

UNIVERSIDAD DE PANAMÁ
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES, EXACTAS Y TECNOLOGÍA
ESCUELA DE BIOLOGÍA

CARACTERIZACIÓN TOXICOLÓGICA DEL VENENO DE LA SERPIENTE
PORTHIDIUM LANSBERGII JUVENILES Y ADULTOS DE PANAMÁ, EN RATONES
DE LA CEPA CD-1

AUTORES:

BENILDA DOMÍNGUEZ

LUIS VARGAS

**TRABAJO DE GRADUACIÓN PARA OPTAR POR
EL TÍTULO DE LICENCIADOS EN BIOLOGÍA
CON ORIENTACIÓN EN ZOOLOGÍA**

REPÚBLICA DE PANAMÁ

2022

DEDICATORIA

Este trabajo de graduación lo dedico principalmente a mis padres y hermanos por su apoyo incondicional en cada momento de mi vida; a mi abuela Eulalia que no está presente físicamente, pero me ha acompañado siempre; a mi abuela María que con su carisma me ha inspirado a ser mejor persona; a mis demás familiares y amigos que me han apoyado en cada momento cuando los necesité.

Benilda Domínguez

DEDICATORIA

Esta tesis es dedicada a mis padres, por el apoyo incondicional que siempre me han dado: a mis hermanos por orientarme en cada meta, objetivo de mi vida para llegar a ser la persona que soy. Agradezco también a la profesora Yeniveth, que desde mi niñez ha inspirado el amor por esta carrera de las ciencias biológicas.

A mis grandes amigos que están presentes en los momentos más inolvidables y que creen en mí; un reconocimiento especial a todas las personas que sufrido las secuelas de estos accidentes ofídicos.

Luis Vargas

AGRADECIMIENTOS

Estamos muy agradecidos con Dios por ser nuestra principal fortaleza, por brindarnos sabiduría para cumplir esta meta, por ser nuestra luz en el camino.

A nuestras familias que nos apoyaron y motivaron en cada momento y etapa de nuestro trabajo.

Agradecemos –especialmente- a la profesora Alina Uribe por su paciencia y comprensión, quien nos guió y apoyó desde el inicio, nos alentó y exhortó en cada momento difícil que atravesamos durante el desarrollo de este trabajo.

A las profesoras Lesbia De Gracia y Leandra Gómez por no dudar de nuestras potencialidades y compartir sus conocimientos en esta investigación. A la licenciada Maricruz Morán por ayudarnos en el proceso de ensayos y prácticas de laboratorio.

A la profesora Hildauro Acosta por permitirnos formar parte del proyecto y a todo el equipo del CIIMET de Veraguas y Panamá: Eduardo Zambrano, María García y Julio Saldaña. Además, extendemos el agradecimiento al biólogo David Correa por su participación en la extracción del veneno de las serpientes.

Agradecemos al SENACYT por los fondos que se obtuvieron para financiar y poder desarrollar el proyecto “Caracterización toxicológica, enzimática, inmunoquímica y proteómica del veneno de la serpiente *Porthidium lansbergii* de Panamá “ FID18-083.



TRIBUNAL EXAMINADOR

Título:

**“CARACTERIZACIÓN TOXICOLÓGICA DEL VENENO DE LA SERPIENTE
PORTHIDIUM LANSBERGII JUVENILES Y ADULTOS DE PANAMÁ, EN
RATONES DE LA CEPA CD-1”**

Por:

Benilda Eizenith Domínguez Arcia

2-744-1608

Luis Antonio Vargas Valdes

2-744-629

Trabajo de Graduación presentado a consideración de la Escuela de Biología como requisito parcial para optar por el título de Licenciatura en Biología con Orientación en Biología Animal

Mgtra. Lesbia De Gracia

Mgtra. Alina Uribe

Mgtra. Leandra Gómez

ÍNDICE GENERAL

DEDICATORIA.....	II
DEDICATORIA.....	III
AGRADECIMIENTOS	IV
ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS	XI
RESUMEN	XII
INTRODUCCIÓN	XIII
CAPÍTULO I MARCO TEÓRICO.....	1
1.1 Antecedentes	2
1.1.1. Epidemiología del accidente ofídico	3
1.2. Familia Viperidae	4
1.2.1. Género <i>Porthidium</i>	6
1.2.1.1. Especie <i>Porthidium lansbergii</i>	6
1.3. Fisiopatología del envenenamiento ofídico	8
1.3.1. Efectos locales:.....	11
1.3.1.1. Hemorragia:.....	12
1.3.1.2. Miotoxicidad	12
1.3.2. Efectos sistémicos.....	13
1.3.2.1. Desfibrinación.....	14
1.3.2.2. Letalidad.....	15
1.3.3. Envenenamiento por <i>Porthidium lansbergii</i>	19
1.3.4. Familias de proteínas presentes en el veneno de <i>Porthidium lansbergii</i>	19
1.4. Generalidades del estudio.....	22
1.4.1. Planteamiento del problema:	22
1.4.2. Objetivos.....	23
1.4.2.1. Objetivo general	23
1.4.2.2. Objetivos específicos.....	23
1.4.3. Hipótesis.....	24

1.4.4. Justificación:.....	24
CAPÍTULO II METODOLOGÍA.....	26
2.1. Tipo y diseño general del estudio.....	27
2.2. Materiales.....	27
2.2.1. Muestras.....	27
2.2.2. Lugar de estudio.....	28
2.2.3. Animales experimentales.....	28
2.3. Técnicas para evaluación in vivo del veneno.....	29
2.3.1. Vías de administración del veneno.....	29
2.3.2. Evaluación de efectos locales:.....	30
2.3.2.1. Actividad hemorrágica.....	30
2.3.2.2. Actividad miotóxica.....	32
2.3.3. Evaluación de efectos sistémicos:.....	34
2.3.3.1. Actividad desfibrinante.....	34
2.3.3.2. Actividad letal (DL ₅₀).....	35
2.4. Análisis de datos:.....	36
CAPITULO III RESULTADOS.....	37
3.1. Efectos locales.....	40
3.1.1. Actividad hemorrágica.....	40
3.1.2. Actividad miotóxica.....	45
3.2. Efectos sistémicos.....	49
3.2.1. Actividad desfibrinante.....	49
3.2.2. Actividad letal.....	52
CAPÍTULO IV DISCUSIÓN.....	56
CONCLUSIONES.....	64
RECOMENDACIONES.....	66
REFERENCIAS.....	68
ANEXOS.....	81

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.	Principales componentes tóxicos del veneno de vipéridos de América.	10
Tabla 2.	Cuadro de resumen comparativo de algunos efectos toxicológicos del género <i>Porthidium</i> estudiados en la región.	17
Tabla 3.	Proteínas presentes en los venenos de <i>P. lansbergii</i> juveniles y adultos de Panamá.	21
Tabla 4.	Resultados de los efectos toxicológicos de los venenos de <i>P. lansbergii</i> juveniles y adultos evaluados en los ratones de la cepa CD-1.....	39
Tabla 5.	Diámetros de las áreas hemorrágicas ocasionados por la inoculación de diferentes dosis de los venenos de <i>P. lansbergii</i> juveniles y adultos.....	43
Tabla 6.	Actividad CK en sangre producida por los venenos de <i>P. lansbergii</i> juveniles y adultos en los ratones.	46
Tabla 7.	Signos observados en los ratones con dosis de 50 µg y 100 µg de veneno.	51
Tabla 8.	Determinación de la DL ₅₀ en ratones de la cepa CD-1 al aplicar diferentes dosis de los venenos de <i>P. lansbergii</i> juveniles y adultos.....	53
Tabla 9.	Letalidad de los venenos de <i>P. lansbergii</i> juveniles y adultos de Panamá.	53

