualmente se usa en Panamá (40) (Ver **Figura 6**).



**Figura 6.** Suero antiofídico polivalente producido por el Instituto Clodomiro Picado de Costa Rica.

Sin el tratamiento específico, la tasa de mortalidad debida al envenenamiento por *B. asper* es de un 7% (35), pero con la administración del suero antiofídico adecuado este porcentaje se puede reducir a menos de 0.5% (2). Cabe mencionar que la pronta administración de un suero antiofídico efectivo y adecuado es un punto crítico para prevenir la mortalidad y reducir la incidencia

de daño tisular y secuelas de forma permanente debidas al envenenamiento por *B. asper* (41). En muchas áreas tropicales de Latinoamérica, al menos 40-50% de los pacientes reciben medicina tradicional como primer tratamiento (plantas, productos químicos, métodos físicos, rezos, entre otros). Esta es una de las múltiples causas que retrasan la llegada oportuna de los pacientes al hospital; recibiendo atención médica después de 6 o más horas de ocurrido el accidente, afectando el pronóstico de estos casos. La muerte usualmente puede ser prevenida sí los pacientes reciben el antiveneno de forma adecuada en las primeras 2 horas después de la mordedura (22).

El manejo efectivo del envenenamiento por mordedura de serpiente a nivel clínico demanda tener un conocimiento adecuado de los aspectos principales de las manifestaciones clínicas y complicaciones, el diagnóstico y el tratamiento que debe incluir no solo el manejo del antiveneno sino también el manejo de las reacciones adversas a este. Adquirir dicho conocimiento por el personal de salud requiere de varias acciones a diferentes niveles, como cursos universitarios en las facultades de medicina y enfermería, programas de educación continua especiales para médicos, enfermeras y personal de salud que trabajan en áreas de alta incidencia de casos. También se debe preparar la guía nacional de manejo del envenenamiento para así estandarizar el manejo clínico con una base sólida de conocimiento científico (8).

El SAO (Suero antiofídico) polivalente del ICP (Instituto Clodomiro Picado) de la Universidad de Costa Rica, es eficaz en los accidentes causados por TODAS las

serpientes venenosas centroamericanas, excepto las serpientes de cascabel sudamericanas, corales y la serpiente de mar. Este SAO debe mantenerse en refrigeración (2-8°C) por lo que es importante conservar la cadena de frío en su distribución alrededor del país.

En condiciones hospitalarias, el SAO debe ser administrado por vía intravenosa. Se debe primero realizar una determinación de la severidad del envenenamiento según la sintomatología del paciente y clasificarlo en leve, moderado y severo, para qué basado en la severidad se defina la dosis inicial adecuada de SAO que el paciente debe recibir (Ver **Tabla 5**).

<b>Tabla 5.</b> Clasificación clínica del envenenamiento bothrópico y cantidad de ampollas de antiveneno requeridas.		
<b>Clasificación del envenenamiento</b>	<b>Manifestaciones clínicas</b>	<b>Neutralización de veneno (mg)-Viales de antiveneno (n)</b>
<b>Ausencia de envenenamiento</b>	Efectos locales: Dolor local No efectos sistémicos	Vigilar, No requiere tratamiento inicial con SAO polivalente
<b>Envenenamiento leve</b>	Efectos locales: Edema, dolor No presenta efectos sistémicos	No menos de 100 mg, 5 viales SAO polivalente
<b>Envenenamiento moderado</b>	Efectos locales: edema, dolor, sangrado Efectos sistémicos no muy severos: coagulopatías o hipotensión leve	No menos de 200 mg, 10 viales SAO polivalente
<b>Envenenamiento severo</b>	Efectos locales prominentes Efectos sistémicos importantes: coagulopatías, sangrado sistémico, hipotensión y alteraciones renales.	No menos de 300 mg, 15 viales SAO polivalente

Fuente: Otero-Patiño R. (2014). Snake Bites in Colombia. Publicado en Clinical Toxicology (22).

Las ampollas se disuelven en SSN 0,9% (Solución Salina normal) iniciando a una velocidad de 10 gotas por minuto, observando signos de reacción adversa (anafilaxia) como: taquicardia (aparece precozmente), hipotensión, broncoespasmo, prurito, urticaria, entre otros. Si en 10 minutos no ha aparecido ninguno de estos signos, puede pasarse la infusión a goteo rápido (42). Tanto las mordeduras en adultos como en niños deben ser tratadas con la misma cantidad de SAO. Para la administración del SAO el Instituto Clodomiro Picado recomienda seguir los siguientes pasos:

<b>Tabla 6.</b> Guía para la administración Intravenosa del Suero Antiofídico Polivalente según el Instituto Clodomiro Picado, Universidad de Costa Rica.
<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Canalice una vía venosa.</li> <li>✓ Diluya el suero según severidad (ver Tabla 5) en 500mL de solución salina normal (200 mL en el caso de niños, para evitar sobrecarga de fluidos) e inicie la infusión a goteo lento.</li> <li>✓ Si no hay reacción en 15 minutos, se procede a incrementar el flujo de manera que la totalidad del suero pase en 1 hora.</li> <li>✓ Si se produce reacciones adversas (urticaria, hipotensión, entre otros) se suspende inmediatamente la seroterapia y se administran antihistamínicos intravenosos y una solución de adrenalina 1: 1000 por vía subcutánea. Una vez controlada la reacción, se reinicia la administración del suero.</li> <li>✓ Si al cabo de 10 horas no hay cambios favorables en las pruebas de coagulación, o si el cuadro local y el sangrado sistémico se mantienen, se debe administrar una dosis adicional de 5 o 10 frascos de suero, según la severidad del caso. Por otra parte, hay casos en los que una vez controlado el envenenamiento, reaparecen signos y síntomas al cabo de 12 o 24 horas, posiblemente como consecuencia de la liberación tardía de veneno acumulado en los tejidos. En estos casos se recomienda administrar 5 frascos adicionales de suero.</li> <li>✓ Finalmente, tenga presente que como complemento al tratamiento antiofídico puede ser necesario el uso de antibióticos, sobre todo en las fases tempranas del tratamiento hospitalario. Por otra parte se debe administrar toxoide tetánico de acuerdo con las vacunaciones del paciente.</li> <li>✓ La administración del SAO puede desencadenar en algunos pacientes la enfermedad del suero, que se manifiesta entre 5 y 20 días después de la seroterapia. Esta enfermedad se caracteriza por fiebre, urticaria, dolores articulares y linfadenopatía. El tratamiento se basa en esteroides y antihistamínicos orales."</li> </ul>
<p>Fuente: Instituto-Clodomiro-Picado (2009). El envenenamiento por mordedura de serpiente en Centroamérica. Costa Rica: Universidad de Costa Rica, Facultad de Microbiología (40).</p>

## **CAPITULO III: ASPECTOS METODOLÓGICOS**

### 3.1. Tipo de investigación

Se trata de un estudio experimental a nivel de laboratorio con técnicas *in vitro* e *in vivo* para el desarrollo de conocimientos preclínicos que aportan una mejor comprensión de la fisiopatología básica del envenenamiento y de las diferencias que pueda tener el veneno de los especímenes capturados en las áreas geográficas estudiadas.

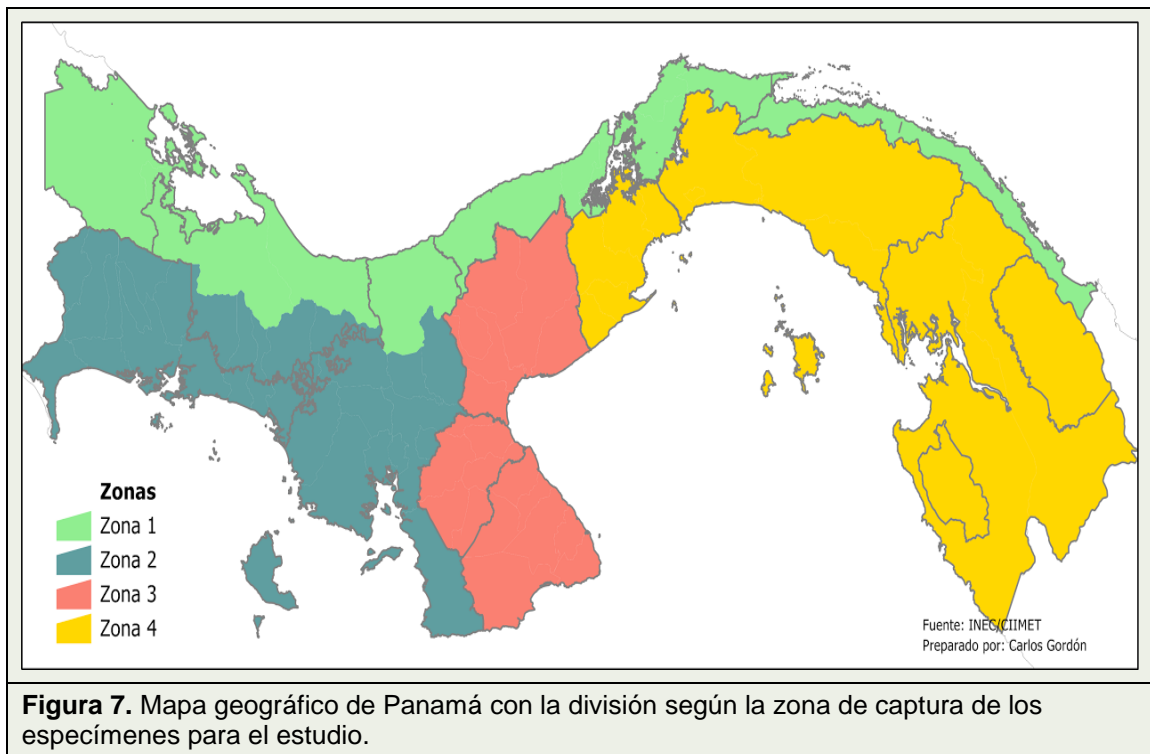
### 3.2. Materiales

#### 3.2.1. Recolección de especímenes de serpientes y extracción del veneno.

Se recolectaron y se mantuvieron en cautiverio un total de 76 especímenes de *B. asper*, adultas, de ambos sexos, provenientes de las diferentes zonas geográficas del país (Ver **Figura 7, Tabla 7**).

<b>Tabla 7.</b> Clasificados por zona geográfica zona geográfica y número de ejemplares de serpientes utilizados		
<b>Zona geográfica</b>	<b>Descripción</b>	<b>Número de ejemplares de serpientes recolectadas</b>
<b>Zona 1</b>	Caribe de Panamá (Bocas del Toro, Norte de Veraguas, Colón y Guna Yala)	6
<b>Zona 2</b>	Chiriquí y el Sur de Veraguas	13
<b>Zona 3</b>	Herrera, Los Santos y Coclé	23
<b>Zona 4</b>	Panamá y Darién	34

Las serpientes fueron ordeñadas a intervalos de cada 3 meses. El veneno crudo fue centrifugado por 20 minutos a 3000 rpm, el sobrenadante se liofilizó y se congeló a  $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$  hasta su uso (36).



### 3.2.2. Animales de experimentación

Las pruebas in vivo se realizaron utilizando ratones CD-1 con 18 a 20 gramos de peso corporal, de ambos sexos, proporcionados por el Bioterio de la Universidad de Panamá, utilizando la cantidad mínima necesaria y siguiendo las normas de la Guía para el cuidado, ética y uso de animales de laboratorio por el National Research Council de 2011 (43). Además, se tomaron medidas como la

administración de fármacos anestésicos para disminuir el estrés y el dolor en el animal, en las pruebas en la cuales no se afectaban por el uso del mismo. Las pruebas in vivo se realizaron por triplicado con el veneno de cada zona, utilizando 4-5 ratones/dosis.

### **3.3. Procedimientos experimentales**

#### **3.3.1. Componente 1: Variación geográfica de la actividad y tóxica del veneno de *Bothrops asper* de Panamá**

Basados en las manifestaciones fisiopatológicas predominantes inducidas por el envenenamiento de *B. asper*, se realizaron las técnicas básicas (in vivo e in vitro) para evaluar las principales características farmacológicas, tóxicas y bioquímicas a saber: actividad hemorrágica, actividad hemolítica indirecta, actividad coagulante, actividad desfibrinante, actividad miotóxica, actividad edematizante, letalidad, patrón electroforético e inmunoelectrotransferencia.

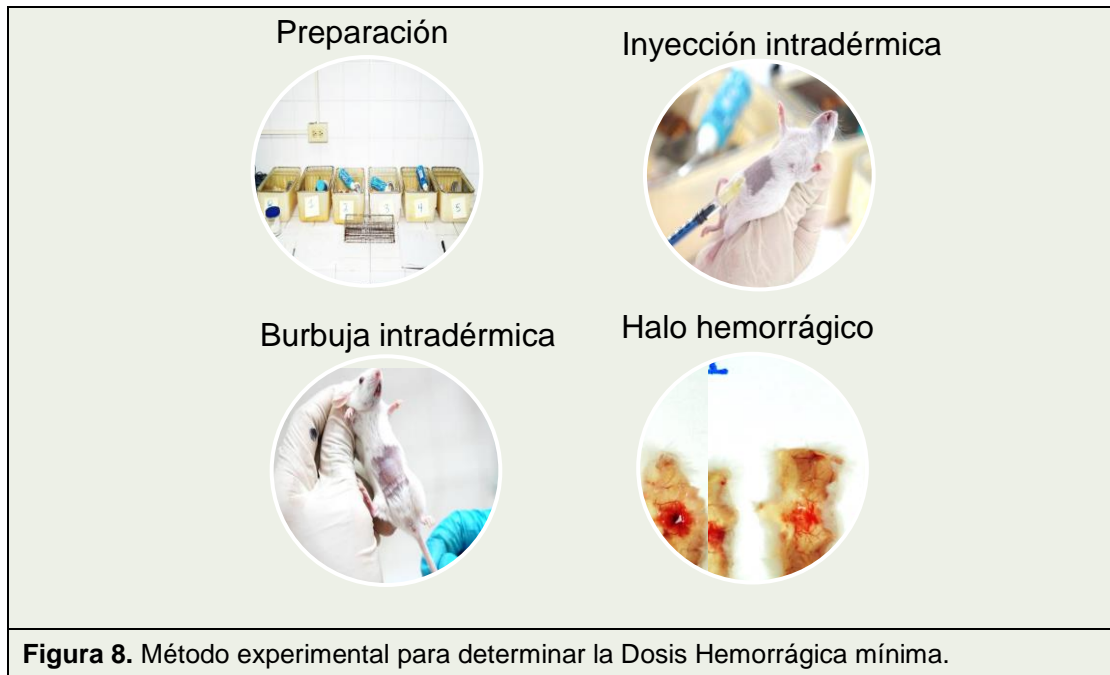
Se utilizó como vehículo para diluir el veneno el buffer fosfato salino conocido por sus siglas en inglés como PBS (*phosphate buffered saline*), pH 7.2-7.4. Es uno de los buffers más utilizados porque es isotónico y no tóxico para las células. Su osmolaridad y concentración de iones (Cl<sup>-</sup>, Na<sup>+</sup> y K<sup>+</sup>) es muy semejante a la del líquido extracelular de los mamíferos. El PBS se emplea como vehículo neutro ya que no modifica el perfil de expresión y funcionamiento

celular normal, por lo cual es útil para los bioensayos y pruebas in vitro realizadas con veneno y antiveneno. Se realiza preparando una mezcla de Cloruro de sodio (NaCl), fosfato de potasio ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ), fosfato dibásico de sodio ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) y cloruro de potasio (KCL) en agua destilada.

Como anestésico inhalatorio se utilizó el Sevorane®, administrado a través de una cámara de anestesia para ratones.