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Foseta loreal en vipéridos.....	5
Figura 2.	Ejemplares de <i>Porthidium lansbergii</i> juvenil y adulto.....	7
Figura 3.	Mapa de distribución de <i>Porthidium lansbergii</i> en Panamá.	8
Figura 4.	Composición del veneno de <i>P. lansbergii lansbergii</i> de Colombia.	20
Figura 5.	Muestras liofilizadas de los venenos de <i>P. lansbergii</i> adultos (izquierda) y juveniles (derecha) utilizados en el procedimiento experimental.	28
Figura 6.	Ratones de la cepa CD-1.	29
Figura 7.	Niveles utilizados en las pruebas de la actividad hemorrágica.....	31
Figura 8.	Inyección por la vía intradérmica en el abdomen del ratón.....	31
Figura 9.	Procedimiento empleado para evaluar la actividad miotóxica.	33
Figura 10.	Procedimiento empleado para la evaluación de la actividad desfibrinante.....	35
Figura 11.	Grupos experimentales de ratones utilizados en la prueba de letalidad.	36
Figura 12.	Inyección por vía intraperitoneal.....	36
Figura 13.	Áreas hemorrágicas producidas por la inyección intradérmica de diferentes dosis de veneno de <i>P. lansbergii</i> juveniles en ratones CD-1... ..	41
Figura 14.	Áreas hemorrágicas producidas por la inyección intradérmica de diferentes dosis de veneno de <i>P. lansbergii</i> adultos en ratones CD-1.	42
Figura 15.	Diámetros de las áreas hemorrágicas vs dosis de los venenos de <i>P. lansbergii</i> juveniles y adultos.....	44
Figura 16.	Comparación de las áreas hemorrágicas producidas por la inyección intradérmica de los venenos de <i>P. lansbergii</i> y <i>B. asper</i>	45

Figura 17.	Actividad de la CK en la sangre de los ratones inoculados con el veneno de <i>P. lansbergii</i> juveniles.....	46
Figura 18.	Actividad de la CK en la sangre de los ratones inoculados con el veneno de <i>P. lansbergii</i> adultos.	47
Figura 19.	Actividad de la CK en la sangre de los ratones inoculados con 50 µg de los venenos de las serpientes juveniles y adultas.	47
Figura 20.	Efecto necrótico observado en el sitio de la inoculación.	48
Figura 21.	Comparación de la necrosis producida por los venenos de <i>P. lansbergii</i> juveniles y adultos.	49
Figura 22.	Coagulación normal de la sangre en presencia del veneno de serpientes adultas.	50
Figura 23.	Comparación entre la actividad desfibrinante ocasionada por venenos de <i>P. lansbergii</i> juveniles y <i>B. asper</i>	51
Figura 24.	Signos observados en los ratones inoculados con los venenos de <i>P. lansbergii</i> juveniles y adultos al evaluar la actividad desfibrinante.	52
Figura 25.	Signos observados en los ratones durante la evaluación de la actividad letal con los venenos de <i>P. lansbergii</i>	55

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1.	Algunas características de la familia Viperidae.....	82
Anexo 2.	Diferenciación práctica entre víboras y serpientes no venenosas por las características de sus cabezas.....	83
Anexo 3.	Componentes de algunos venenos del género <i>Porthidium</i> de otros países.....	84
Anexo 4.	Análisis estadístico de la actividad hemorrágica mediante el programa SPSS.....	86
Anexo 5.	Análisis estadístico de la actividad miotóxica mediante el programa SPSS.....	88

ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

P. lansbergii: *Porthidium lansbergii*

CIIMET: Centro de Investigación e Información de Medicamentos y Tóxicos

CRUV: Centro Regional Universitario de Veraguas

CRUC: Centro Regional Universitario de Coclé

OMS: Organización Mundial de la Salud

ICP: Instituto Clodomiro Picado

WCH Toxicological Clinical: Toxinology Department, Women's & Children's Hospital

DHm: Dosis Hemorrágica Mínima

DL₅₀: Dosis Letal Media

B. asper: *Bothrops asper*

CK: Creatina quinasa

SVMP: metaloproteinasas

µg: microgramos

U/L: unidades por litro

PLA2: Fosfolipasas A2

µL: microlitros

PBS: Solución salina de fosfatos.

Izq: izquierda

Der: derecha

msnm: Metros sobre el nivel del mar

RESUMEN

En Panamá, hay pocos datos disponibles sobre la evaluación toxicológica del veneno de *Porthidium lansbergii*, a pesar de que se le atribuye una cantidad importante de accidentes ofídicos, siendo el segundo responsable del total de casos en el país. Por esta razón, la presente investigación tuvo como finalidad caracterizar las actividades hemorrágicas, miotóxicas, desfibrinantes y letales de los venenos de las serpientes juveniles y adultas, en ratones de la cepa CD-1 para evaluar los efectos fisiológicos locales y sistémicos que provoca y conocer si existían diferencias en los venenos.

Para el desarrollo de los experimentos *in vivo* se utilizaron venenos de serpientes juveniles y adultas colectadas en diferentes puntos de Panamá.

Ambos venenos ocasionaron efectos locales como hemorragia y miotoxicidad con diferentes intensidades y efectos sistémicos con letalidad moderada y ausencia de la desfibrinación.

INTRODUCCIÓN

Las mordeduras por serpientes -según la Organización Mundial de la Salud (OMS)- son un problema de salud pública desatendido, que ocurre principalmente en comunidades rurales y de difícil acceso, en las regiones tropicales y subtropicales, afectando en primer lugar a campesinos, agricultores o ganaderos.

Aunque se han logrado importantes avances en el tema de ofidismo, aún existen vacíos en el conocimiento referente a los aspectos fisiopatológicos de los envenenamientos, tales como: la toxicidad de los venenos en muchas especies de serpientes, cómo afecta la cantidad de veneno inoculado, la eficacia de antivenenos y su dosificación, adicionando, la falta de conocimiento médico por posibles complicaciones sistémicas o locales (Múnera, 2011).

Hildaura Acosta (comunicación personal), refiere que en Panamá, de 1984 al 2021, han ocurrido 53 133 casos de mordeduras de serpientes y 226 muertes registradas desde los años 2000 hasta 2021, un alto número de accidentes por mordeduras de serpientes. Por lo que, el accidente ofídico corresponde a un desafío en el sistema de salud, que debe manejarse eficientemente para evitar daños severos en la persona afectada, ya que el ingreso de agentes muy tóxicos al cuerpo no permite que se dé la respuesta inmune adecuada (Acevedo y Chávez, 2014).

A pesar de la alta incidencia, en Panamá existen pocas investigaciones toxicológicas a nivel fisiológico relacionadas con casos de envenenamiento por serpientes. En este sentido, la evaluación de las actividades ocasionadas por el veneno es necesaria para comprender los procesos fisiopatológicos que ocurren una vez inoculado, que

permitirán, posteriormente, valorar la capacidad neutralizante de los antivenenos y utilizar esta información como base para tratar estos envenenamientos a nivel clínico.

En Panamá, se le atribuye a la especie *Porthidium lansbergii*, una cantidad importante de accidentes ofídicos; sin embargo, hay pocos datos disponibles sobre la evaluación toxicológica de su veneno, a pesar de ser relevante para los sistemas de salud. Por esta razón, el presente trabajo tiene como finalidad caracterizar los efectos tóxicos del veneno de *P. lansbergii*, en ratones de la cepa CD-1, para evidenciar los efectos fisiológicos; estableciéndose como un estudio pionero en el país, sentando las bases para investigaciones futuras, con el propósito de aportar la información necesaria y pertinente que coadyuven en el manejo de personas que han sufrido un accidente ofídico.

CAPÍTULO I
MARCO TEÓRICO

1.1 Antecedentes

Las serpientes se incluyen en el reino animal, filo cordados, clase reptiles, superorden squamata y orden ophidia. Existen alrededor de 3 496 nominaciones de especies de serpientes, de las cuales 375 son peligrosas para el ser humano, su tamaño es variado, de unos pocos centímetros, hasta medir 10 metros de largo; pueden vivir a los 67° latitud norte (Escandinavia), hasta 50° sur (Patagonia); en sitios tan altos a 5 000 metros sobre el nivel del mar y sitios tan profundos como a los 100 metros por debajo del nivel del mar (Castro Herrera et al., 2016).

Son animales poco estudiados y muy temidos por la población mundial, siendo víctimas de leyendas y mitos que cambian la importancia de estos animales en los ecosistemas, ya que son excelentes controladores biológicos en la cadena alimenticia (Voelger et al., 2020). Su ataque o mordedura no es más que un comportamiento de defensa o cacería, sin la intención de infligir daño al ser humano. Por otra parte, su veneno ha sido objeto de curiosidad e investigación desde las primeras civilizaciones, incluso ha sido empleado en diversas actividades como la caza o la guerra (Pérez et al., 2014).

La diversidad de serpientes en América Latina es amplia, algunos representantes de la familia de las serpientes, como las Colubridae, Elapidae y Viperidae pueden inocular su veneno en humanos y causar síntomas clínicos leves o graves de envenenamiento (Campbell y Lamar, 2004). En Panamá existen 148 especies de serpientes de las cuales 26 son de importancia médica (Ray, 2017).

1.1.1. Epidemiología del accidente ofídico

Los accidentes ofídicos se definen como la mordedura ocasionada de manera inesperada -por una serpiente- al ser humano y están estrechamente relacionados con trabajadores agrícolas y personas que viven en comunidades rurales o en áreas de difícil acceso; aumentando su incidencia en las épocas de mayor trabajo en los campos y temporadas lluviosas (Vera et al., 2006).

Los envenenamientos por mordeduras de serpientes se han incluido formalmente por la OMS, en la lista de enfermedades tropicales desatendidas de alta prioridad desde junio del 2017 (Organización Mundial de la Salud, 2021). Además, Vélez Parra (2016) menciona que los accidentes por mordeduras de serpientes han sido descuidados por parte de las autoridades de salud.

En Latinoamérica ocurren alrededor de 150 000 accidentes ofídicos de los cuales 5 000 llegan a ser fatales cada año; destacando que, en Centroamérica, Panamá reporta la mayor cantidad de accidentes ofídicos con 2 000 casos anuales, con 40-65 casos por 100 000 habitantes por año, sin contar los casos no reportados (Gutiérrez et al., 2009; Solís y Tinoco, 2017; Valderrama, 2010).

En Panamá, la especie que causa el mayor número de accidentes ofídicos es *Bothrops asper* conocida como equis o terciopelo, según Rodríguez et al. (2012) el 72% de los casos por mordeduras de serpientes desde 2005 al 2011 corresponde a *B. asper* y un 23% a *Porthidium lansbergii*. Según las estadísticas del MINSA, las provincias con mayor número de accidentes ofídicos son Chiriquí, Coclé y Veraguas (Vélez Parra, 2016; Tristán de Brea et al., 2021). Frecuentemente, se reportan los

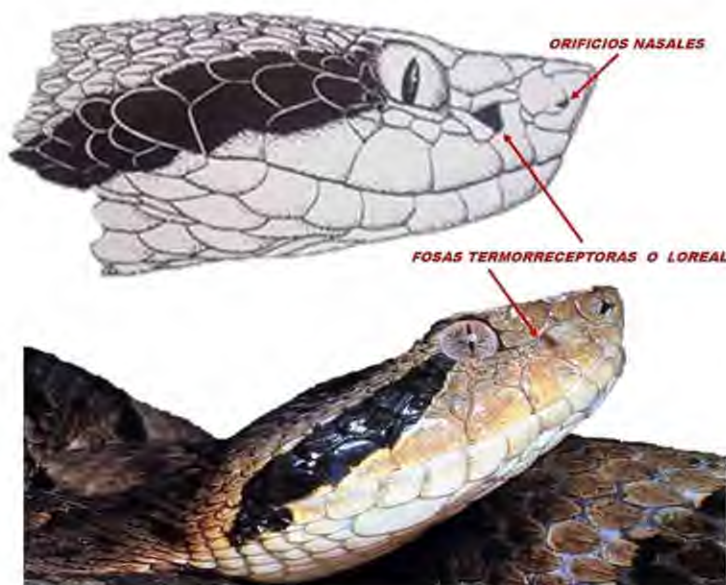
ataques en las extremidades inferiores a causa de pisarlas involuntariamente, lo cual ocurre comúnmente en personas que trabajan la agricultura o ganadería (Pecchio et al., 2018).

Es importante resaltar que la incidencia del envenenamiento por mordedura de serpientes, independientemente de la especie involucrada, varía entre regiones de un mismo país y depende de diversos factores como el clima, la biodiversidad, la distribución de las serpientes, la densidad poblacional, las actividades económicas de cada región, el tipo de vivienda, entre otros (Otero-Patiño, 2009).

1.2. Familia Viperidae

La familia Viperidae es muy amplia y diversa, pertenecen al grupo de las solenoglifas y son conocidas comúnmente como víboras, representan la cima de la evolución en lo que a inoculación de veneno se refiere (Castro et al., 2016; Yañez-Arenas, 2004). Estas especies tienen la cabeza bien diferenciada del cuerpo, en el dorso de esta presentan escamas pequeñas y pupilas en forma vertical; además, se caracterizan por su aparato venenoso especializado que morfológicamente presenta colmillos grandes, tubulares y móviles (pueden cambiar de posición); tienen dos fosetas sensibles a la temperatura (**Figura 1**), ubicadas cada una a un lado de la cabeza, utilizadas para detectar diferencias muy pequeñas de calor, para así sentir cambios en su entorno y encontrar sus presas de sangre caliente; en las víboras esta foseta se encuentra como un orificio entre el ojo y el artificio nasal (Zúñiga Carrasco y Caro Lozano, 2013; Batista y Miranda, 2020).

Figura 1. Foseta loreal en vipéridos



Fuente: <https://radiorescate.com.ve/como-saber-si-una-serpiente-es-venenosa-fotos-diferencias/>

Los vipéridos son vivíparos y se alimentan primordialmente de vertebrados. Son un grupo ampliamente diverso morfológica y ecológicamente, incluyendo especies terrestres y arborícolas que se encuentran en áreas tropicales, subtropicales y áridas, desde el nivel del mar hasta elevaciones mayores de 3 000 msnm, habitan en todo el mundo con excepción de Australia, islas oceánicas y los polos (Martins et al., 2002, Yarleque, 2000, Tomba, 2019; Yañez-Arenas, 2004). En Panamá, esta familia está constituida por los géneros *Bothrops*, *Porthidium*, *Antropoides*, *Bothriechis*, *Cerrophidion*, *Lachesis* y *Metlapilcoatlus* (Batista y Miranda, 2020).

1.2.1. Género *Porthidium*

El género *Porthidium* está formado por serpientes venenosas, de pequeña talla que no sobrepasan el metro de longitud; está formado por nueve especies que habitan principalmente en zonas tropicales húmedas y secas de baja elevación en bosques subtropicales con una distribución que abarca desde México pasando por Guatemala, El Salvador, Belice, Honduras, Nicaragua, Panamá, Costa Rica, Colombia, Ecuador y Venezuela (Campbell y Lamar, 2004, citado en Castoe et al., 2005; Flores-Padrón et al., 2014).

1.2.1.1. Especie *Porthidium lansbergii*

Porthidium lansbergii es una víbora neotropical (**Figura 2**), conocida como Patoca o Viejita, que se diferencia morfológicamente por presentar las siguientes características: no sobrepasa los 90 cm de longitud, tiene escamas subcaudales enteras y rostral diferenciada, presentan dimorfismo sexual y escamas supralabiales separadas de la órbita ocular por dos hileras de escamas suboculares, el patrón de coloración varía según su distribución que abarca desde Panamá oriental hasta el norte de Colombia y occidente de Venezuela y en regiones del Caribe y Andina (Medina-Rangel y López-Perilla, 2015, citado en Rivera Prieto, 2017; Molina-Bethancourth et al., 2015).

Figura 2. Ejemplares de *Porthidium lansbergii* juvenil y adulto.



Juvenil

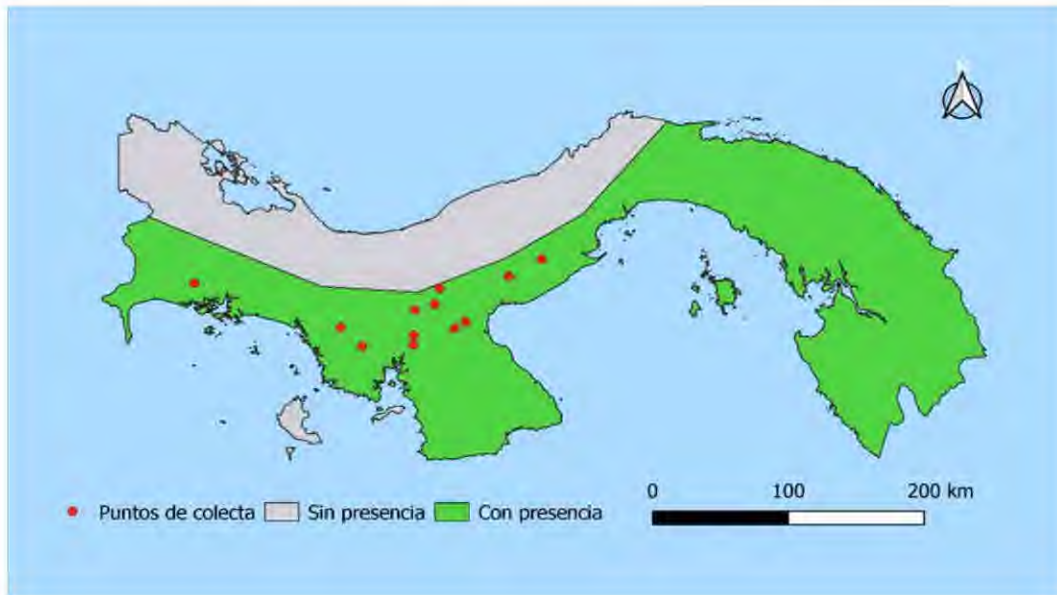


Adulto

Fotos proporcionadas por: Eduardo Zambrano, CIIMET CRU Veraguas, 2022

Es común encontrarla en bosques húmedos, secos y áreas abiertas en el Pacífico, en las provincias de Chiriquí, Veraguas, Coclé, Panamá Oeste, Panamá y Darién, como se muestra en la **Figura 3** (Elizondo-Lara, 2019). *P. lansbergii* presenta subespecies como *P. lansbergii rozei*, *P. lansbergii lansbergii* y *P. lansbergii hutmanni* y su veneno ha sido útil para establecer relaciones entre los grupos de serpientes cercanas (Jiménez-Charris et al., 2015).