### **3.3.1.1. Actividad hemorrágica**

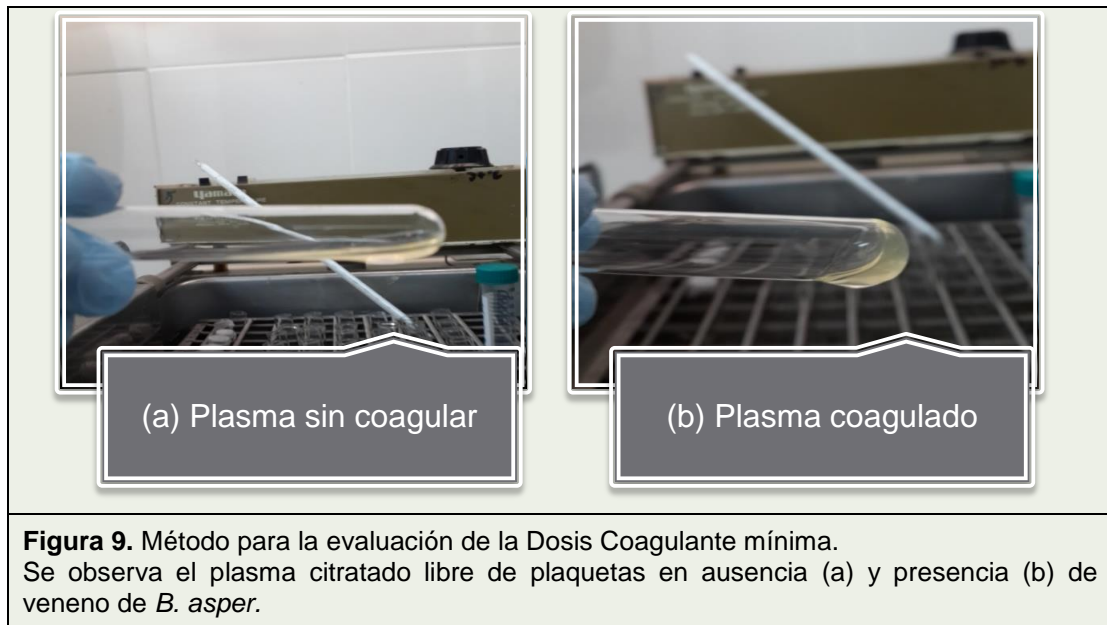
Se usó el método de Kondo et al. (1960), modificado por Gutiérrez et al. (1985) en el cual a grupos de 4 ratones, rasurados en el área abdominal el día anterior al experimento, se le administró 0.1 mL con dosis de 1.74 a 8.45  $\mu\text{g}$  de veneno diluidas en PBS por vía intradérmica en la región abdominal. A las dos horas posteriores a la inyección se sacrificaron con inhalación de Sevorane® para luego remover la piel y en el lado interno observar si presentaban o no halo hemorrágico para su posterior medición. Se consideró la dosis hemorrágica mínima (DHm) a la dosis del veneno que indujo un halo hemorrágico de 10 mm de diámetro a las 2 horas después de la inyección (Ver **Figura 8**) (44,45).



**Figura 8.** Método experimental para determinar la Dosis Hemorrágica mínima.

### 3.3.1.2. Actividad coagulante

Para esta evaluación se siguió el método de Theakston y Reid (1983), modificado por Gené et al. (1989) (46,47). Dicha actividad se determinó con varias dosis de veneno (0.19-3.12  $\mu\text{g}$ ) disueltas en 100  $\mu\text{L}$  de PBS agregadas a 200  $\mu\text{L}$  de plasma humano con citrato a 37°C en tubos de ensayo (ver **Figura 9**). Se midieron los tiempos de coagulación y se evaluó la Dosis Coagulante mínima (DCm) la cual se define como la dosis del veneno que indujo coagulación en 60 segundos.



Previo a realizar cada experimento se verificó la adecuabilidad del plasma a usar en el ensayo de la actividad coagulante de la siguiente forma: A 1000  $\mu\text{L}$  de plasma se le agregó 200  $\mu\text{L}$  de cloruro de calcio (1%) y se colocó en baño termostático a 37°C, luego, se mide el tiempo que toma en formarse el coagulo. Se considera que el plasma es apropiado si el coagulo se forma dentro de los 5 minutos. Se tomó en cuenta un grupo de tubos control con 200  $\mu\text{L}$  de plasma fresco citratado y 100  $\mu\text{L}$  de PBS en el cual no se presentaba coagulación dentro de los 5 minutos de observación. El plasma utilizado proviene de donantes saludables, cumpliendo los requerimientos del Banco de sangre de la Caja del Seguro Social (CSS, Panamá), para su uso en investigaciones científicas para las cuales se solicitó el permiso del donante mediante el consentimiento informado.

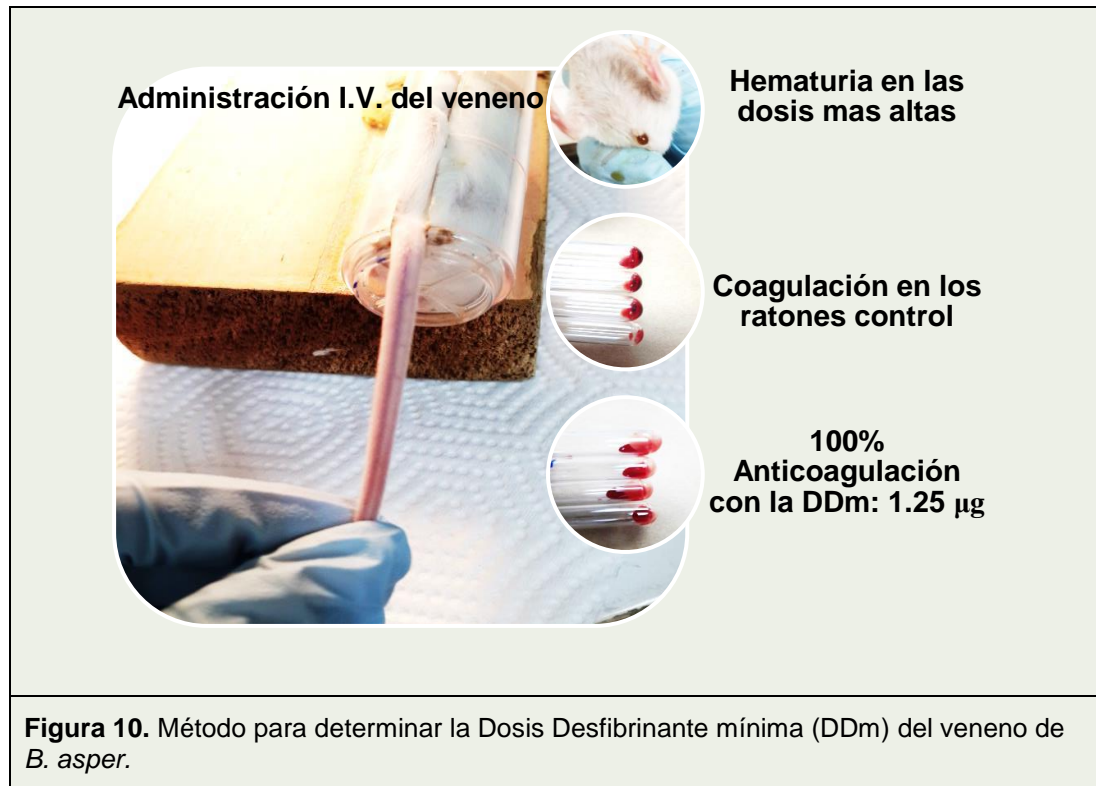
### **3.3.1.3. Actividad hemolítica indirecta.**

Se evaluó la actividad hemolítica indirecta, con diferentes dosis de veneno (0.12-4 µg) en 15 µL de PBS. Fueron evaluadas utilizando el método de agarosa - yema de huevo- eritrocitos. La Dosis Hemolítica indirecta mínima (DHIm) es la dosis que produce un halo de hemólisis de 20 mm de diámetro después de 20 horas de incubación a 37°C (48,49).

### **3.3.1.4. Actividad desfibrinante**

Para la evaluación de la actividad desfibrinante se siguió el método de Theakston y Reid (1983), modificado por Gené et al. (1989) (46,47), Utilizando grupo de 4 ratones a los cuales se les inyectó diferentes dosis de veneno (0.313-2.5 µg) disueltas en 200 µL de PBS por vía intravenosa en la vena caudal. Una hora después de la inyección, previo a anestesia con sevoflurano®, una cantidad de sangre fue extraída por punción cardíaca (aproximadamente 200 µL) y se colocó en tubos de ensayo al aire libre y a temperatura ambiente para ser evaluados posteriormente. Una hora después se observó la formación del coágulo (Ver **Figura 10**). La Dosis Desfibrinante mínima (DDm) corresponde a la

dosis mínima del veneno que indujo 100% de anticoagulación en todos los ratones inyectados.



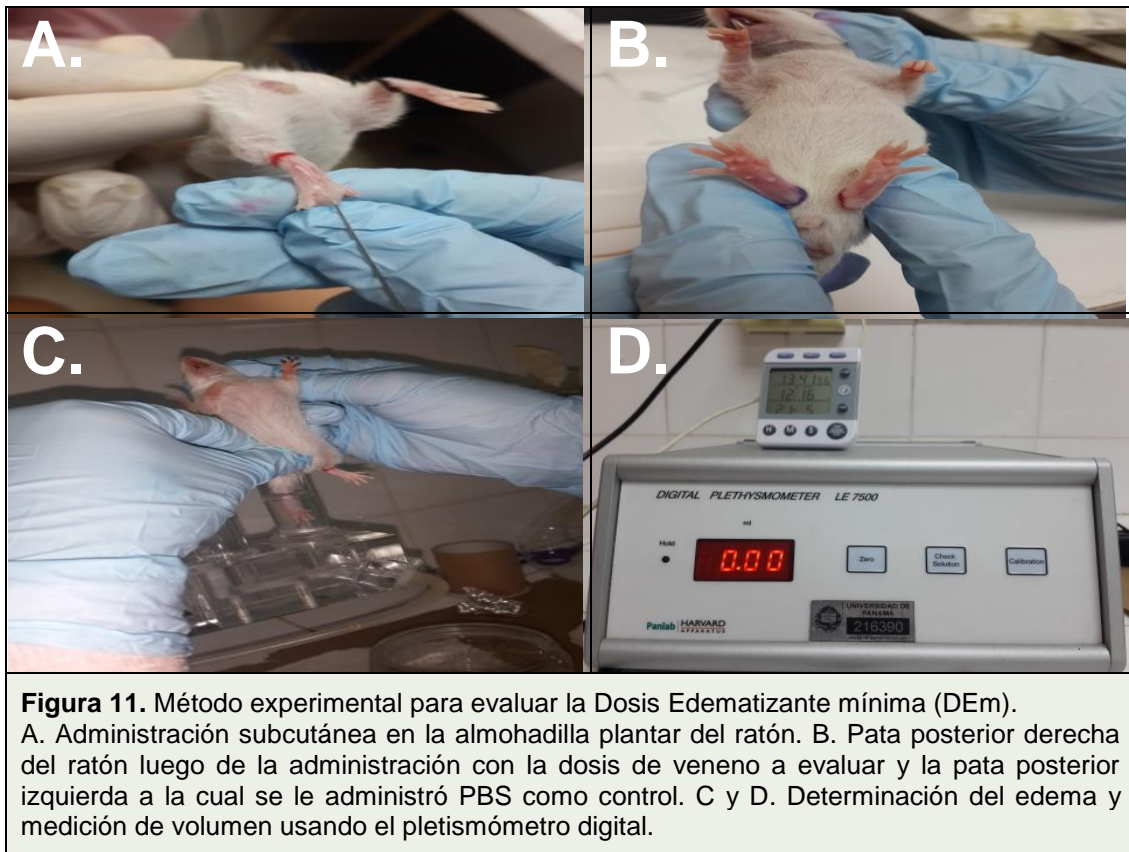
### 3.3.1.5. Actividad edematizante

Se evaluó utilizando grupos de 4 ratones a los cuales se le administró dosis diferentes de veneno (0.12, 0.25, 0.5, y 1  $\mu$ g) disueltas en 5 $\mu$ L de PBS administrada por vía subcutánea en la almohadilla plantar de la pata derecha del ratón con la ayuda de una jeringuilla de vidrio marca Hamilton con capacidad de 10  $\mu$ L. Se usó como control y para el posterior cálculo del porcentaje de edema, la pata izquierda de cada ratón en la cual se inyectó 5 $\mu$ L de PBS. El edema fue

medido con pletismómetro digital de agua LE 7500 marca Panlab Harvard Apparatus, diseñado para medir pequeños cambios de volumen, utilizado principalmente para darle el seguimiento a la respuesta inflamatoria a nivel experimental, en donde el desplazamiento de agua producido por la inmersión de la pata del ratón en el tubo de medida se ve reflejada por el desplazamiento en el segundo tubo, cambiando la conductancia entre los dos electrodos de platino que se encuentran en él. Posteriormente la unidad de control del pletismómetro detecta los cambios en la conductancia indicando la media de desplazamiento (0.01 mL de resolución) (ver **Figura 11**). Se realizaron mediciones al tiempo 0, a 1h, 2h y 3h posteriores a la inyección para observar el comportamiento del edema, y se calculó el porcentaje de edema en cada medición, mediante la siguiente fórmula:

$$\left[ \frac{(\text{Volumen de la pata derecha})}{(\text{Volumen de la pata izquierda})} \times 100 \right] - 100$$

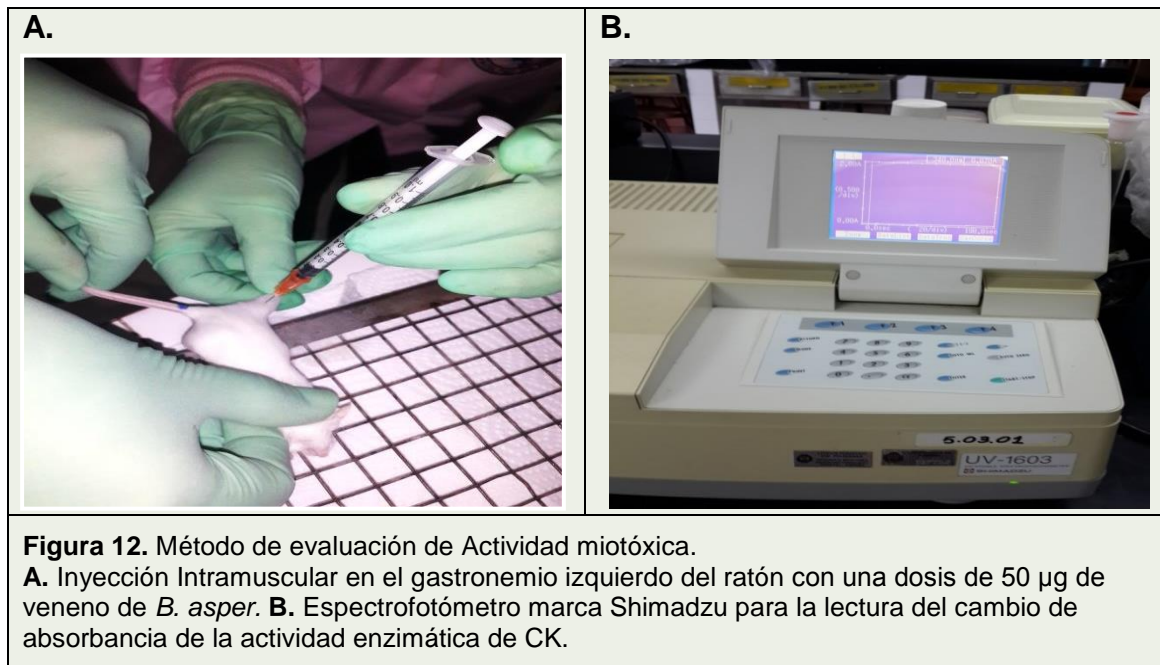
La Dosis Edematizante mínima (DEm) se definió como la menor cantidad de veneno que produjo un edema del 30% en tres horas siguiendo el método de Chaves et al. (1995), con ligeros cambios (50).