Figura 3. Mapa de distribución de *Porthidium lansbergii* en Panamá.



Nota: Mapa realizado con base en datos de Monteza-Moreno et al. (2020) y Batista y Miranda (2020).

1.3. Fisiopatología del envenenamiento ofídico

El accidente ofídico en humanos conlleva efectos fisiopatológicos que son consecuencia de un evento adverso en la naturaleza, considerando que el veneno se modificó a lo largo del tiempo para que la serpiente se desenvuelva como predador en los ecosistemas que habitan, ahora bien, la variada composición molecular de los venenos conduce a un efecto fisiopatológico específico en el organismo de las víctimas (Castaño Valencia y Cañas Dávila, 2016).

El veneno de serpientes está formado por péptidos y proteínas tóxicas, que provocan daños graves a tejidos y órganos, lo que puede conducir a la muerte; entre los componentes tóxicos pueden encontrarse miotoxinas, toxinas coagulantes,

hemorraginas, nefrotoxinas, neurotoxinas y otras (Acevedo Benítez y Chávez, 2014).

El veneno de los vipéridos se caracteriza por ser hemotóxico y miotóxico, capaz de ocasionar efectos que pueden llegar a ser muy severos (De Roodt et al., 2005). Acevedo y Chaves (2014), indican que esto puede deberse a factores como el volumen de veneno que estas especies inoculan al morder, el sitio anatómico de la mordedura, el gran tamaño y la forma retráctil de sus colmillos, que les permiten inyectar el veneno profundamente, ya sea subcutáneo o intramuscular. Además, Valderrama (2010), agrega que también puede depender de la edad, tamaño, salud del ofidio e incluso si ha comido o no recientemente.

Al momento de ser inoculado el veneno, se acumula principalmente en el tejido subcutáneo, que por medio de la vía linfática se absorbe y llega hasta su sitio de acción para distribuirse en todo el organismo del individuo (Valderrama, 2010). El veneno es capaz de dañar las células musculares, lesionar los vasos sanguíneos y evitar la coagulación normal de la sangre, lo que conlleva a la aglomeración de microtrombos; esta acción conjunta trae como consecuencia las hemorragias internas e insuficiencia cardíaca, respiratoria y renal (Barish y Arnold, 2022). De modo que, se produce abundante sangrado tanto local como sistémico, que, a nivel local, las alteraciones en la vasculatura contribuyen a la necrosis en el caso de envenenamiento de vipéridos (Brenes Zúñiga, 2014).

Tabla 1. Principales componentes tóxicos del veneno de vipéridos de América.

Componente	Familia de toxina	Efecto fisiopatológico
Hemorraginas	Metaloproteinasas	Hemorragias Formación de flictenas Edema
Enzimas tipo trombinas	Serina proteinasa	Coagulación del fibrinógeno Desfibrinación Hipoagregación plaquetaria
Activadores de protrombina y de factor X	Metaloproteinasas	Activación del factor X o de protrombina. Desfibrinación Hipoagregación plaquetaria
Miotoxinas	Fosfolipasa A2 (Lys-49 o Asp-49)	Mionecrosis Edema Dolor
Crotamina, Miotoxina a	Polipéptido catiónico.	Contractura muscular Miotoxicidad

Fuente: Gutiérrez et al. (2011).

Los efectos por mordeduras de víboras en las regiones del Norte y Centroamérica se presentan, principalmente, como cuadros de toxicidad tisular y hematológica, debido a los diferentes mecanismos que actúan sobre el sistema hemostático, provocando extensas lesiones locales y sangrado irreprimible (De Roodt et al., 2005). Según Orduna et al. (2007) el veneno de la familia Viperidae tiene 3 mecanismos de acción:

1. **Inflamatorio: (potencialmente necrotizante):** responsable del cuadro cutáneo local, por destrucción celular directa e indirectamente, por isquemia y activación o liberación de mediadores del proceso inflamatorio, producidas por diferentes componentes del veneno.
2. **Coagulante:** responsable del cuadro de anticoagulación, mediante activación de la transformación de fibrinógeno a monómeros de fibrina como consecuencia de la acción de factores de coagulación y por mecanismos de acción de enzimas tipo trombina presentes en el veneno.
3. **Hemorrágica o vasculotóxica:** responsable de la acción hemorrágica, por metaloproteinasa (hemorraginas) y otros componentes que degradan la matriz extracelular y lesionan el endotelio vascular.

Las manifestaciones de los accidentes ofídicos son variables y dependen principalmente de la especie de serpiente involucrada y puede presentarse en el sitio de la mordedura, produciendo una reacción local e incluso llegar a generar efectos sistémicos (Cañas Dávila y De Paz Cobo, 2016).

Es necesario destacar que, el veneno de vipéridos contiene diversos componentes como metaloproteasas, hialuronidasas, hidrolasas, fosfolipasas, entre otros (**Tabla 1**), que perjudican distintos tejidos y suelen producir efectos hemorrágicos locales y sistémicos (De Paz Cobo et al., 2016).

1.3.1. Efectos locales:

El efecto local se desencadena en el sitio de la mordedura y se caracteriza por dolor y hemorragia que puede acompañarse de necrosis en el tejido muscular

(Brenes Zúñiga, 2014). Las mordeduras por víboras frecuentemente causan afectaciones locales más graves que otras especies (De Paz Cobo et al., 2016).

1.3.1.1. Hemorragia

La hemorragia se produce como consecuencia de la acción de las hemorraginas del veneno sobre la microvasculatura; las hemorraginas son metaloproteinasas dependientes de zinc relacionadas a las proteínas que se encuentran en los tejidos de mamíferos (Uribe Arjona, 2014); éstas degradan los elementos de la lámina basal de los capilares y vénulas, provocando que los capilares se colapsen (Brenes Zúñiga, 2014).

Según Pineda et al. (2019) en Centro y Sudamérica, el veneno de la subespecie *P. lansbergii hutmanni* se encuentra entre los venenos más hemorrágicos entre las especies de serpientes. La intensidad del efecto hemorrágico se describe como la dosis hemorrágica mínima (**DHm**), inducida en una lesión de 10 mm de diámetro (Gutiérrez et al., 1985 citado en Gutiérrez et al., 2015).

1.3.1.2. Miotoxicidad

El efecto miotóxico suele determinarse cuantificando la actividad de la enzima creatina quinasa (CK) en el suero o en el plasma de los ratones inyectados con veneno; esta enzima se encuentra en altas concentraciones en el músculo esquelético, músculo cardíaco y tejido nervioso, por lo que, si hay un aumento en la

actividad de la enzima en el plasma, indica que hay daño en uno o varios de esos tejidos (Gutiérrez et al., 2015).

Es importante mencionar que las células musculares del cuerpo requieren de CK para poder funcionar y sus niveles plasmáticos se pueden elevar después de un infarto al miocardio, una lesión músculo esquelética o por ingerir suplementos o alcohol (Zambrano et al., 2019).

Los vipéridos presentan miotoxinas hemorrágicas capaces de inducir necrosis del músculo esquelético (Gutiérrez y Cerda, 1984). Según Ramírez y Rojas (2009), la necrosis se define como eventos que producen la ruptura de la membrana citoplasmática y como consecuencia se da la salida del material intracelular, causando externamente una reacción inflamatoria. Por lo tanto, se evalúan los niveles séricos de CK para determinar la gravedad del daño muscular (Zambrano et al., 2019).

La actividad miotóxica de la mayoría de los venenos de serpientes se determina luego de tres horas de inoculación, debido a que en este tiempo se llega a los niveles mayores de CK en el plasma (ICP, 2007).

1.3.2. Efectos sistémicos

Los envenenamientos causados por vipéridos están asociados principalmente a sangrados y alteraciones en la coagulación, provocando también afectaciones renales y choque cardiovascular; siendo el sangrado sistémico una de

las manifestaciones más comunes en casos moderados y severos de envenenamientos (Acevedo Benítez y Chávez, 2014; Gutiérrez et al., 2011).