### 3.3.1.6. Actividad miotóxica

La evaluación miotóxica se cuantificó con la actividad de la enzima creatina quinasa (CK) en suero, de acuerdo al método de Gutiérrez et al., 1980 (51). Un grupo de 4 ratones fueron inyectados con 50  $\mu\text{g}$  de veneno (dosis única) disueltos en 100  $\mu\text{L}$  de PBS, por vía intramuscular en el gastronemio izquierdo. Luego de 3 horas, se tomaron muestras de sangre del seno orbital con capilares no heparinizados, se centrifugaron y se separó el suero donde se midió la actividad de la CK con el kit de CK NAC UV AA, de Wiener Laboratorios

(Argentina) en el espectrofotómetro UV-1603 marca Shimadzu del Laboratorio del Departamento de Bioquímica, de la Facultad de Medicina, Universidad de Panamá (Ver **Figura 12**).



### 3.3.1.7. Actividad letal

Se separaron grupos de 5 ratones en cajas con peso similar, marcadas con la dosis a usar, el número de lote del veneno y la zona a evaluar. Se utilizaron diferentes dosis de veneno desde 1.21 mg/Kg a 8.911 mg/Kg disueltas en 0.5 mL de PBS utilizando el método de administración a través de la vía intraperitoneal (31), posterior a la administración, se determinó la mortalidad a

las 48 horas. La Dosis Letal 50 (DL<sub>50</sub>) fue estimada por el método de Spearman-Kärber a través del programa Toxicol creado por el ICP (52).

#### **3.3.1.8. Patrón electroforético**

Se realizó una corrida electroforética en minigeles verticales de poliacrilamida al 15% en presencia de Dodecil Sulfato de Sodio (SDS-PAGE) (53). En cada carril se depositaron 15 µg de veneno previamente calentado con β-Mercaptoetanol (condiciones reductoras). La corrida se realizó en una cámara Mini-Protean II de Bio-Rad® (Richmond, CA, USA) aplicando 150 V durante 60 min. Se corrió el veneno de referencia (patrón) de Panamá lote 01-2015, además de muestras de venenos de las 4 zonas geográficas de Panamá y el veneno de referencia (patrón) de Costa Rica lote 01-2006 y, en paralelo, dos marcadores de peso molecular (Low range y High Range de la marca Bio-Rad®).

#### **3.3.1.9. Inmunoelectrotransferencia**

Una vez terminada la corrida electroforética como se describió anteriormente, se procedió a realizar una inmunoelectrotransferencia siguiendo el método de Towbin et al. (1979), utilizando el suero polivalente de Costa Rica proveniente

del Instituto Clodomiro Picado, Lote: 5550215 como anticuerpo primario a una dilución 1: 250 durante toda la noche a temperatura ambiente. Las proteínas fueron electrotransferidas a membranas de nitrocelulosa a corriente constante de 400 mAmp durante 1 hora y posteriormente reveladas. Se empleó como segundo anticuerpo Anti-Horse IgG (Molecular completa) producido por SIGMA-ALDRICH a una dilución 1:1000 y 4-Cl- 1-naftol como sustrato (54,55).

### **3.3.2. Componente 2: Estudio preclínico de la eficacia del antiveneno.**

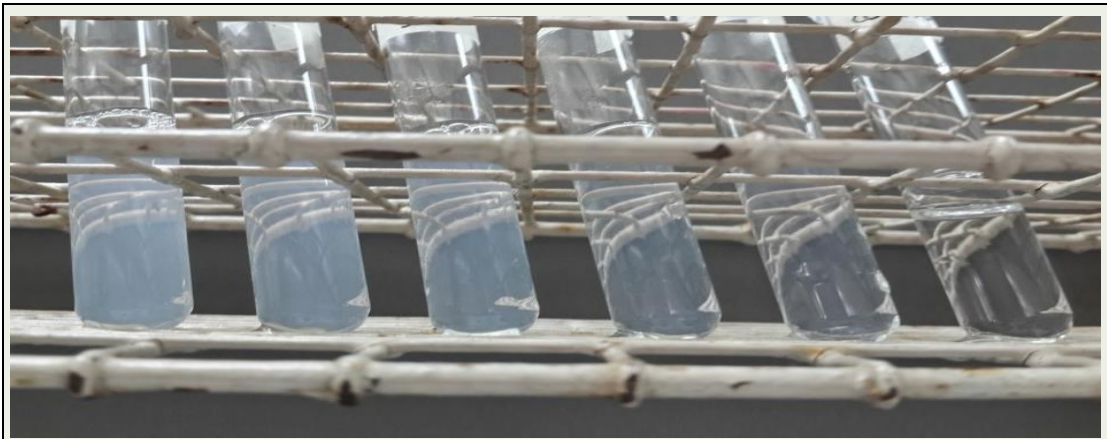
#### **3.3.2.1. Antiveneno**

Los estudios de neutralización fueron realizados utilizando el antiveneno polivalente Lote: 5550215, proveniente del Instituto Clodomiro Picado de la Universidad de Costa Rica, Costa Rica.

#### **3.3.2.2. Ensayo preclínico**

Se realizaron ensayos de neutralización por el método de preincubación de veneno y antiveneno a 37°C durante 30 minutos, empleando dosis fijas de veneno (Dosis de reto) y cantidades variables de antiveneno (1.33 a 15.19

mg/mL) (Ver **Figura 13**). La dosis de reto del veneno que se usó para la prueba de neutralización del efecto letal fueron 4 Dosis Letal 50 ( $DL_{50}$ ) correspondiente para cada zona (32). Transcurrido el periodo de incubación se realizó la metodología del ensayo de letalidad descrita anteriormente. La capacidad neutralizante se expresó como Dosis Efectiva 50 ( $DE_{50}$ ) la cual corresponde a la razón antiveneno/veneno, en la cual la letalidad del veneno se redujo a un 50% (56).



**Figura 13.** Ensayo de neutralización del veneno de *B. asper* por el antiveneno polivalente. Se muestra los tubos de ensayo conteniendo una dosis fija de veneno con cantidades variables del antiveneno.

### 3.4. Manejo estadístico de los datos

Los resultados de este trabajo fueron expresados en promedio  $\pm$  error estándar de la media ( $\bar{x} \pm SEM$ ) a excepción de la  $DL_{50}$  la cual se expresó en el valor con intervalos de confianza de 95%. Los ensayos se realizaron por triplicado, menos

la letalidad la cual solo se realizó una vez para minimizar el uso de animales. Los datos fueron comparados mediante la prueba paramétrica ANOVA de una vía, cumpliendo los supuestos de normalidad y homogeneidad, con análisis de Tukey para evaluar las diferencias, con un nivel de significancia de  $p < 0.05$ . Dicha prueba se escogió debido a que tiene una mejor potencia-estadística (57). Se empleó el programa GraphPad Prism 5.

## **CAPÍTULO IV: RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

## CAPÍTULO IV: RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Previo a cada experimento se realizó la estandarización de cada prueba usando como referencia el veneno patrón de *B. asper* de Costa Rica (Lote 01-06) y de Panamá (Lote 2009). Los venenos evaluados presentaron actividades tóxicas descritas para el veneno de las serpientes de la familia Viperidae. Todos los venenos de *B. asper* de las zonas geográficas de Panamá tienen actividad hemorrágica, coagulante, desfibrinante, hemolítica, miotóxica, edematizante y letal. Cuando se compararon los venenos de cada zona con el veneno patrón del país, se observaron diferencias en algunas actividades, como la actividad, hemorrágica, coagulante, hemolítica y miotóxica, esto puede ser debido a lo que se describe en la literatura, donde se ha descrito sinergismo y antagonismo entre diferentes compuestos tóxicos o en la acción de las distintas isoformas de las toxinas que pueden contribuir a estas diferencias significativas (58). Sin embargo, Chippaux et al. (1991) describe que para diferentes serpientes existe variación intraespecie atribuidas a las condiciones geográficas, edad, hábitos alimenticios y cambios estacionales en la que esta se encuentre (5). Lo cual se aplica a los resultados obtenidos en el presente estudio que indican que existen diferencias intraespecie en el veneno de *B. asper* de cada zona geográfica de Panamá, obteniendo variaciones en la intensidad de las actividades evaluadas.

No obstante, para la  $DL_{50}$ , DEm y la DDm no se encontraron diferencias estadísticas.

**Tabla 8.** Actividades tóxicas del veneno de *Bothrops asper* de diferentes zonas geográficas de Panamá.

Veneno	Actividad Letal (DL <sub>50</sub> ) <sup>+</sup>		Actividad hemorrágica	Actividad Coagulante	Actividad Desfibrinante	Actividad Edematizante	Actividad Miotóxica	Actividad Hemolítica Indirecta
	mg/kg	µg/ratón	DHm (µg)	DCm (µg)	DDm (µg)	DEm (µg)	(U/L)	DHIm (µg)
<b>Zona 1</b> (Bocas del Toro, Caribe de Veraguas, Colón y Guna Yala)	5.18 (4.27-6.29) <sup>a</sup>	104	2.56 ± 0.08 <sup>a</sup>	0.26 ± 0.03 <sup>a</sup>	1.25 <sup>a</sup>	0.70 ± 0.05 <sup>a</sup>	10 432 ± 1 096 <sup>a</sup>	0.44 ± 0.03 <sup>a</sup>
<b>Zona 2</b> (Chiriquí y Pacífico de Veraguas)	4.13 (3.53-4.84) <sup>a</sup>	91	2.29 ± 0.39 <sup>a</sup>	0.52 ± 0.08 <sup>b</sup>	1.25 <sup>a</sup>	0.76 ± 0.07 <sup>a</sup>	17 590 ± 1 364 <sup>b</sup>	0.49 ± 0.01 <sup>a</sup>
<b>Zona 3</b> (Los Santos, Herrera y Coclé)	3.68 (3.00-4.51) <sup>a</sup>	73.6	1.60 ± 0.16 <sup>a</sup>	0.29 ± 0.06 <sup>a</sup>	1.25 <sup>a</sup>	0.75 ± 0.09 <sup>a</sup>	12 231 ± 1 076 <sup>a</sup>	0.80 ± 0.06 <sup>b</sup>
<b>Zona 4</b> (Provincia de Panamá y Darién)	4.90 (4.65-5.17) <sup>a</sup>	98	5.15 ± 0.13 <sup>b++</sup>	0.73 ± 0.01 <sup>b</sup>	1.25 <sup>a</sup>	0.63 ± 0.10 <sup>a</sup>	10 122 ± 1 298 <sup>a</sup>	0.52 ± 0.01 <sup>a</sup>

<sup>+</sup>DL<sub>50</sub>: Dosis Letal 50 (expresada en mg/kg y en µg/ratón); DHm: Dosis Hemorrágica mínima; DCm: Dosis Coagulante mínima; DDm: Dosis Desfibrinante mínima; DEm: Dosis Edematizante mínima; DHIm: Dosis Hemolítica Indirecta mínima (Ver definiciones en metodología).

<sup>++</sup>Los valores con diferentes superíndices en una misma columna son significativamente diferentes comparados con las otras zonas geográficas (P<0.05). Los resultados se expresan en media ± error estándar de la media excepto la letalidad que se muestra en el valor y límites de confianza al 95% en paréntesis.

#### 4.1. Componente 1: Variación geográfica de la actividad tóxica del veneno de *Bothrops asper* de Panamá

En la **Tabla 8** se resumen todos los resultados de las actividades tóxicas realizadas con el veneno de *B. asper* de cada zona geográfica de Panamá.

##### 4.1.1. Dosis Hemorrágica mínima

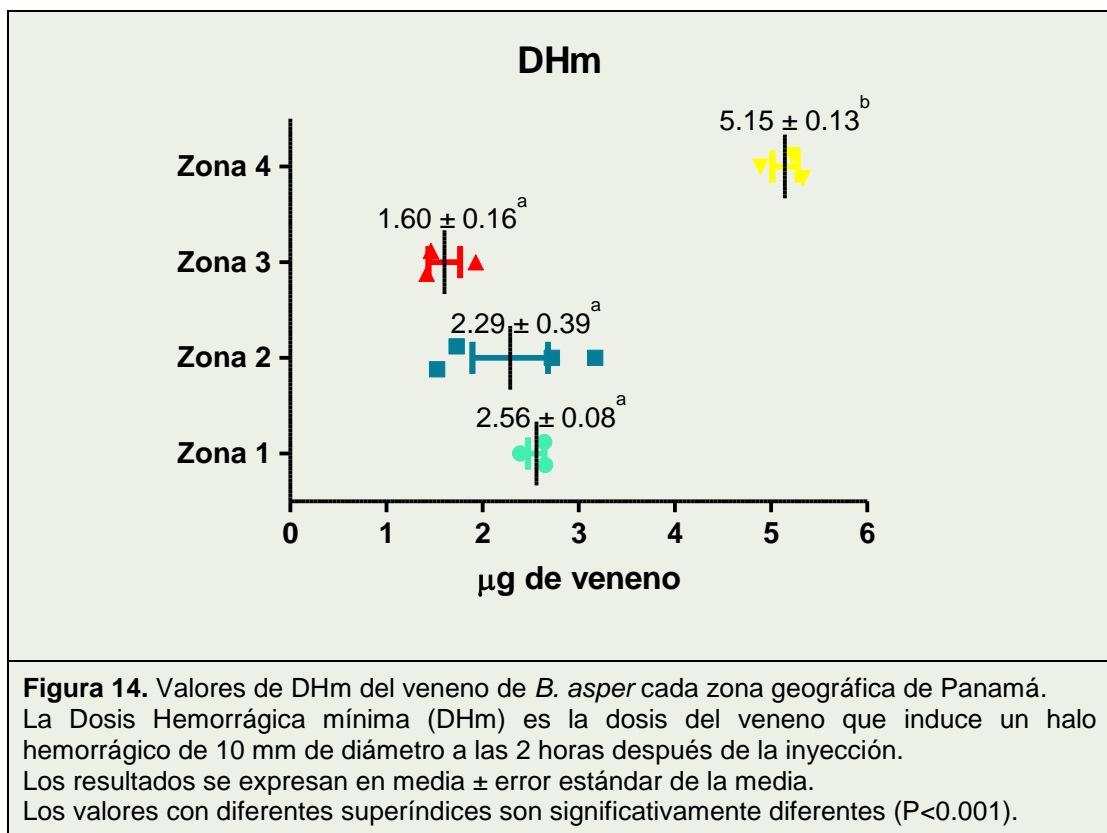
Los resultados obtenidos para la Dosis Hemorrágica mínima por las diferentes zonas se muestran en la **Tabla 9**.

Tabla 9. Dosis Hemorrágica mínima del veneno de <i>B. asper</i> de cada zona geográfica de Panamá.	
Veneno <i>B. asper</i>	Actividad Hemorrágica (DHm) $\mu\text{g}$
Zona 1	2.56 $\pm$ 0.08
Zona 2	2.29 $\pm$ 0.39
Zona 3	1.60 $\pm$ 0.16
Zona 4	5.15 $\pm$ 0.13***

Los resultados se expresan en media  $\pm$  error estándar de la media.  
 \*\*\*Significancia estadística con una  $P < 0.001$ .