1.3.2.1. Desfibrinación

El fibrinógeno, es el principal elemento que origina la coagulación, es una glicoproteína fibrosa y adhesiva que se encuentran en el plasma sanguíneo participando en la hemostasia (Vargas, 2016). La coagulación es el mecanismo mediante el cual, la sangre se transforma en un gel perdiendo su liquidez, este proceso conlleva a la interrupción de la pérdida de sangre por el daño de un vaso y posteriormente su reparación (Díaz Concepción y Almagro Vásquez, 2015 citado en López Batista et al., 2020).

En relación con lo anterior, la hemostasia es el proceso necesario para frenar la hemorragia; es decir: “que consiste en la capacidad que tiene un organismo de hacer que la sangre en estado líquido permanezca en los vasos sanguíneos” (López Batista et al., 2020 p.3). Esta posibilita que la sangre se transporte adecuadamente y al momento que un vaso se lesione, se inicie la formación de coágulos con el fin de detener la hemorragia y subsanar el daño (Fondevila, 2018 citado en López Batista et al., 2020).

Los venenos con actividad coagulante, al administrarse por vía intravenosa a los animales de experimentación, provocan un consumo de fibrinógeno, extendiéndose el tiempo de coagulación, lo que suscita la muerte del animal, como resultado de la desfibrinación; este efecto es causado por las serino proteinasas

“tipo trombina”, metaloproteinasas activadoras de factor X, las serinas proteinasas y metaloproteinasas activadoras de la protrombina (ICP, 2007).

La actividad desfibrinante se puede analizar mediante la cuantificación de los niveles de fibrinógeno u observando si hay o no coagulación de la sangre, luego de inyectar veneno por vía intravenosa (ICP, 2007).

1.3.2.2. Letalidad

La dosis letal media (DL₅₀), es utilizada para estimar las dosis letales en humanos, siendo previamente probados en animales de experimentación, tomando en cuenta, la necesidad de proteger y garantizar el bienestar de los animales de laboratorio. Sin embargo, esta actividad sigue siendo esencial para caracterizar los efectos tóxicos de una sustancia química y así determinar los peligros potenciales en humanos (Román Barrientos, 2000).

En el caso de envenenamientos por serpientes, la letalidad es producida por diversos tipos de toxinas que componen el veneno y actúan en el organismo de las víctimas (ICP, 2007). En la familia Viperidae, algunos venenos inducen letalidad por neurotoxinas principalmente (Gutiérrez et al., 2015). Los géneros como *Agkistrodon*, *Atropoides*, *Bothrops*, *Bothriechis*, *Bothrocophias*, *Lachesis*, *Porthidium* y muchas especies de *Crotalus* se caracterizan por presentar cuadros sistémicos de sangrado, coagulopatías y alteraciones hemodinámicas y renales (Gutiérrez et al., 2011).

El efecto toxicológico que más se evalúa al momento de caracterizar un veneno, es la DL_{50} que corresponde a la cantidad de veneno que ocasiona la muerte del 50 % en animales inyectados.

En la **Tabla 2** se presentan los resultados de otros estudios evaluando los diferentes efectos toxicológicos de algunos venenos del género *Porthidium*.

Tabla 2. Cuadro de resumen comparativo de algunos efectos toxicológicos del género *Porthidium* estudiados en la región.

País	Especie	Letalidad	Hemorrágica	Miotóxica	Ratones	Autor
Colombia	<i>P. lansbergii lansbergii</i>	98 ± 5,5 µg/ratón (5,7 µg/g de peso corporal).	^a 74,2 ± 9,9 mm ² 64,7 ± 7,7 mm ²	2155 ± 125,2 U/L, morfo amarillo.	BALB/C machos	De Arco-Rodríguez et al. (2019)
		93,6 ± 13,6 µg/ratón (5,5 µg/g de peso corporal)		2260 ± 29,3 U/L, morfo gris.		
	<i>P. lansbergii lansbergii</i>	140 ± 8 µg/ratón (8,2 µg/g de peso corporal)			Cepa CD-1	Jiménez-Charris et al. (2015)
	<i>P. nasutum</i>	109 µg/ ratón (82-131)	0.96 ± 0.2µg/ ratón	105 ± 12 U/mL	Swiss Webster machos y hembras	Otero et al. (2002)
Venezuela	<i>P. lansbergii rozei</i>		^b 32,5 ± 0,7071 mm ²	9128,33 ± 21,59	Albinos (<i>Mus musculus</i>) Cepa BALB/C	Ramos et al. (2010)

País	Especie	Letalidad	Hemorragia	Miotóxica	Ratones	Autor
Venezuela	<i>P. lansbergii rozei</i>	241.3 µg/ratón	13.87± 3.20 µg/ratón	^b 1555 ± 572 U/L	Cepa NIH Machos	Girón et al. (2018)
	<i>P. lansbergii hutmanni</i>	2.5 mg/kg			Cepa INH Machos	Vargas et al. (2011)
Costa Rica	<i>P. porrasi</i>	173 µg/ratón	1.5 o 3 µg		Cepa CD-1	Méndez, (2019)
Metodologías usadas		Método de Spearman-Karber	Kondo et al. (1960) modificado por Gutiérrez et al. (1985)	Cuantificación de la enzima CK		

Nota: No hay resultados de actividad desfibrinante en las investigaciones de los autores citados en el cuadro, a. La actividad hemorrágica fue determinada por la medición del área hemorrágica en mm², b. Para la evaluación de las actividades miotóxicas realizadas por los autores mencionados se emplearon dosis de 50 µg de veneno a excepción de Girón et al. (2018), que utilizó la misma metodología, pero con una dosis de 40 µg.

1.3.3. Envenenamiento por *Porthidium lansbergii*

Actualmente, existe poca información disponible sobre el veneno de las subespecies de *P. lansbergii*. Se ha reportado que el veneno de *P. lansbergii rozei* de Venezuela presenta efectos hemorrágicos y miotóxicos, con presencia de fosfolipasa A2 (PLA2) (Girón et al., 2018) y el veneno de *P. lansbergii hutmanni* mostró inhibición de la agregación plaquetaria, actividades edematizante, fibrinolíticas y hemorrágicas (Vargas et al., 2011; Pineda et al., 2008). De igual manera, el veneno de *P. lansbergii lansbergii* mostró una débil actividad letal en ratones, con miotoxicidad local moderada y un efecto hemorrágico intenso; además produjo edema, trombocitopenia e inhibición de la agregación plaquetaria (Jiménez-Charris et al., 2015).

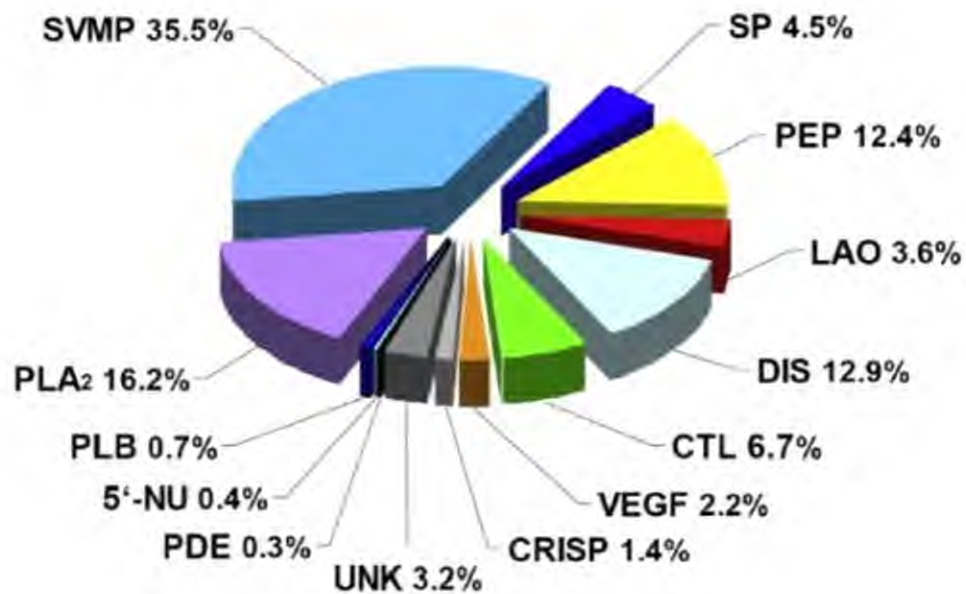
Por otro lado, las características clínicas de los envenenamientos por esta especie no han sido discutidas específicamente en el ámbito médico (Jiménez-Charris et al., 2015). Según la WCH Toxicological Clinical Resources, los efectos clínicos están entre leves a moderados como: dolor, edema, hematomas, ampollas, necrosis y otros síntomas, como dolor de cabeza, dolor abdominal, hemorragias y coagulopatías en casos severos.

1.3.4. Familias de proteínas presentes en el veneno de *Porthidium lansbergii*.

Según Jiménez-Charris et al. (2015), el veneno de la subespecie *P. lansbergii lansbergii* está compuesto principalmente por: metaloproteinasas, fosfolipasas y desintegrinas, además, está formado por familias tipo lectinas de tipo C, serina proteinasas, L-aminoácidos oxidadasa, factor de crecimiento endotelial vascular,

fosfolipasa B, proteínas secretoras rica en cisteína, 5'-nucleotidasa, fosfodiesterasas y pequeños péptidos (**Figura 4**). Cada uno de estos componentes en el veneno, provocan afectaciones en el organismo de las víctimas.

Figura 4. Composición del veneno de *P. lansbergii lansbergii* de Colombia.



PLA₂: fosfolipasas A₂; **SP**: serina proteinasas; **LAO**: L-aminoácido oxidasa; **SVMP**: metalloproteinasas, **DIS**: desintegrina; **CTL**: lectina tipo C; **5'-NU**: 5' nucleotidasa; **PLB**: fosfolipasa B; **PDE**: fosfodiesterasa; **VEGF**: factor de crecimiento endotelial vascular; **CRISP**: proteína secretora rica en cisteína; **PEP**: péptidos, **UNK**: desconocido/no identificado. Fuente: Jiménez- Charris et al. (2015).

En la **Tabla 3**, se presentan las diferentes proteínas que componen los venenos de *P. lansbergii* juveniles y adultos de Panamá.

Tabla 3. Proteínas presentes en los venenos de *P. lansbergii* juveniles y adultos de Panamá.

Adulto	Juvenil	Nombre de la proteína
MP	MP	Metaloproteinasa
CTL	CTL	Lectina tipo C
PLA2	PLA2	Fosfolipasa A2
SP	SP	Serino proteinasa
LAAO	LAAO	L-aminoacido oxidasa
CRISP	CRISP	Proteína secretora rica en Cisteína
PLB	PLB	Fosfolipasa B
PDE	PDE	Fosfodiesterasa
NUC	NUC	Nucleotidasa
NGF	NGF	Factor de crecimiento nervioso
GCY	GCY	Glutaminil ciclotransferasa
VEGF	----	Factor de crecimiento endotelial vascular
----	PDGF	Factor de crecimiento derivado de plaquetas
----	HYAL	Hialuronidasa

Fuente: Resultado no publicado del análisis de espectrometría de masas, como componente del proyecto “**Caracterización toxicológica, enzimática, inmunoquímica y proteómica del veneno de la serpiente *Porthidium lansbergii* de Panamá**” realizado por el CIIMET.

1.4. Generalidades del Estudio

1.4.1. Planteamiento del problema:

La especie *P. lansbergii* es responsable de un gran número de casos por envenenamientos anualmente, provocando severos daños físicos, psicológicos, fisiológicos y lesiones permanentes, por lo que se encuentra entre las primeras causantes de accidentes ofídicos en las distintas regiones de Panamá. La toxicidad de su veneno puede variar según la zona geográfica y la ontogenia, algo muy parecido a lo que sucede con otras especies de interés médico, esta variación del veneno provoca diversos efectos perjudiciales en la fisiología de las víctimas, razón por la cual despierta el interés de conocer su actividad toxicológica en humanos y en animales, para brindarles el tratamiento médico eficaz y oportuno.

1.4.2. Objetivos

1.4.2.1. Objetivo general

Caracterizar los efectos toxicológicos del veneno de serpientes juveniles y adultas de *Porthidium lansbergii*, en ratones de la cepa (CD-1) mediante biomodelos experimentales.

1.4.2.2. Objetivos específicos

- 1) Valorar los efectos toxicológicos locales: hemorrágico y miotóxico del veneno de serpientes juveniles y adultas de *Porthidium lansbergii* en ratones de la cepa (CD-1).
- 2) Demostrar los efectos toxicológicos sistémicos: actividad desfibrinante y letal de los venenos de serpientes juveniles y adultas de *Porthidium lansbergii* en ratones de la cepa (CD-1).
- 3) Comparar la intensidad de los efectos toxicológicos locales y sistémicos ocasionados por los venenos de serpientes juveniles y adultas de *Porthidium lansbergii* en ratones de la cepa (CD-1).

1.4.3. Hipótesis

- **H1:** Los venenos de las serpientes *Porthidium lansbergii* juveniles y adultas presentan efectos toxicológicos locales y sistémicos en ratones de la cepa CD-1
- **H0:** Los venenos de las serpientes *Porthidium lansbergii* juveniles y adultas no presentan efectos toxicológicos locales y sistémicos en ratones de la cepa CD-1

1.4.4. Justificación:

La importancia de este estudio está relacionada con varios aspectos a saber:

- 1). Panamá presenta el mayor número de casos por accidentes ofídicos en América Central.
- 2). En Panamá, el veneno de *P. lansbergii* no ha sido estudiado, a pesar de que ocasiona un importante número de casos por mordeduras. Hemos considerado también, que existen muy pocos registros o análisis de otros países con respecto al envenenamiento causado por esta especie, que pueden conducir a severas secuelas o a eventos fatales en la población.
- 3). Los venenos de las serpientes suelen variar en su composición y, por lo tanto, en el tipo e intensidad de los efectos que provoca. Esto se debe a factores como la región geográfica de procedencia, edad del ejemplar, el clima, el hábitat, aspectos morfológicos, entre otros, por lo que la OMS recomienda que cada país realice investigaciones para cada especie de importancia médica en sus localidades.

4). Panamá utiliza el suero polivalente antiofídico (Anti-Botrópico, Anti-Laquésico, Anti-Crotálico) del Instituto Clodomiro Picado de Costa Rica, para tratar a personas mordidas con *P. lansbergii*, pero este suero utilizado en envenenamientos de un área geográfica determinada, podría no tener los mismos efectos neutralizantes en la misma especie de otra región, por lo cual, en Panamá es necesario realizar investigaciones del veneno, para confirmar que dicho suero es eficaz ante el envenenamiento por *P. lansbergii*.

5). Los estudios de caracterización son fundamentales para la fabricación y evaluación de los sueros antiofídicos.

6). Esta investigación pretende enriquecer el conocimiento científico a nivel fisiológico, relacionado con la evaluación tóxica del veneno de la serpiente *P. lansbergii*, de tal manera que, más adelante se pueda dar una respuesta inmediata y eficaz ante accidentes ofídicos causados por esta víbora. Además, será una base para el inicio de futuras investigaciones farmacológicas, médicas, biológicas, bioquímicas entre otras.

CAPÍTULO II

METODOLOGÍA

2.1. Tipo y diseño general del estudio

La investigación es de tipo descriptiva, utilizando métodos experimentales cuantitativos para la caracterización de los efectos provocado por el veneno de *P. lansbergii*. Además, está basada en técnicas de laboratorio *in vivo*, empleando diferentes pruebas de análisis que nos permitieron demostrar y valorar los efectos locales y sistémicos observados en los biomodelos con ratones CD-1, comparando y describiendo las principales características fisiopatológicas provocadas por los venenos de serpientes juveniles y adultas.

2.2. Materiales

2.2.1. Muestras

El veneno de *P. lansbergii* liofilizado (**Figura 5**) fue conservado a -20°C y se obtuvo de 38 serpientes juveniles y adultas, las cuales se mantienen en cautiverio en el serpentario del Centro de Investigación e Información de Medicamentos y Tóxicos (CIIMET) en el Centro Regional Universitario de Veraguas (CRUV), procedentes de las provincias de Herrera, Veraguas, Coclé y Chiriquí.

Figura 5. Muestras liofilizadas de los venenos de *P. lansbergii* adultos (izquierda) y juveniles (derecha) utilizados en el procedimiento experimental.



2.2.2. Lugar de estudio

Los ensayos se realizaron en los laboratorios de la FACINET del CRUV y en el CIIMET (sedes Veraguas y Panamá).