Se encontró que tanto la Zona 1 como la Zona 2 presentaron resultados muy similares, con una DHm de 2.56  $\pm$  0.08  $\mu\text{g}$  y 2.29  $\pm$  0.39  $\mu\text{g}$  respectivamente, a diferencia de la zona 3 con una DHm de 1.60  $\pm$  0.16  $\mu\text{g}$  que pareciera ser más

hemorrágica pero que estadísticamente no presenta ninguna diferencia significativa con las otras zonas (Ver **Figura 14**), dichos valores son valores muy similares a los reportados para *B. asper* de Costa Rica, utilizando la misma metodología, encontraron una DHm para la región Caribe de dicho país menos hemorrágica con un valor de  $2.50 \mu\text{g}$ , comparado con una DHm para la región Pacífica de  $1.50 \mu\text{g}$  (17).



Por el contrario la Zona 4 que abarca la provincia de Panamá y Darién con una DHm de  $5.15 \pm 0.13 \mu\text{g}$  presentó una significancia estadística de  $p < 0.001$ , al compararla con las otras 3 zonas, siendo la zona con el valor más alto de  $\mu\text{g}$  de veneno para alcanzar el mismo efecto hemorrágico (Ver **Figura 15**), tal valor es

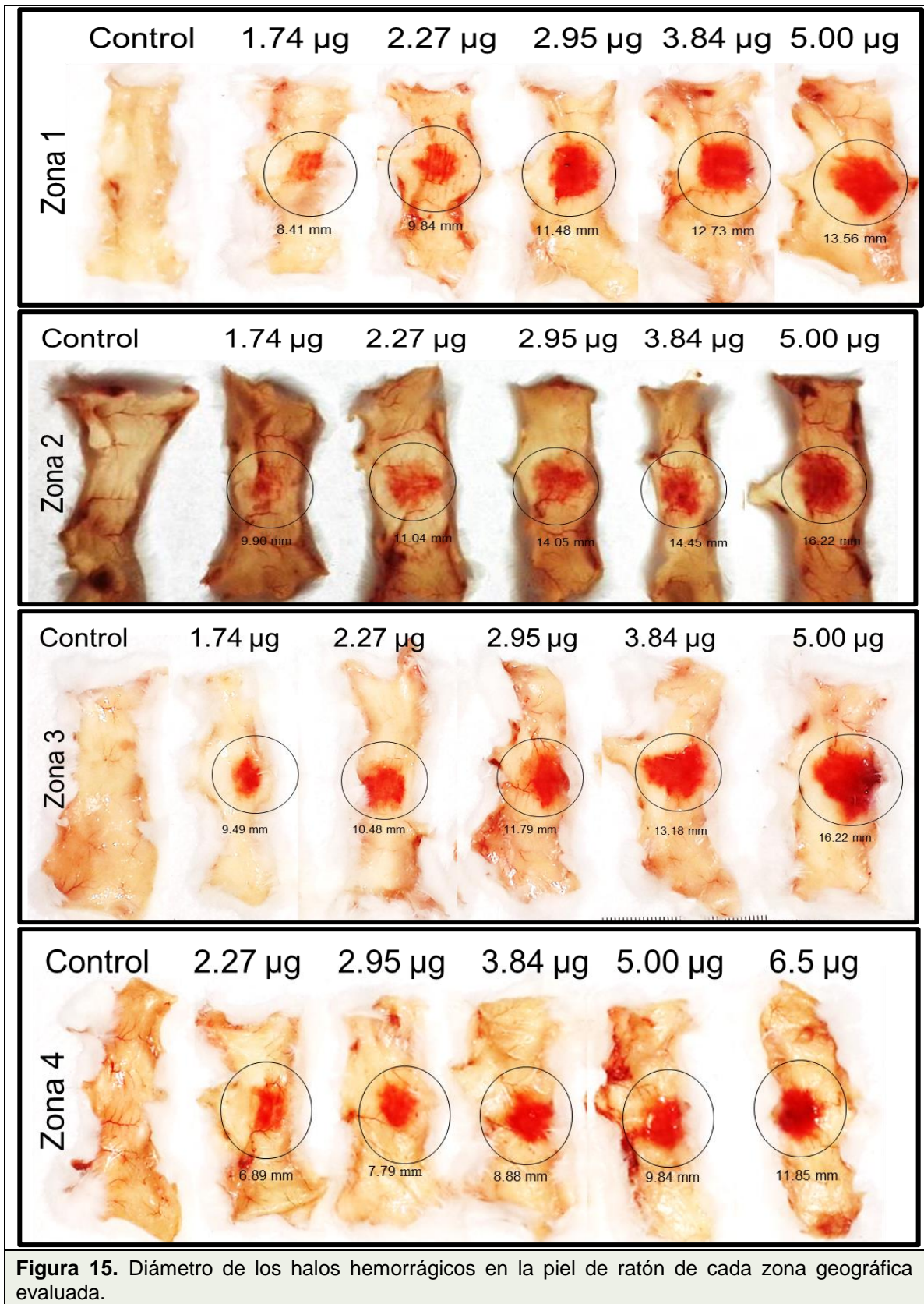
similar al obtenido para *B. asper* de México ( $5.8 \pm 2.0 \mu\text{g}$ ) (4), Honduras ( $6 \mu\text{g}$ ) (59) y al reportado por Quintero para *B. asper* de Panamá de una zona no especificada, con una DHm de  $6.3 \pm 3.6 \mu\text{g}$  (60). Recientemente en el trabajo de Uribe realizado con el veneno patrón de Panamá reportó como valor de la DHm para *B. asper* de  $3.98 \mu\text{g}$  (25).

#### 4.1.2. Dosis Coagulante mínima

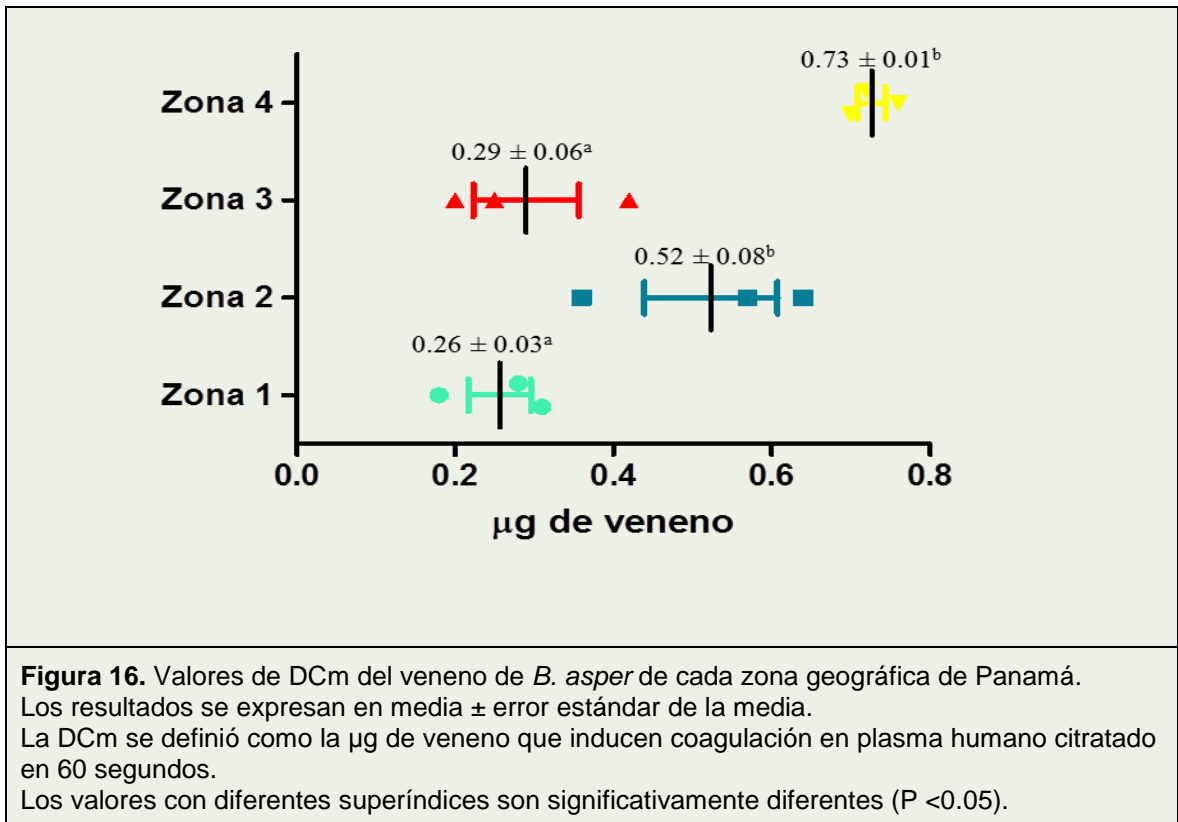
Los resultados obtenidos para la Dosis Coagulante mínima por zona geográfica se presentan en la **Tabla 10**.

<b>Tabla 10.</b> DCm determinada para el veneno de <i>B. asper</i> proveniente de cada zona geográfica de Panamá.	
<b>Veneno <i>B. asper</i></b>	<b>Actividad Coagulante (DCm) <math>\mu\text{g}</math></b>
<b>Zona 1</b>	$0.26 \pm 0.03^*$
<b>Zona 2</b>	$0.52 \pm 0.08$
<b>Zona 3</b>	$0.29 \pm 0.06$
<b>Zona 4</b>	$0.73 \pm 0.01^{**}$

\* $p < 0.05$  al comparar Zona 1 con Zona 2  
 \*\* $p < 0.01$  al comparar Zona 4 con Zona 1 y Zona 3



La zona que presentó la menor actividad coagulante fue la zona 4 con un valor de  $0.73 \pm 0.01 \mu\text{g}$ , un valor similar al obtenido para *Bothrops atrox* de Perú con  $0.8 \pm 0.05 \mu\text{g}$  y Colombia con  $0.82 \pm 0.05 \mu\text{g}$  (32), el valor de la DCm de la zona 4 presenta diferencias significativas cuando se compara con la DCm de zona 1 con un valor de  $0.26 \pm 0.03 \mu\text{g}$  y con la zona 3 con un valor de  $0.29 \pm 0.06 \mu\text{g}$ . Los valores de la zona 1 y 3 son muy similares al reportado para *B. asper* de Costa Rica ( $0.32 \pm 0.02 \mu\text{g}$ ) (32). Con respecto a la zona 2 que abarca Chiriquí y el Sur de Veraguas se encontró una diferencia significativa al compararla con la zona 1 del Caribe panameño, con un valor de  $0.52 \pm 0.08 \mu\text{g}$  (Ver **Figura 16**), este valor es similar al reportado para el veneno patrón de *B. asper* de Panamá por Uribe (25).



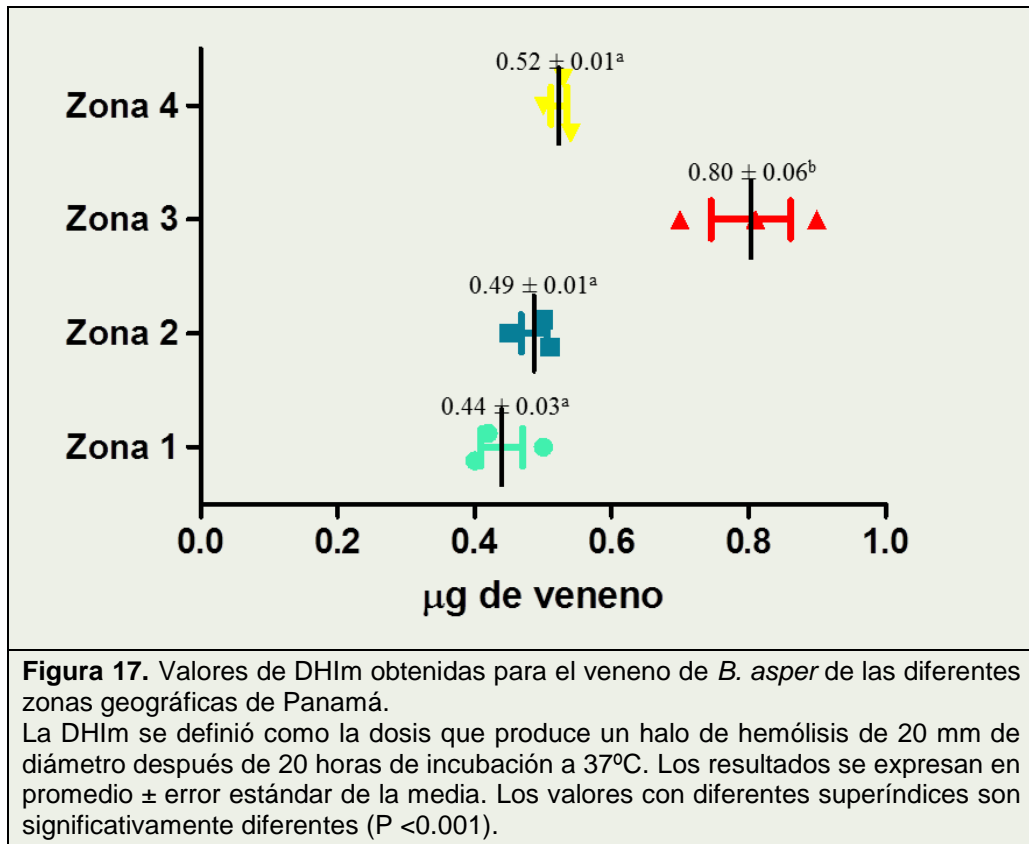
### 4.1.3. Dosis Hemolítica Indirecta mínima

Los resultados para la DHIm se muestran en la **Tabla 11**.

<b>Tabla 11.</b> DHIm determinada para el veneno de <i>B. asper</i> proveniente de cada zona geográfica de Panamá.	
<b>Veneno <i>B. asper</i></b>	<b>Actividad Hemolítica (DHIm) <math>\mu\text{g}</math></b>
<b>Zona 1</b>	0.44 $\pm$ 0.03
<b>Zona 2</b>	0.49 $\pm$ 0.01
<b>Zona 3</b>	0.80 $\pm$ 0.06***
<b>Zona 4</b>	0.52 $\pm$ 0.01

La DHIm se define como la dosis mínima de veneno ( $\mu\text{g}$ )  $\pm$  Error Estándar que produce un halo hemolítico de 20 mm de diámetro después de 20 horas de incubación a 37°C. \*\*\*p<0.001

Se encontró que la zona 1, 2 y 4 presentaron valores muy similares entre sí, 0.44, 0.49 y 0.52  $\mu\text{g}$  respectivamente. Sin embargo la zona 3 con una DHIm de 0.80  $\mu\text{g}$  presentó una diferencia significativa ( $P<0.001$ ) con respecto al valor obtenido para la zona 1 y la zona 2 y una diferencia con una  $P<0.01$  comparado con la zona 4 (Ver **Figura 17**). La DHIm para la zona 3 fue la más alta, siendo la zona con la menor capacidad hemorrágica indirecta, el resto de las zonas presentó valores muy similares a los reportados para *B. asper* de Costa Rica con una DHIm de 0.45  $\mu\text{g}$  (48).



#### 4.1.4. Dosis Desfibrinante mínima

Todos los ensayos de las zonas se realizaron por triplicado y no se encontró variabilidad entre las zonas, obteniendo para todas las zonas un valor de una DDm de 1.25 µg, el cual es igual al reportado por Alina Uribe para el veneno patrón de *B. asper* de Panamá (25). Valores similares han sido reportados para *B. asper* de Colombia región del Choco y Antioquía, las cuales limitan con Panamá, con una DDm de 1.1 ± 0.3 µg (36).