2.2.3. Animales experimentales

Para los experimentos *in vivo* se utilizaron ratones de la cepa CD-1 (**Figura 6**), de ambos sexos con un peso aproximado de 18-22 g, los cuales fueron proporcionados por el Bioterio del CIIMET, con la precaución de utilizar la cantidad mínima necesaria, considerando las normas de la Declaración universal para el bienestar de los animales de la World Society of Protection of Animals del 2003 y la Guía para el cuidado, ética y uso de animales de laboratorio por el National Research Council de 2011. Así mismo se obtuvo el aval ético antes de su ejecución, bajo el proyecto “Caracterización

toxicológica, enzimática, inmunoquímica y proteómica del veneno de la serpiente *Porthidium lansbergii* de Panamá”.

Figura 6. Ratones de la cepa CD-1.



2.3. Técnicas para evaluación *in vivo* del veneno

Las pruebas se realizaron con ambos venenos por separado (juveniles y adultos) para así evaluar los efectos locales y sistémicos que produjo cada veneno en los grupos de ratones de la cepa CD-1.

2.3.1. Vías de administración del veneno

Para la realización de este estudio, se emplearon diferentes vías de administración o inoculación en ratones (Morton et al., 2002).

- Vía intradérmica: se realiza entre las capas exteriores de la piel, puede ser en la parte dorsal (en el lomo) o en el abdomen del animal, que fue la empleada en este estudio (**Figura 8**).
- Vía intramuscular: se requiere de dos personas, una para sujetar el animal y la otra para inyectar la dosis. Se realiza regularmente en el muslo, específicamente en el músculo gastrocnemio (**Figura 9B**).
- Vía intravenosa: la inyección se realiza en la vena caudal (**Figura 10B**).
- Vía intraperitoneal: la inoculación se realiza a través del abdomen, en la cavidad peritoneal (**Figura 12**).

2.3.2. Evaluación de efectos locales:

2.3.2.1. Actividad hemorrágica

La intensidad del efecto hemorrágico local puede estimarse por la determinación de la **dosis hemorrágica mínima (DHm)**, en la cual se mide el área de la hemorragia producida en la dermis de los ratones, a causa de la aplicación de diferentes dosis del veneno de *P. lansbergii* (ICP, 2007).

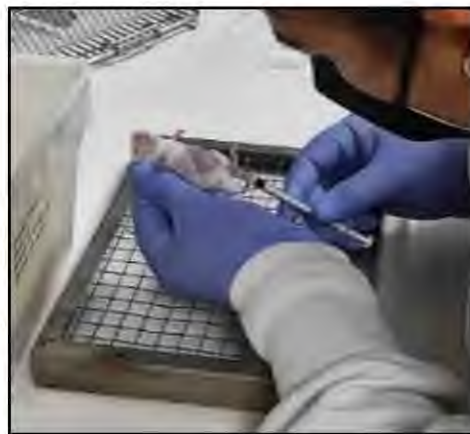
El grupo experimental se conformó por 7 niveles (**Figura 7**) con 4 ratones cada uno (n=4); se les inyectó por vía intradérmica (I.D) a 6 niveles (**Figura 8**), volúmenes de 0.1 mL de diferentes dosis de veneno, que van desde 0.32 a 2.4 µg diluidos en PBS, pH = 7.2. Al grupo control se le administró por vía intradérmica 0.1 mL de PBS. Una vez transcurridas 2 horas, se procedió con la eutanasia de los ratones, introduciéndolos en un envase hermético impregnado por el anestésico Sevoflurano®.

Posterior a esto, se procedió a remover la piel del ratón (con ayuda de unas pinzas y tijeras) para medir el área hemorrágica (en mm^2), según la metodología de Kondo et al. (1960) modificado por Gutiérrez et al. (1985). Considerando que la **dosis hemorrágica mínima (DHm)** corresponde a la dosis del veneno que induce un halo hemorrágico de 10 mm de diámetro a las 2 horas posteriores a la inyección.

Figura 7. Niveles utilizados en las pruebas de la actividad hemorrágica



Figura 8. Inyección por la vía intradérmica en el abdomen del ratón.

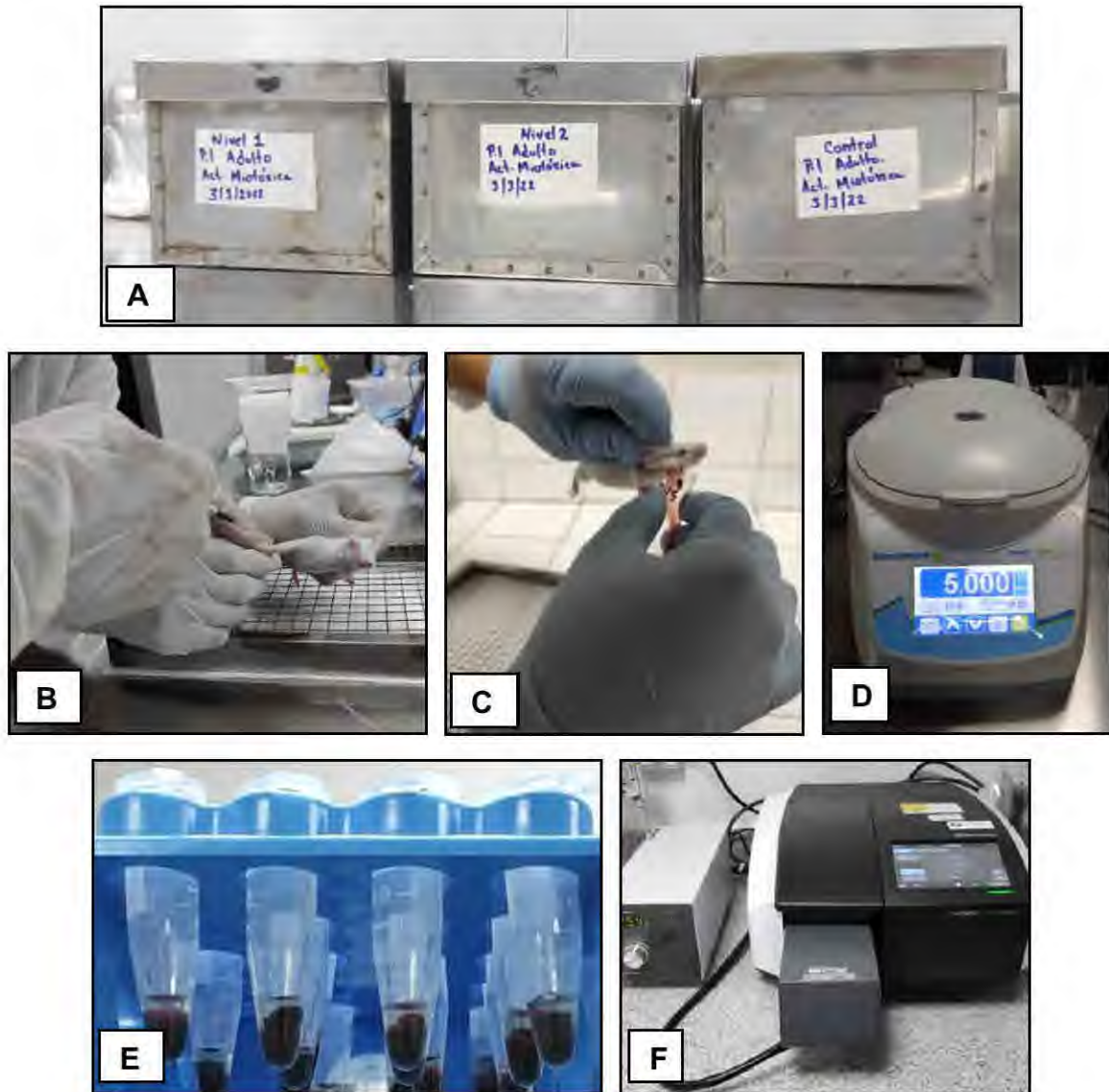


2.3.2.2. Actividad Miotóxica

Según el método descrito por Gutiérrez, (1980) en este ensayo, se utilizaron dos grupos de ratones (n=4) para evaluar dos dosis de veneno de 25 µg y 50 µg (**Figura 9A**), que se les administraron por vía intramuscular 0.1 mL de solución en el músculo gastrocnemio (**Figura 9B**) derecho del ratón. Adicionalmente, al grupo control (n=4) se les inyectó con 0.1 mL de PBS por la misma vía.

Después de 3 horas, se procedió a anestesiarse los ratones, por inhalación de Sevoflurano®; posteriormente, se recogieron las muestras de sangre del seno submandibular utilizando tubos de ensayo (**Figura 9C**). Luego, las muestras se centrifugaron a 3 000 revoluciones por minuto (RPM) durante 10 minutos (**Figura 9D**), para así obtener el suero (**Figura 9E**) y determinar la actividad de la creatina quinasa plasmática (CK) mediante el uso del espectrofotómetro (**Figura 9F**) y del ensayo cinético UV utilizando el Human kit CK NAC liquiUV (REF 12015 LOT 21006).