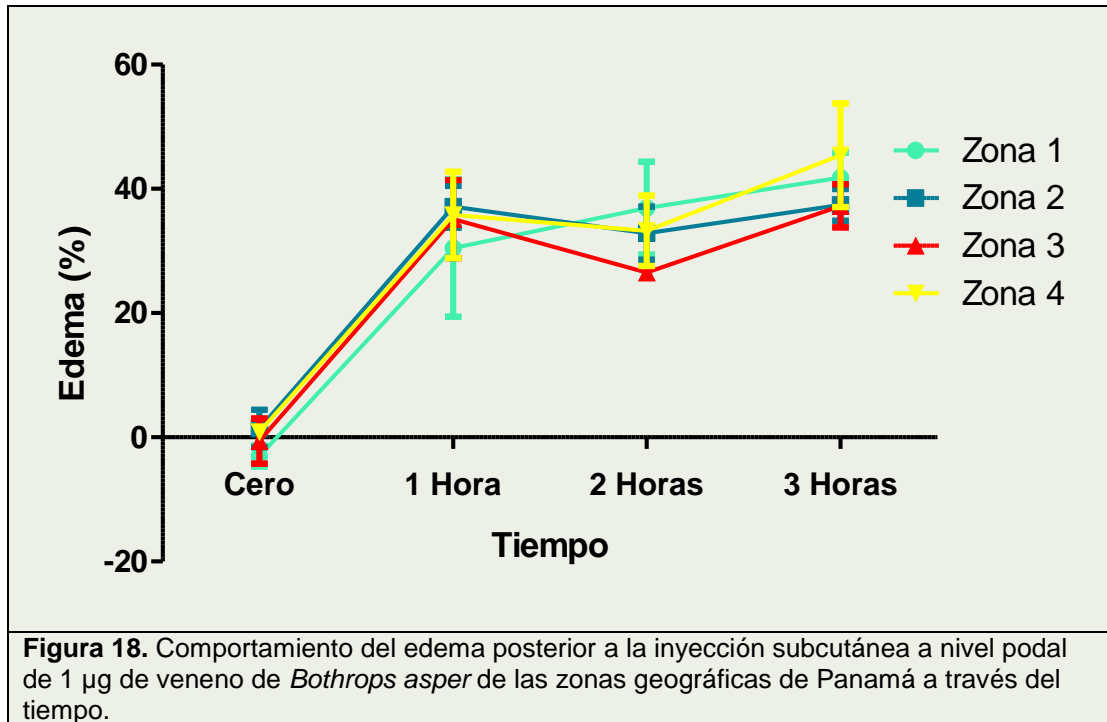
#### 4.1.5. Dosis Edematizante mínima

Los resultados de la Dosis Edematizante mínima del veneno de cada zona geográfica evaluada se presentan en la **Tabla 12**.

<b>Tabla 12.</b> DEm determinada para el veneno de <i>B. asper</i> proveniente de cada zona geográfica de Panamá.	
<b>Veneno de <i>B. asper</i></b>	<b>DEm (<math>\mu\text{g}</math>)</b>
<b>Zona 1</b>	0.70 $\pm$ 0.05
<b>Zona 2</b>	0.76 $\pm$ 0.07
<b>Zona 3</b>	0.75 $\pm$ 0.09
<b>Zona 4</b>	0.63 $\pm$ 0.10

La Dosis edematizante mínima (DEm) se definió como la menor cantidad de veneno que produce un edema del 30% en tres horas. Los resultados se expresan en media  $\pm$  error estándar de la media.

En la **Figura 18** se observa el comportamiento del edema a través del tiempo posterior a la inyección subcutánea de 1  $\mu\text{g}$  de veneno en la cual se puede observar un aumento significativo del edema en la primera hora, y manteniéndose hacia las 3 horas un edema entre un 30 - 40% en la pata inyectada con veneno comparado con la pata inyectada con PBS, sin diferencia para el veneno de todas las zonas geográficas evaluadas. Se puede observar que los valores obtenidos para cada DEm en cada zona no presentaron diferencias estadísticamente significativas, con valores muy similares entre sí.



#### 4.1.6. Actividad miotóxica

Se evaluó los venenos de las diferentes zonas, con sus respectivos ratones controles inyectados con PBS, y además se inyectaron ratones con veneno patrón de Panamá y de Costa Rica. Para evaluar la actividad miotóxica del veneno a través de la actividad de CK, debe evitarse la hemólisis de la muestra, ya que los eritrocitos pueden liberar actividad de CK que interfiere en la prueba, por ende una muestra hemolizada dará valores más altos a los esperados, esto debido a errores en la extracción de sangre y conservación de la muestra.

<b>Tabla 13.</b> Actividad miotóxica determinada para el veneno de <i>B. asper</i> proveniente de cada zona geográfica de Panamá.	
<b>Veneno <i>B. asper</i></b>	<b>Creatinquinasa (CK) (U/L)</b>
<b>Control</b>	643.6 ± 152.9
<b>Zona 1</b>	10 432 ± 1 096
<b>Zona 2</b>	17 590 ± 1 364***
<b>Zona 3</b>	12 231 ± 1 076
<b>Zona 4</b>	10 122 ± 1 298
<b>Patrón Panamá</b>	11 260 ± 1 543
<b>Costa Rica</b>	12 584 ± 2 016

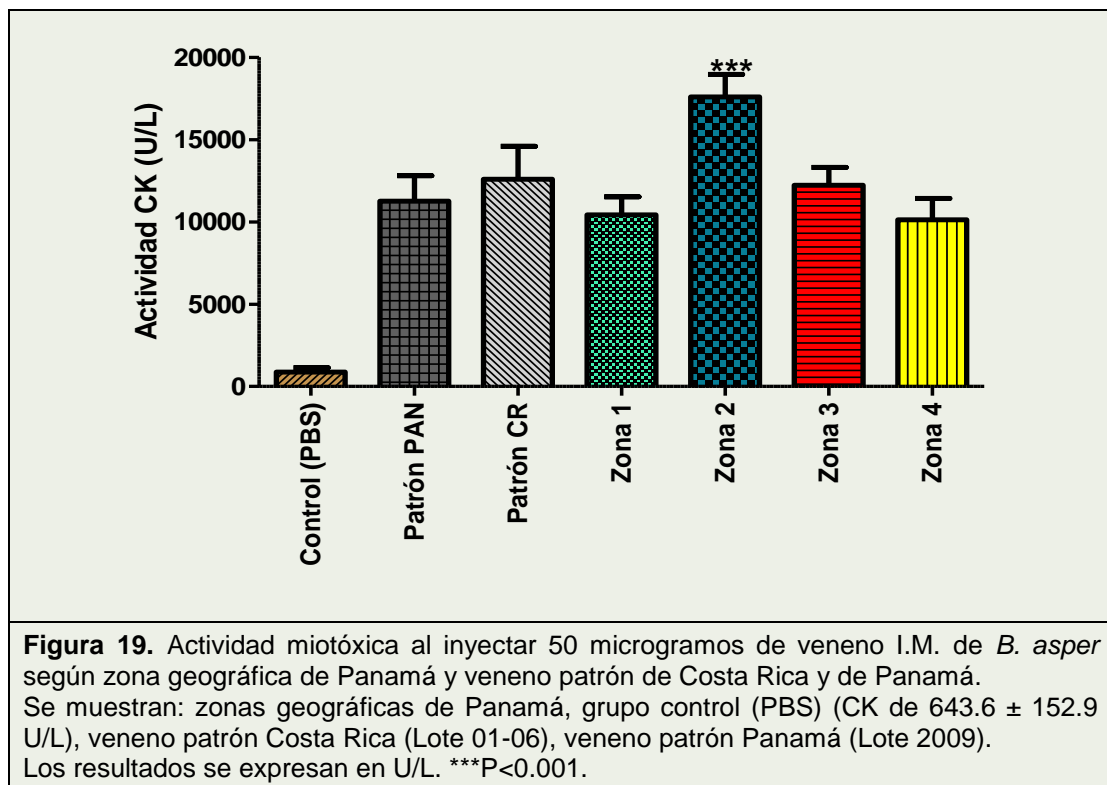
Los resultados se expresan en U/L. \*\*\*P<0.001.

Los resultados obtenidos mostraron valores de CK de las zonas geográficas muy elevados comparados con los obtenidos en los ratones control a los cuales sólo se les inyectó PBS (**Tabla 13**). No se evidenció diferencia significativa entre el veneno patrón de Panamá y el veneno patrón de Costa Rica. Tampoco se evidenció diferencia entre los resultados de las zonas 1, 3 y 4. Sin embargo la zona 2 con un valor de 17 590 ± 1 364 U/L lo cual sí presentó diferencia significativa (P<0.001) al compararse con las otras 3 zonas, indicando que el veneno de esta zona que abarca Chiriquí y el Sur de Veraguas muestra mayor toxicidad muscular comparada con las otras zonas geográficas del país (Ver **Figura 19**).

Los valores de la actividad de la CK del veneno de las zonas geográficas, no presentan diferencias estadísticamente significativas al comparar con el veneno

patrón de referencia para *B. asper* de Costa Rica ( $12\,584 \pm 2\,016$  U/L) y de Panamá ( $11\,260 \pm 1\,543$  U/L), lo cual es similar al obtenido para el veneno de *B. asper* de Costa Rica y México (61).

Nuestros resultados son similares a los descritos por el estudio de Lanari et al., al evaluar de forma individual los venenos por zonas geográficas, quienes encontraron diferencias que no se observan en el veneno patrón. Esto se puede explicar porque el veneno patrón contiene una mezcla de veneno representativa de cada zona geográfica del país para la especie, pudiéndose observar sinergismos o antagonismos de los diferentes componentes del veneno que se evidencien al mezclar los venenos de la misma especie para formar un veneno patrón de referencia para la especie (58).



#### 4.1.7. Dosis Letal 50

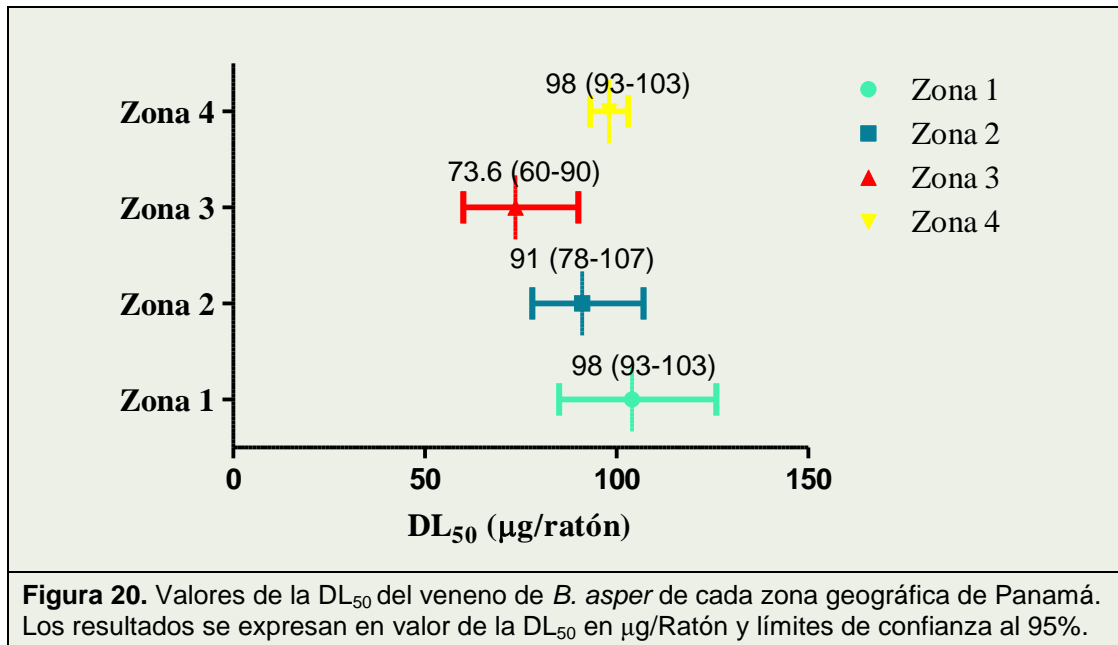
La letalidad del veneno ha sido estudiada ampliamente en investigaciones de variación de actividades. Cabe mencionar que dicho efecto, es el de mayor prioridad a evaluar para determinar la toxicidad del veneno de *B. asper*, según cada zona geográfica. Siendo el modelo experimental en ratones para la determinación de la actividad letal uno de los más utilizado a nivel mundial (5). Con respecto a la vía de administración, en la mayoría de los estudios se utiliza la vía intraperitoneal (31), la cual involucra una absorción sistémica de los componentes del veneno desde la cavidad peritoneal, lo que representa un mejor modelo para reproducir las principales características clínicas sistémicas que el modelo que utiliza la vía intravenosa en el cual predominan las actividades hemorrágicas (34).

Se realizó con un espectro de dosis desde 1.21 mg/kg a 8.911 mg/kg inyectando 0.5 mL por vía intraperitoneal. Los resultados para la dosis letal 50 se describen a continuación en la **Tabla 14** expresados en mg/kg, el cual es el valor que calcula el programa Toxicol y en µg/ratón las cuales son las unidades en la que usualmente se reporta la  $DL_{50}$  y sus respectivos límites de confianza al 95%.

<b>Tabla 14.</b> Dosis Letal 50 determinada para el veneno de <i>B. asper</i> proveniente de cada zona geográfica de Panamá.		
<b>Zona geográfica</b>	<b>DL<sub>50</sub> (mg/kg)</b>	<b>DL<sub>50</sub> (µg/ratón)</b>
<b>Zona 1</b>	5.18 (4.27-6.29)	104 (85-126)
<b>Zona 2</b>	4.13 (3.53-4.89)	91 (78-107)
<b>Zona 3</b>	3.68 (3.00-4.51)	73.6 (60-90)
<b>Zona 4</b>	4.90 (4.65-5.17)	98 (93-103)

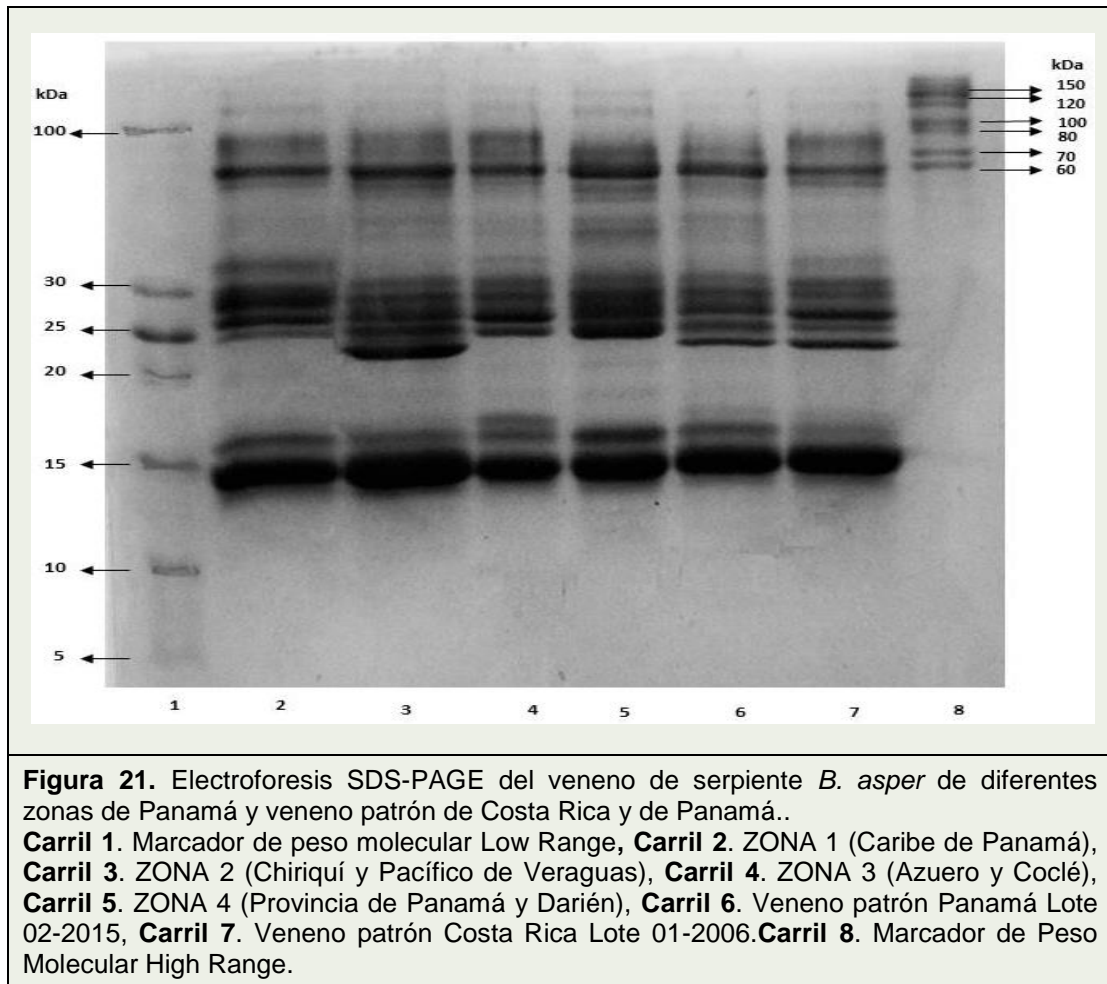
Los resultados se expresan en valor y límites de confianza al 95% entre paréntesis.

Las DL<sub>50</sub> que se obtuvieron para las 4 zonas se encontraron entre un rango de 73.6 - 104 µg/ratón. No se evidenció diferencias ya que los intervalos de confianza del 95% se traslaparon en las 4 zonas (Ver **Figura 20**). Los resultados son similares a los obtenidos en otros estudios utilizando la misma vía de administración y la misma metodología. Para el veneno patrón de *B. asper* de Panamá, refieren una DL<sub>50</sub> de 91.91 µg/ratón (75.63-111.70 µg/ratón) (25). Un valor alto comparado con lo reportado para *B. asper* de Costa Rica con una DL<sub>50</sub> de 61 µg/ratón (66-79 µg/ratón) (32) y *B. asper* de Colombia con una DL<sub>50</sub> de 66.2 µg/ratón (36) pero muy similar a lo reportado para *B. asper* de Ecuador con 91 µg/ratón (62).



#### 4.1.8. Patrón electroforético

El análisis de las bandas de proteínas obtenidas en condiciones reductoras muestra un perfil electroforético muy similar entre las diferentes zonas y comparable con el veneno patrón de referencia de *B. asper* de Panamá y el de Costa Rica (carril 7) Observando que todas las muestras contienen componentes con pesos moleculares de 60 kDa, entre 30 a 20 kDa y alrededor de 15 kDa. Además de que el veneno de la zona 2 (carril 3), correspondiente a Chiriquí y Pacífico de Veraguas, muestra una banda adicional de alta intensidad alrededor de los 20 kDa posiblemente a las múltiples isoformas de las proteínas que constituyen este veneno (**Figura 21**).



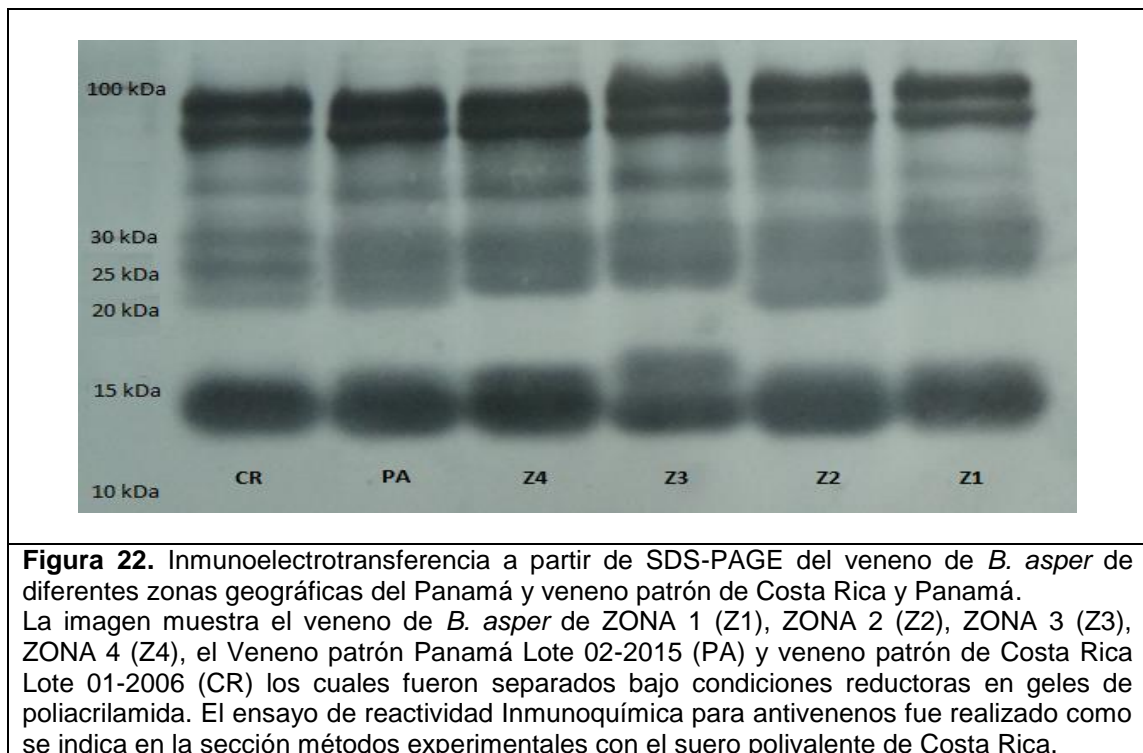
En los patrones electroforéticos obtenidos se detectaron ciertas diferencias especialmente en la zona 2 (Chiriquí y Pacífico de Veraguas) la cual presentó una banda adicional con peso molecular entre 20 a 25 kDa con respecto a las otras zonas.

En Costa Rica, estudios previos de la variación geográfica del veneno, han descrito la presencia de la PI-SVMP BaP1 con peso molecular de 23 kDa en el veneno de *B. asper* de la región pacífica, la cual se ha asociado a un papel predominante en la fisiopatología local, causando leve hemorragia y una

miotoxicidad moderada (29,30). Se requiere hacer más estudios para determinar si el veneno de *B. asper* de la zona 2 de Panamá, que limita con el Pacífico Costarricense, con una mayor actividad miotóxica que las demás y una banda electroforética adicional de 23 kDa, son debidos a la presencia de dicha proteína.

#### 4.1.9. Inmunoelectrotransferencia

El análisis de reactividad Inmunoquímica evidencio alto grado de reconocimiento inmunológico del antiveneno para la mayoría de las bandas electroforéticas presentes en los venenos de *B. asper* de las diferentes zonas de Panamá (Figura 22).



El análisis de inmunoelectrotransferencia evidencia que a pesar de esta variación, los patrones inmunológicos no se ven afectados y el antiveneno reconoce de forma similar la mayoría de las proteínas presentes para todas las zonas geográficas de Panamá.

#### 4.2. Componente 2: Estudio preclínico de la eficacia del antiveneno.

##### 4.2.1. Neutralización de la actividad letal de cada zona

En la **Tabla 15** se presenta la dosis reto utilizada para evaluar cada zona, la cual según revisión bibliográfica, la más utilizada es 4 veces la Dosis Letal 50 encontrada. Los resultados de la neutralización se presentan en una razón mg de veneno/ml de antiveneno, interpretada como los miligramos de veneno neutralizados por 1 mililitro de antiveneno. Algunos autores expresan las Dosis Efectivas en  $\mu\text{L}$  de veneno por mililitro de antiveneno.

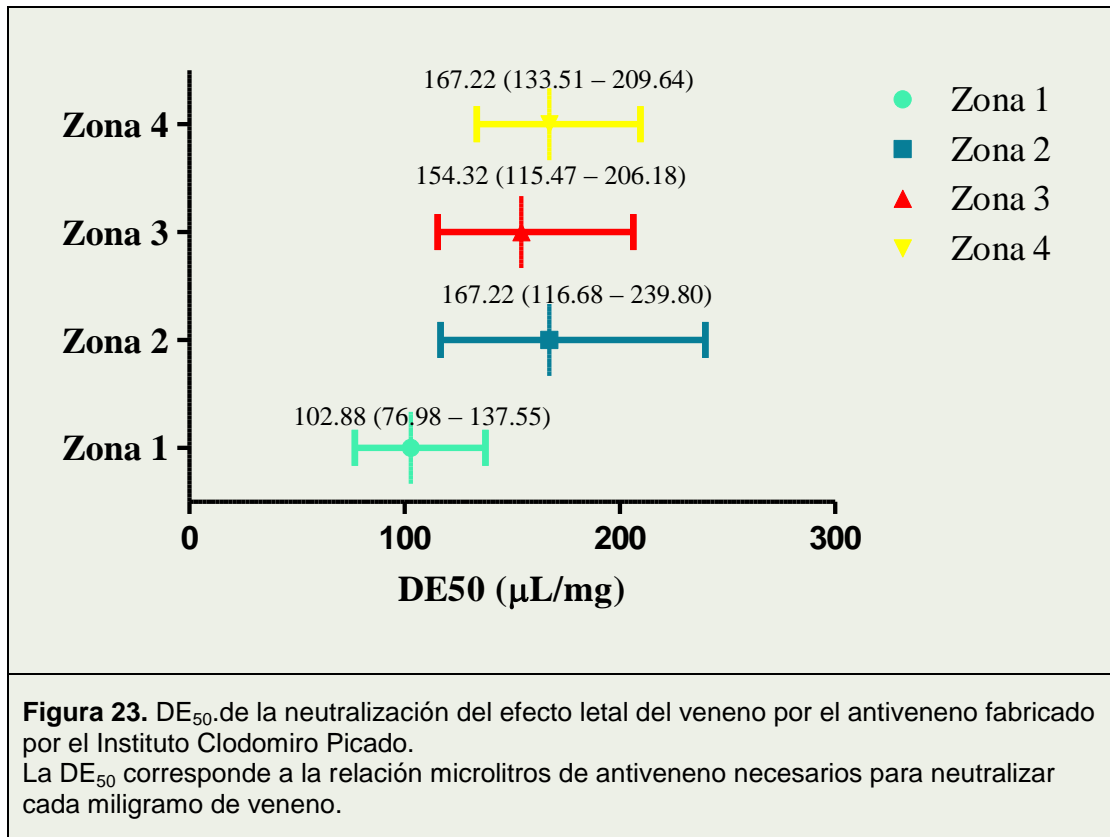
<b>Tabla 15. Dosis de Reto utilizada para la neutralización de la letalidad</b>	
<b>Zona</b>	<b>4 DL<sub>50</sub> (mg/kg)</b>
<b>1</b>	20.72
<b>2</b>	16.52
<b>3</b>	14.72
<b>4</b>	19.6

El antiveneno polivalente del Instituto Clodomiro Picado fue efectivo a nivel preclínico en la neutralización de la actividad letal de todas las zonas geográficas de Panamá. Con una razón veneno neutralizado por cada mL de antiveneno muy similares entre sí, con valores de 5.98 a 9.72 mg de veneno/mL de antiveneno, siendo el valor más alto el correspondiente a la zona 1 que abarca el caribe panameño (Ver **Tabla 16**).

<b>Tabla 16.</b> Resultados obtenidos para la neutralización del efecto letal por el antiveneno polivalente elaborado por el Instituto Clodomiro Picado de Costa Rica.		
<b>Zona</b>	<b>DE<sub>50</sub> (mg/mL)</b>	<b>DE<sub>50</sub> (µL/mg)</b>
<b>1</b>	9.72 (7.27 - 12.99)	102.88 (76.98 – 137.55)
<b>2</b>	5.98 (4.17 – 8.57)	167.22 (116.68 – 239.80)
<b>3</b>	6.48 (4.85 – 8.66)	154.32 (115.47 – 206.18)
<b>4</b>	5.98 (4.77 – 7.49)	167.22 (133.51 – 209.64)

Los resultados se muestran en mg/mL y en µL/mg al ser las unidades usualmente utilizadas en la literatura para este tipo de ensayo, con los límites de confianza al 95% en paréntesis.

El suero antiofídico polivalente utilizado para este ensayo, está compuesto por inmunoglobulinas equinas cuyo productor establece que cada mililitro de suero neutraliza no menos de 3 miligramos de veneno de *B. asper*, valor que fue superior en todas las zonas geográficas evaluadas. La DE<sub>50</sub> se publica usualmente como la relación microlitros de antiveneno necesarios para neutralizar cada miligramo de veneno (Ver **Figura 23**).



## CONCLUSIONES

En conclusión, se establece que el veneno de *B. asper* de Panamá de todas las zonas geográficas presenta un patrón toxicológico común bastante parecido entre sí, con ligeras variaciones según la zona geográfica donde habite la serpiente:

1. Se observó variación en las actividades hemorrágica, coagulante, hemolítica, miotóxica y en el patrón electroforético.
1. Se diferenció el veneno de la zona 4 la cual abarca la provincia de Panamá y Darién, la cual presentó menor capacidad hemorrágica y coagulante.
2. La zona 3 formada por la región de Azuero y Coclé, presentó menor actividad hemolítica indirecta.
3. Mientras que la zona 2 que incluye Chiriquí y el Pacífico de Veraguas presentó mayor miotoxicidad y una banda electroforética de 23 kDa, posiblemente por la presencia de la PI-SVMP BaP1.
4. Es importante destacar que la intensidad del efecto letalidad fue similar para todas las zonas.

5. La neutralización del efecto letal por el antiveneno fue efectiva para todas las zonas geográficas y no se vio afectada por las variaciones encontradas en este estudio.

## RECOMENDACIONES

Se recomienda seguir con el estudio de variación del veneno para realizar la identificación de proteínas que componen cada zona geográfica en las que se observó diferencias en su composición e intensidad para conocer dichas toxinas o isoformas de las mismas. Así mismo como se recomienda evaluar la neutralización de las diferentes actividades en cada zona por el antiveneno para poder evaluar la efectividad completa del Suero antiofídico. Además, se recomienda realizar una interrelación de los resultados obtenidos en este estudio con las manifestaciones clínicas y complicaciones reportadas en los pacientes con envenenamiento por mordedura de serpiente en las unidades de atención médica en las diferentes zonas del país ya que la mortalidad y sintomatología depende no solo de factores asociados a la serpiente involucrada.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Lomonte B. Venenos de serpiente: de la investigación al tratamiento. *Acta Med Costarric.* 2012;54(2):86–96.
2. Sasa M, Vazquez S. Snakebite envenomation in Costa Rica: A revision of incidence in the decade 1990-2000. *Toxicon.* 2003;41(1):19–22.
3. World Health Organization. Guidelines for the Production, Control and Regulation of Snake Antivenom Immunoglobulins. Geneva; 2010.
4. De Roodt AR, Estévez-Ramírez J, Paniagua-Solís JF, Litwin S, Carvajal-Saucedo A, Dolab JA, et al. Toxicidad de venenos de serpientes de importancia médica en México. *Gac Med Mex.* 2005;141(1):13–21.
5. Chippaux JP, Williams V, White J. Snake venom variability: methods of study, results and interpretation. *Toxicon.* 1991;29(11):1279–303.
6. Kasturiratne A, Wickremasinghe a. R, De Silva N, Gunawardena NK, Pathmeswaran A, Premaratna R, et al. The global burden of snakebite: A literature analysis and modelling based on regional estimates of envenoming and deaths. *PLoS Med.* 2008;5(11):1591–604.
7. Gutiérrez JM, León G, Burnouf T. Antivenoms for the treatment of snakebite envenomings: The road ahead. *Biologicals.* Elsevier Ltd; 2011;39(3):129–42.
8. Gutiérrez JM. Current challenges for confronting the public health problem of snakebite envenoming in Central America. *J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis.* 2014;20(1):7.
9. Valderrama OM, Acosta de Patiño H, Perdomo A. El accidente ofídico en Panamá. *Rev Médico Científica.* 2003;16:28–36.
10. Record J, Jované S, Silva S, Acosta de Patiño H. Casos de ofidismo atendidos en el Hospital Materno Infantil José Domingo de Obaldía, Chiriquí. 2007-2011. In: XV Congreso Nacional de Ciencia y Tecnología: Libro de resúmenes. Ciudad de Panamá, Panamá: APANAC; 2014.
11. Campbell JA, Lamar WW. The Venomous Reptiles of the Western

- Hemisphere. 1st ed. Ithaca: Cornell University Press; 2004.
12. Otero-Patiño R. Epidemiological, clinical and therapeutic aspects of *Bothrops asper* bites. *Toxicon*. 2009;54(7):998–1011.
  13. Gutiérrez JM. Reducing the impact of snakebite envenoming in Latin America and the Caribbean: Achievements and challenges ahead. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2014;108(9):530–7.
  14. Jorge MT, Ribeiro L a, O’Connell JL. Prognostic factors for amputation in the case of envenoming by snakes of the *Bothrops* genus (Viperidae). *Ann Trop Med Parasitol*. 1999;93(4):401–8.
  15. Alape-Girón A, Sanz L, Flores-Díaz M, Madrigal M, Sasa M, Calvete JJ. Snake Venomics of the Lancehead Pitviper *Bothrops asper*: Geographic , Individual , and Ontogenetic Variations. *J proteome*. 2008;7:3556–71.
  16. Calvete JJ, Sanz L, Pérez A, Borges A, Vargas AM, Lomonte B, et al. Snake population venomics and antivenomics of *Bothrops atrox*: Paedomorphism along its transamazonian dispersal and implications of geographic venom variability on snakebite management. *J Proteomics*. Elsevier B.V.; 2011;74(4):510–27.
  17. Gutiérrez JM, Chaves F, Bolaños R. Estudio comparativo de venenos de ejemplares recién nacidos y adultos de *Bothrops asper*. *Rev Biol Trop*. 1980;28(2):341–51.
  18. Gutiérrez JM. Envenenamientos por mordeduras de serpientes en América Latina y el Caribe: Una visión integral de carácter regional. *Bol Malariol y Salud Ambient*. 2011;51(1):1–16.
  19. Gutiérrez JM, Fan HW, Silvera CLM, Angulo Y. Stability, distribution and use of antivenoms for snakebite envenomation in Latin America: Report of a workshop. *Toxicon*. 2009;53(6):625–30.
  20. Sasa M, Wasko DK, Lamar WW. Natural history of the terciopelo *Bothrops asper* (Serpentes: Viperidae) in Costa Rica. *Toxicon*. Elsevier Ltd; 2009;54(7):904–22.
  21. Acosta de Patiño H, Gordón C, Leynaud G. Índice de vulnerabilidad a accidente ofídico por la serpiente *Bothrops asper* en Panamá. In: XIV Congreso Nacional de Ciencia y Tecnología: Libro de resúmenes. Ciudad de Panamá, Panamá: APANAC; 2012.
  22. Otero-Patiño R. Snake Bites in Colombia. *Clin Toxicol*. 2014;1–43.
  23. Rodríguez A, Acosta de Patiño H, Correa D, Saldaña J, Navarro D, Gordón C, et al. Distribución geográfica y potencial de serpientes venenosas, con

- énfasis en las vinculadas en accidentes ofídicos en Panamá. 2005-2011. In: XIV Congreso Nacional de Ciencia y Tecnología: Libro de resúmenes. Ciudad de Panamá, Panamá: APANAC; 2012.
24. Castillo E, Cleghorn J, Acosta de Patiño H, Otero R. Serpientes identificadas en accidente ofídico en Panamá. In: XV Congreso Nacional de Ciencia y Tecnología: Libro de resúmenes. Ciudad de Panamá, Panamá: APANAC; 2014.
  25. Uribe A, Fuentes H, Vega N, Martínez V, Correa D, Rodríguez A, et al. Caracterización inmunoquímica, farmacológica y toxicológica del veneno patrón de la serpiente *Bothrops asper* de la República de Panamá. In: XIII Congreso nacional de Ciencia y Tecnología: Libro de resúmenes. Ciudad de Panamá, Panamá: APANAC; 2010.
  26. Gutiérrez JM, Theakston RDG, Warrell D a. Confronting the neglected problem of snake bite envenoming: The need for a global partnership. PLoS Med. 2006;3(6):0727–31.
  27. Angulo Y, Lomonte B. Biochemistry and toxicology of toxins purified from the venom of the snake *Bothrops asper*. Toxicon. Elsevier Ltd; 2009;54(7):949–57.
  28. Gutiérrez JM, Rucavado A, Chaves F, Díaz C, Escalante T. Experimental pathology of local tissue damage induced by *Bothrops asper* snake venom. Toxicon. 2009;54(7):958–75.
  29. Gutiérrez JM, Romero M, Díaz C, Borkow G, Ovadia M. Isolation and characterization of a metalloproteinase with weak hemorrhagic activity from the venom of the snake *Bothrops asper* (terciopelo). Toxicon. 1995;33(1):19–29.
  30. Alape-Girón A, Flores-Díaz M, Sanz L, Madrigal M, Escolano J, Sasa M, et al. Studies on the venom proteome of *Bothrops asper*. Perspectives and applications. Toxicon. 2009;54(7):938–48.
  31. Bogarín G, Morais JF, Yamaguchi IK, Stephano MA, Marcelino JR, Nishikawa AK, et al. Neutralization of crotaline snake venoms from Central and South America by antivenoms produced in Brazil and Costa Rica. Toxicon. 2000;38(10):1429–41.
  32. Segura Á, Castillo MC, Núñez V, Yarlequé A, Gonçalves LRC, Villalta M, et al. Preclinical assessment of the neutralizing capacity of antivenoms produced in six Latin American countries against medically-relevant *Bothrops* snake venoms. Toxicon. Elsevier Ltd; 2010;56(6):980–9.
  33. Gutiérrez JM. Comprendiendo los venenos de serpientes: 50 años de investigaciones en América Latina. Rev Biol Trop.

<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/>; 2002;50(2):377–94.

34. Gutiérrez JM, Escalante T, Rucavado A. Experimental pathophysiology of systemic alterations induced by *Bothrops asper* snake venom. *Toxicon*. 2009;54(7):976–87.
35. Otero R, Gutiérrez J, Beatriz Mesa M, Duque E, Rodríguez O, Luis Arango J, et al. Complications of Bothrops, Porthidium, and Bothriechis snakebites in Colombia. A clinical and epidemiological study of 39 cases attended in a university hospital. *Toxicon*. 2002;40(8):1107–14.
36. Otero R, Núñez V, Barona J, Díaz A, Saldarriaga M. Características bioquímicas y capacidad neutralizante de cuatro antivenenos polivalentes frente a los efectos farmacológicos y enzimáticos del veneno de *Bothrops asper* y *Porthidium nasutum* de Antioquia y Chocó. *Iatreia*. 2002;15(1):5–15.
37. Otero R. Envenenamiento ofídico. In: *Pediatría tomo V: urgencias, neurología, oftalmología, otorrinolaringología, ortopedia*. 4a ed. Medellín, Colombia: CIB; 2014. p. 73–120.
38. Bon C. The serum-therapie was discovered 100 years ago. *Toxicon*. 1996;34(2):142–3.
39. Gutiérrez JM, Higashi HG, Wen FH, Burnouf T. Strengthening antivenom production in Central and South American public laboratories: report of a workshop. *Toxicon*. 2007;49(1):30–5.
40. Instituto-Clodomiro-Picado. El envenenamiento por mordedura de serpiente en Centroamérica. Costa Rica: Universidad de Costa Rica, Facultad de Microbiología; 2009. 1-27 p.
41. Gutiérrez JM, Sanz L, Flores-Díaz M, Figueroa L, Madrigal M, Herrera M, et al. Impact of regional variation in *Bothrops asper* snake venom on the design of antivenoms: Integrating antivenomics and neutralization approaches. *J Proteome Res*. 2010;9(1):564–77.
42. Castrillón-Estrada DF, Acosta Vélez JG, Hernández-Ruiz EA, Marina L, Palacio A. Envenenamiento ofídico. *Salud Uninorte*. 2007;23(1):96–111.
43. National Research Council (US) Committee for the Update of the Guide for the Care and Use of Laboratory animals. *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*. 8th ed. *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*. Washington, D.C.: National Academies Press (US); 2011. 246 p.
44. Kondo H, Kondo S, Irezawa H, Murata R. Studies on the quantitative method for determination of hemorrhagic activity of Habu snake venom. *Japanese J Med Sci Biol*. 1960;13:43–51.

45. Gutiérrez JM, Gené JA, Rojas G, Cerdas L. Neutralization of proteolytic and hemorrhagic activities of Costa Rican snake venoms by a polyvalent antivenom. *Toxicon*. 1985;23:887–93.
46. Theakston RDG. The application of immunoassay techniques, including enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), to snake venom research. *Toxicon*. Pergamon; 1983 Jan;21(3):341–52.
47. Gené JA, Roy A, Rojas G, Gutiérrez JM, Cerdas L. Comparative study on coagulant, defibrinating, fibrinolytic and fibrinogenolytic activities of Costa Rican crotaline snake venoms and their neutralization by a polyvalent antivenom. *Toxicon*. 1989;27(8):841–8.
48. Gutiérrez JM, Avila C, Rojas E, Cerdas L. An alternative in vitro method for testing the potency of the polyvalent antivenom produced in Costa Rica. *Toxicon*. 1988;26(4):411–3.
49. Otero R, Osorio RG, Valderrama R, Giraldo CA. Efectos farmacológicos y enzimáticos de los venenos de serpientes de Antioquia y Choco (Colombia). *Toxicon*. 1992;30(5):611–20.
50. Chaves F, Barboza M, Gutiérrez JM. Pharmacological study of edema induced by venom of the snake *Bothrops asper* (terciopelo) in mice. *Toxicon*. 1995;33(1):31–9.
51. Gutiérrez JM, Arroyo O, Bolaños R. Mionecrosis, hemorragia y edema inducidos por el veneno de *Bothrops asper* en ratón blanco. *Toxicon*. 1980;18(5-6):603–10.
52. World Health Organization. Progress in the characterization of venoms and standardization of antivenoms. WHO offset publication. 1981. p. 1–44.
53. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970;227:680–5.
54. Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1979;76(9):4350–4.
55. Lomonte B. *Inmunología General, Manual de Laboratorio*. San José: Facultad de Microbiología, Universidad de Costa Rica; 2002. 102-111 p.
56. Gutiérrez JM, Rojas G, Bogarín G, Lomonte B. Evaluation of the neutralizing ability of antivenoms for the treatment of snakebite envenomations in central America. *Toxicon*. 1996;34(2):149–50.
57. Martínez-González MA, Almudena S-V, Faulin Fajargo J. *Bioestadística Amigable*. 2nd ed. España: Díaz de Santos; 2008. 919 p.

58. Lanari LC, Rosset S, González ME, Liria N, de Roodt AR. A study on the venom of *Bothrops alternatus* duméril, bibron and duméril, from different regions of Argentina. *Toxicon*. 2010;55(8):1415–24.
59. Rojas G, Gutiérrez JM, Gené JA, Gómez M, Cerdas L. Neutralización de las actividades tóxicas y enzimáticas de cuatro venenos de serpientes de Guatemala y Honduras por el antiveneno polivalente producido en Costa Rica. *Rev Biol Trop*. 1987;35(1):59–67.
60. Quintero A. The venom of *Bothrops asper* from Panamá: Biochemical characterization and toxic activities. *J Venom Anim Toxins incl Trop Dis*. IX Symposium of the Brazilian Society on Toxinology; 2007;13(1):316.
61. Segura Á, Herrera M, Villalta M, Vargas M, Uscanga-Reynell A, de León-Rosales SP, et al. Venom of *Bothrops asper* from Mexico and Costa Rica: Intraspecific variation and cross-neutralization by antivenoms. *Toxicon*. Elsevier Ltd; 2012;59(1):158–62.
62. Laines J, Segura Á, Villalta M, Herrera M, Vargas M, Alvarez G, et al. Toxicity of *Bothrops* sp snake venoms from Ecuador and preclinical assessment of the neutralizing efficacy of a polyspecific antivenom from Costa Rica. *Toxicon*. 2014;88(June):34–7.

## **ANEXOS**

## ANEXO 1. Análisis estadístico de la DHm con el Programa GRAPH PAD PRISM

	DHM
<b>KS normality test</b>	
KS distance	0.2294
P value	0.0597
Passed normality test (alpha=0.05)?	Yes
P value summary	ns
<b>D'Agostino &amp; Pearson omnibus normality test</b>	
K2	2.394
P value	0.3021
Passed normality test (alpha=0.05)?	Yes
P value summary	ns

	Zona 1	Zona 2	Zona 3	Zona 4
Number of values	3	4	3	3
Minimum	2.390	1.530	1.420	4.890
25% Percentile	2.390	1.580	1.420	4.890
Median	2.640	2.225	1.460	5.220
75% Percentile	2.650	3.058	1.930	5.330
Maximum	2.650	3.170	1.930	5.330
Mean	2.560	2.288	1.603	5.147
Std. Deviation	0.1473	0.7854	0.2836	0.2290
Std. Error	0.08505	0.3927	0.1637	0.1322
Lower 95% CI of mean	2.194	1.038	0.8988	4.578
Upper 95% CI of mean	2.926	3.537	2.308	5.715
Coefficient of variation	5.75%	34.33%	17.69%	4.45%
Sum	7.680	9.150	4.810	15.44

Table Analyzed DHm *B. asper*

### One-way analysis of variance

P value	< 0.0001
P value summary	***
Are means signif. different? (P < 0.05)	Yes
Number of groups	4
F	30.57
R square	0.9106

ANOVA Table	SS	df	MS
Treatment (between columns)	22.00	3	7.335
Residual (within columns)	2.160	9	0.2400
Total	24.16	12	

<b>Tukey's Multiple Comparison Test</b>	Mean Diff.	q	Significant? P < 0.05?	Summary	95% CI of diff
Zona 1 vs Zona 2	0.2725	1.030	No	ns	-0.8955 to 1.440
Zona 1 vs Zona 3	0.9567	3.383	No	ns	-0.2920 to 2.205
Zona 1 vs Zona 4	-2.587	9.146	Yes	***	-3.835 to -1.338
Zona 2 vs Zona 3	0.6842	2.586	No	ns	-0.4838 to 1.852
Zona 2 vs Zona 4	-2.859	10.81	Yes	***	-4.027 to -1.691
Zona 3 vs Zona 4	-3.543	12.53	Yes	***	-4.792 to -2.295

## ANEXO 2. Análisis estadístico de la DCM con el Programa GRAPH PAD PRISM

	DCM
<b>KS normality test</b>	
KS distance	0.1599
P value	> 0.10
Passed normality test (alpha=0.05)?	Yes
P value summary	ns
<b>D'Agostino &amp; Pearson omnibus normality test</b>	
K2	4.396
P value	0.111
Passed normality test (alpha=0.05)?	Yes
P value summary	ns

	Zona 1	Zona 2	Zona 3	Zona 4
Number of values	3	3	3	3
Minimum	0.1800	0.3600	0.2000	0.7000
25% Percentile	0.1800	0.3600	0.2000	0.7000
Median	0.2800	0.5700	0.2500	0.7200
75% Percentile	0.3100	0.6400	0.4200	0.7600
Maximum	0.3100	0.6400	0.4200	0.7600
Mean	0.2567	0.5233	0.2900	0.7267
Std. Deviation	0.06807	0.1457	0.1153	0.03055
Std. Error	0.03930	0.08413	0.06658	0.01764
Lower 95% CI of mean	0.08758	0.1614	0.003516	0.6508
Upper 95% CI of mean	0.4258	0.8853	0.5765	0.8026
Sum	0.7700	1.570	0.8700	2.180
TableAnalyzed	DCM	B. asper		

### One-way analysis of variance

P value	0.0014
P valuesummary	**
Are means signif. different? (P < 0.05)	Yes
Number of groups	4
F	14.45
R square	0.8442

ANOVA Table	SS	df	MS
Treatment (between columns)	0.4347	3	0.1449
Residual (within columns)	0.08020	8	0.01003
Total	0.5149	11	

### Tukey's Multiple Comparison

Test	Mean Diff.	q	Significant? P < 0.05?	Summary	95% CI of diff
Zona 1 vs Zona 2	-0.2667	4.613	Yes	*	-0.5285 to -0.004858
Zona 1 vs Zona 3	-0.03333	0.5766	No	ns	-0.2951 to 0.2285
Zona 1 vs Zona 4	-0.4700	8.130	Yes	**	-0.7318 to -0.2082
Zona 2 vs Zona 3	0.2333	4.036	No	ns	-0.02848 to 0.4951
Zona 2 vs Zona 4	-0.2033	3.517	No	ns	-0.4651 to 0.05848
Zona 3 vs Zona 4	-0.4367	7.554	Yes	**	-0.6985 to -0.1749

### ANEXO 3. Análisis estadístico de la Actividad mitotóxica con el Programa GRAPH PAD PRISM

	Miotóxica
<b>KS normality test</b>	
KS distance	0.08494
P value	> 0.10
Passed normality test (alpha=0.05)?	Yes
P value summary	ns
<b>D'Agostino &amp; Pearson omnibus normality test</b>	
K2	0.9108
P value	0.6342
Passed normality test (alpha=0.05)?	Yes
P value summary	ns

	Zona 1	Zona 2	Zona 3	Zona 4	Control	Patrón CR	Patrón PAN
<b>Number of values</b>	14	15	15	14	13	4	4
<b>Minimum</b>	566.7	6767	5505	5602	56.67	8411	6776
<b>25% Percentile</b>	7332	14960	8645	6759	263.1	8975	8014
<b>Median</b>	11798	17420	12661	8334	420.9	12078	12345
<b>75% Percentile</b>	13782	21047	16546	11570	947.1	16698	13422
<b>Maximum</b>	15526	28203	18950	20537	2032	17769	13575
<b>Mean</b>	10432	17590	12231	10122	643.6	12584	11260
<b>Std. Deviation</b>	4103	5284	4168	4858	551.1	4032	3087
<b>Std. Error</b>	1096	1364	1076	1298	152.9	2016	1543
<b>Lower 95% CI</b>	8063	14664	9923	7317	310.5	6167	6349
<b>Upper 95% CI</b>	12800	20517	14539	12926	976.6	19000	16172

Table Analyzed Miotóxica *B. asper*

#### One-way analysis of variance

<b>P value</b>	< 0.0001
<b>P value summary</b>	***
<b>Are means signif. different? (P &lt; 0.05)</b>	Yes
<b>Number of groups</b>	7
<b>F</b>	20.14
<b>R square</b>	0.6267

ANOVA Table	SS	df	MS
Treatment (between columns)	2083000000	6	347100000
Residual (within columns)	1241000000	72	17230000
Total	3323000000	78	

Tukey's Multiple Comparison Test	Mean Diff.	q	Significant? P < 0.05?	Summary	95% CI of diff
<b>Zona 1 vs Zona 2</b>	-7159	6.563	Yes	***	-11849 to -2469
<b>Zona 1 vs Zona 3</b>	-1799	1.65	No	ns	-6489 to 2890
<b>Zona 1 vs Zona 4</b>	309.9	0.2794	No	ns	-4460 to 5080
<b>Zona 1 vs Control</b>	9788	8.658	Yes	***	4927 to 14649
<b>Zona 1 vs Patrón CR</b>	-2152	1.293	No	ns	-9307 to 5003
<b>Zona 1 vs Patrón PAN</b>	-828.6	0.4979	No	ns	-7983 to 6326
<b>Zona 2 vs Zona 3</b>	5359	5	Yes	*	751.3 to 9968
<b>Zona 2 vs Zona 4</b>	7469	6.847	Yes	***	2779 to 12159
<b>Zona 2 vs Control</b>	16947	15.24	Yes	***	12165 to 21729
<b>Zona 2 vs Patrón CR</b>	5007	3.031	No	ns	-2095 to 12108
<b>Zona 2 vs Patrón PAN</b>	6330	3.832	No	ns	-771.4 to 13432
<b>Zona 3 vs Zona 4</b>	2109	1.934	No	ns	-2580 to 6799
<b>Zona 3 vs Control</b>	11587	10.42	Yes	***	6805 to 16370
<b>Zona 3 vs Patrón CR</b>	-352.7	0.2135	No	ns	-7454 to 6749
<b>Zona 3 vs Patrón PAN</b>	970.9	0.5878	No	ns	-6131 to 8073
<b>Zona 4 vs Control</b>	9478	8.383	Yes	***	4617 to 14339
<b>Zona 4 vs Patrón CR</b>	-2462	1.479	No	ns	-9617 to 4693
<b>Zona 4 vs Patrón PAN</b>	-1139	0.6841	No	ns	-8293 to 6016
<b>Control vs Patrón CR</b>	-11940	7.114	Yes	***	-19156 to -4724
<b>Control vs Patrón PAN</b>	-10617	6.326	Yes	***	-17832 to -3401
<b>Patrón CR vs Patrón PAN</b>	1324	0.6377	No	ns	-7600 to 10247

## ANEXO 4. Análisis estadístico de la DHIm con el Programa GRAPH PAD PRISM

D'Agostino & Pearson omnibus normality test					
K2	4.724				
P value	0.0942				
Passed normality test (alpha=0.05)?				Yes	
P value summary				ns	
	Zona 1	Zona 2	Zona 3	Zona 4	
Number of values	3	3	3	3	
Minimum	0.4000	0.4500	0.7000	0.5000	
25% Percentile	0.4000	0.4500	0.7000	0.5000	
Median	0.4200	0.5000	0.8100	0.5300	
75% Percentile	0.5000	0.5100	0.9000	0.5400	
Maximum	0.5000	0.5100	0.9000	0.5400	
Mean	0.4400	0.4867	0.8033	0.5233	
Std. Deviation	0.05292	0.03215	0.1002	0.02082	
Std. Error	0.03055	0.01856	0.05783	0.01202	
Lower 95% CI of mean	0.3086	0.4068	0.5545	0.4716	
Upper 95% CI of mean	0.5714	0.5665	1.052	0.5750	
Sum	1.320	1.460	2.410	1.570	
Table Analyzed	DHIm				
<b>One-way analysis of variance</b>					
P value	0.0003				
P value summary	***				
Are means signif. different? (P < 0.05)	Yes				
Number of groups	4				
F	22.46				
R square	0.8939				
<b>ANOVA Table</b>	SS	df	MS		
Treatment (between columns)	0.2409	3	0.08029		
Residual (within columns)	0.0286	8	0.003575		
Total	0.2695	11			
<b>Tukey's Multiple Comparison Test</b>	Mean Diff.	q	Significant? P < 0.05?	Summary	95% CI of diff
Zona 1 vs Zona 2	-0.04667	1.352	No	ns	-0.2030 to 0.1097
Zona 1 vs Zona 3	-0.3633	10.53	Yes	***	-0.5197 to -0.2070
Zona 1 vs Zona 4	-0.08333	2.414	No	ns	-0.2397 to 0.07301
Zona 2 vs Zona 3	-0.3167	9.173	Yes	***	-0.4730 to -0.1603
Zona 2 vs Zona 4	-0.03667	1.062	No	ns	-0.1930 to 0.1197
Zona 3 vs Zona 4	0.2800	8.111	Yes	**	0.1237 to 0.4363

## ANEXO 5. Casos de mordedura de ofidio por región, años 1984-2014

**MINISTERIO DE SALUD DE PANAMÁ**  
**DIRECCIÓN GENERAL DE SALUD PÚBLICA**  
**DEPARTAMENTO DE EPIDEMIOLOGÍA**  
**CASOS DE MORDEDURA DE OFIDIO POR REGIÓN, AÑOS 1984 – 2014(P)**

REGIONES	1984	1985	1986	1987	1988	1989	1990	1991	1992	1993	1994	1995
<b>TOTAL</b>	<b>29</b>	<b>149</b>	<b>500</b>	<b>526</b>	<b>551</b>	<b>615</b>	<b>826</b>	<b>1146</b>	<b>1066</b>	<b>1185</b>	<b>1238</b>	<b>1127</b>
BOCAS DEL TORO	0	6	30	16	13	5	24	27	40	50	17	43
COCLÉ	0	23	33	55	52	3	49	51	88	109	89	113
COLÓN	0	5	61	68	38	38	42	122	103	123	108	80
CHIRIQUI	0	51	164	192	194	196	202	185	239	234	212	203
DARIÉN	3	1	16	4	13	3	13	24	43	49	47	38
HERRERA												
	<b>A Z U E R O</b>											
LOS SANTOS	0	11	41	92	101	95	42	161	116	129	174	77
METROPOLITANA	14	24	55	35	46	156	172	97	59	86	86	50
PANAMÁ ESTE	6	5	2	14	14	58	41	26	34	27	99	96
PANAMÁ OESTE	1	19	95	47	68	57	58	155	102	90	104	123
SAN MIGUELITO	DATOS INCLUIDOS EN LA REGIÓN METROPOLITANA						0	5	1	0	0	2
KUNA YALA	2	1	0	0	0	0	1	0	5	2	4	4
VERAGUAS	3	3	3	3	12	4	182	298	236	286	298	201
NGOBE BUGLE	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

REGIONES	1996	1997	1998	1999	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007
<b>TOTAL</b>	<b>1155</b>	<b>1388</b>	<b>1324</b>	<b>1425</b>	<b>1858</b>	<b>1583</b>	<b>1551</b>	<b>1503</b>	<b>1380</b>	<b>1648</b>	<b>1716</b>	<b>1620</b>
BOCAS DEL TORO	45	53	72	52	70	65	98	132	85	98	71	86
COCLÉ	132	160	129	213	174	221	283	188	179	226	254	297
COLÓN	65	84	83	141	118	100	74	97	46	44	113	109
CHIRIQUI	253	311	393	291	410	371	491	346	369	379	488	417
DARIÉN	22	18	19	22	40	82	77	77	28	45	29	26
HERRERA	71	74	36	97	98	65	41	79	133	124	74	83
LOS SANTOS	76	66	68	82	109	85	72	74	98	116	73	78
METROPOLITANA	102	167	130	165	99	99	75	82	85	139	127	100
PANAMÁ ESTE	53	63	66	80	127	96	100	137	109	111	118	136
PANAMÁ OESTE	124	136	87	124	544	236	163	180	171	212	234	184
SAN MIGUELITO	0	0	0	7	27	37	55	3	20	66	36	21
KUNA YALA	0	0	4	7	1	1	4	3	1	2	1	1
VERAGUAS	212	256	237	144	41	125	11	100	47	65	66	54
NGOBE BUGLE							7	5	9	21	32	28

**ANEXO 5. Casos de mordedura de ofidio por región, años 1984-2014  
(Continuación)**

<b>REGIONES</b>	<b>2008</b>	<b>2009</b>	<b>2010</b>	<b>2011</b>	<b>2012</b>	<b>2013</b>	<b>2014</b>
<b>TOTAL</b>	<b>1863</b>	<b>2203</b>	<b>2298</b>	<b>1793</b>	<b>1774</b>	<b>1669</b>	<b>431</b>
BOCAS DEL TORO	124	104	125	85	135	113	73
COCLÉ	324	300	387	251	212	287	59
COLÓN	130	106	44	27	88	95	25
CHIRIQUI	412	526	600	387	304	302	64
DARIÉN	46	71	74	40	22	28	16
HERRERA	76	94	64	56	61	76	19
LOS SANTOS	45	23	24	43	78	29	9
METROPOLITANA	128	172	121	57	65	35	13
PANAMÁ ESTE	135	88	111	106	84	44	7
PANAMÁ OESTE	182	175	131	157	196	187	43
SAN MIGUELITO	63	44	10	58	56	43	20
KUNA YALA	1	2	2	3	3	2	1
VERAGUAS	159	450	554	335	284	343	82
NGOBE BUGLÉ	38	48	51	188	186	85	0

(p) Cifras Preliminares

**FUENTE:** Departamento de Epidemiología / Sección de Estadística/ Informes Epidemiológicos Mensuales de las regiones de Salud.

**NOTA:**

1984 - 1994: La Región de Herrera y Los Santos estaban unidas como Región de Azuero

1984 - 1989: La Región de San Miguelito estaba incluida en la Región Metropolitana.

GCHIARI 11/02/2014

**ANEXO 6. Defunciones por contacto traumático con serpientes y lagartos venenosos según provincia y comarca indígena de residencia. Años 2001-2012.**

REPUBLICA DE PANAMÁ  
 CONTRALORÍA GENERAL DE LA REPÚBLICA  
 Instituto Nacional de Estadísticas y Censo  
**DEFUNCIONES POR CONTACTO TRAUMÁTICO CON SERPIENTES Y  
 LAGARTOS VENENOSOS, SEGÚN PROVINCIA Y COMARCA INDÍGENA DE  
 RESIDENCIA: AÑOS 2001-2012**

Provincia y comarca indígena de residencia	Defunciones por contacto traumático con serpientes y lagartos venenosos (1)											
	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012
<b>TOTAL.....</b>	<b>18</b>	<b>17</b>	<b>17</b>	<b>21</b>	<b>19</b>	<b>22</b>	<b>16</b>	<b>13</b>	<b>18</b>	<b>13</b>	<b>9</b>	<b>8</b>
Bocas del Toro.....	1	-	2	1	-	-	1	-	-1	-	1	-
Coclé.....	1	2	2	4	2	3	1	2	2	-	1	2
Colón.....	-	-	-	1	1	-	2	-	1	1	-	-
Chiriquí.....	-	1	1	1	-	1	1	-	1	2	-	-
Darión.....	1	-	3	2	1	1	2	1	1	1	-	-
Herrera.....	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Los Santos.....	-	-	-	-	2	-	-	-	-	-	-	-
Penamá.....	5	5	3	1	2	1	2	2	1	1	2	1
Veraguas.....	5	5	1	5	8	9	2	2	2	3	2	2
Comarca Kuna Yala.....	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	1	-
Comarca Emberá.....	1	-	1	-	-	-	-	1	2	-	-	-
Comarca Ngöbe Buglé.....	3	4	3	6	3	7	5	5	7	5	2	3

NOTA: Aunque el nombre de la causa involucra a lagartos venenosos, en nuestro país, casi la totalidad de los casos se refieren a serpientes.

(1) Con base en la Lista Detallada de Mortalidad de la Clasificación Estadística Internacional de Enfermedades y Problemas Relacionados con la Salud (Décima Revisión).

- Cantidad nula o cero.