Figura 9. Procedimiento empleado para evaluar la actividad mitotóxica.



A. Cajas con los grupos de ratones; **B.** Inyección por vía intramuscular en el músculo gastrocnemio; **C.** Extracción de la sangre del seno submandibular; **D.** Centrifugadora que se utilizó para separar el suero de la sangre; **E.** Viales con muestras centrifugadas (suero y coágulos); **F.** Espectrofotómetro utilizado en las lecturas de absorbancias.

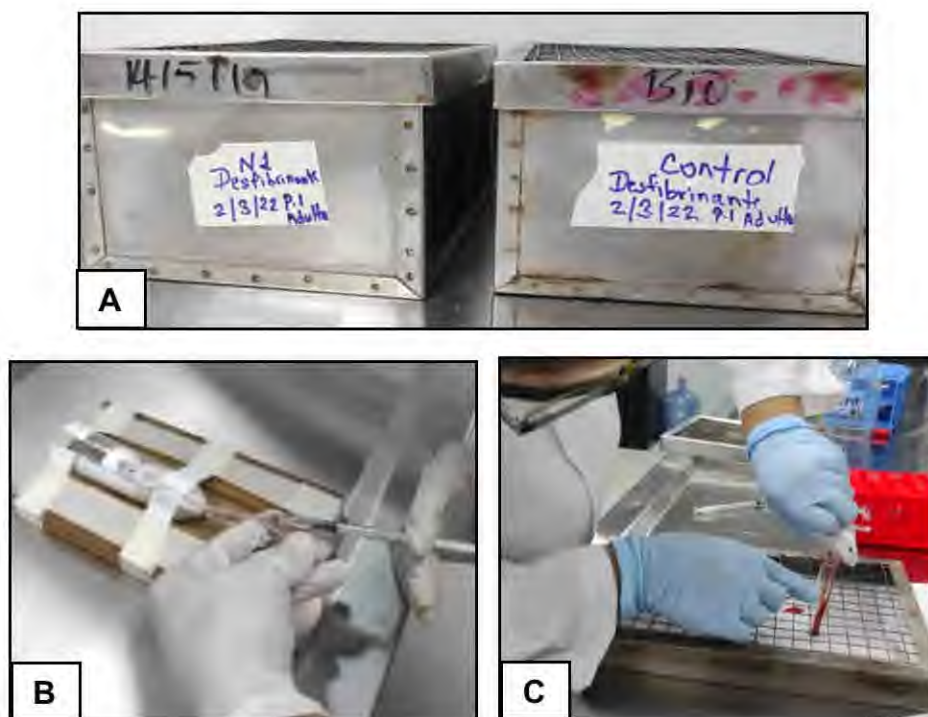
2.3.3. Evaluación de efectos sistémicos:

2.3.3.1. Actividad desfibrinante

Para este ensayo se utilizó un grupo experimental (n=3) (**Figura 10A**), a los cuales se les administró por vía intravenosa una dosis subletal de 50 µg disueltos en 0.2 mL de PBS (**Figura 10B**). Adicionalmente, a un grupo control (n=3) se le administró 0.2 mL de PBS, por la misma vía. Una hora después de la inyección, se procedió a anestésiarlos por vía inhalatoria, colocándolos en un envase hermético con Sevoflurano®, posteriormente, se extrajo mediante punción del seno submandibular un volumen de sangre de 200 µL aproximadamente (**Figura 10C**), las muestras se colocaron en tubos de ensayo, luego de transcurrida una hora de la extracción, se observó la formación o no del coágulo al inclinar el tubo de ensayo.

Se define la **dosis desfibrinante mínima (DDm)** como la dosis de veneno que induce la incoagulabilidad de la sangre en los ratones inoculados (Theakson y Reid, 1983 citado en Gutiérrez et al., 2015).

Figura 10. Procedimiento empleado para la evaluación de la actividad desfibrinante.



A. Grupo experimental con 3 ratones (izq.) y grupo control con PBS (der); **B.** Inyección por vía intravenosa; **C.** Extracción de sangre por el seno submandibular.

2.3.3.2. Actividad letal (DL_{50})

Se evaluó utilizando cinco grupos experimentales ($n=5$) de ambos sexos (**Figura 10**), con pesos entre 18 - 20 g. Se utilizaron diferentes dosis de veneno por cada grupo (48–200 μ g) disueltos en 0.5 mL de PBS, mediante la administración intraperitoneal (I.P) como se observa en la **Figura 11**; después de la administración se registra cuántos ratones murieron a las 48 horas (Bogarín et al., 2000).

Se define la DL_{50} , como la dosis que provoca la muerte del 50 % de los animales, la cual se determinó mediante el método de Spearman Karber y se calculó con el programa Toxicalc implementado por el Instituto Clodomiro Picado.

Figura 11. Grupos experimentales de ratones utilizados en la prueba de letalidad



Figura 12. Inyección por vía intraperitoneal



2.4. Análisis de datos:

Los datos fueron procesados con el programa estadístico IBM®- SPSS® 26 y mediante representación gráfica en Microsoft Excel. Además, los resultados se expresan como el promedio \pm error estándar de la media (EE), considerando un nivel de significancia con un valor de $P < 0.05$. Asimismo, para determinar la dosis letal 50% se utilizó el método de Spearman Karber y el programa informático Toxicalc proporcionado por el Instituto Clodomiro Picado con un intervalo de confianza del 95%.

CAPITULO III
RESULTADOS

En esta investigación se evaluaron los efectos toxicológicos locales y sistémicos más importantes producidos por el envenenamiento, utilizando el veneno de serpientes *P. lansbergii* juveniles y adultos, en ratones de la cepa CD-1 como modelos experimentales.

En las primeras etapas de la experimentación, se hicieron ensayos generales para verificar si el veneno presentaba actividad hemorrágica, miotóxica, desfibrinante y letal; además de identificar el intervalo de dosis adecuadas para la evaluación de cada efecto.

Los resultados al determinar los efectos tóxicos mediante los parámetros a seguir, para la dosis hemorrágica mínima (**DHm**), actividad de la creatina quinasa, dosis letal media (**DL₅₀**) y dosis desfibrinante mínima (**DDm**) indicados por el Annex 5 Guidelines for the production, control and regulation of snake antivenom immunoglobulins, para la caracterización de los venenos de serpientes, se presentan en la **Tabla 4**.

Tabla 4. Resultados de los efectos toxicológicos de los venenos de *P. lansbergii* juveniles y adultos evaluados en los ratones de la cepa CD-1.

Efectos evaluados		Veneno de juveniles	Veneno de adultos
Locales	^a Hemorragia (DHm)	0.43 ± 0.16 µg	1.07 ± 0.13 µg
	^b Miotoxicidad	1591.84 ± 482.22 U/L	1128.05 ± 299.08 U/L
Sistémicos	^c Desfibrinogénación	No se observó	No se observó
	^d Letalidad (DL ₅₀)	179.7 µg/ratón (134.71 – 239.97) µg/ratón	198,7 µg/ratón (179.55- 209.38) µg/ratón.

^a **DHm**: dosis que induce una lesión hemorrágica de 10 mm de diámetro en la piel del ratón; ^b **Actividad de la CK** al inocular 50µg de veneno luego de 3 horas; ^c **Desfibrinogénación**: incoagulabilidad sanguínea en los animales inyectados con el veneno por vía i.v; ^d **DL₅₀**: dosis que induce la muerte al 50% de los animales inyectados.

3.1. Efectos locales

Los efectos locales son aquellos que se desencadenan en el sitio de la mordedura provocados por el veneno de la serpiente; los cuales incluyen la hemorragia y la miotoxicidad.

3.1.1. Actividad hemorrágica

Los venenos de *P. lansbergii* -tanto de juveniles como de adultos- fueron capaces de inducir efecto hemorrágico en la dermis de los ratones inyectados a dosis muy bajas; observándose que el halo hemorrágico producido aumentaba tanto en tamaño como en intensidad, a medida que se incrementaban las dosis (**Figura 13 y 14**).

Se obtuvo una **DHm** para *P. lansbergii* juveniles de Panamá de **$0.43 \pm 0.16 \mu\text{g}$** y una **DHm** para *P. lansbergii* adultos de **$1.07 \pm 0.13 \mu\text{g}$** (**Tabla 4**).

Figura 13. Áreas hemorrágicas producidas por la inyección intradérmica de diferentes dosis de veneno de *P. lansbergii* juveniles en ratones CD-1.

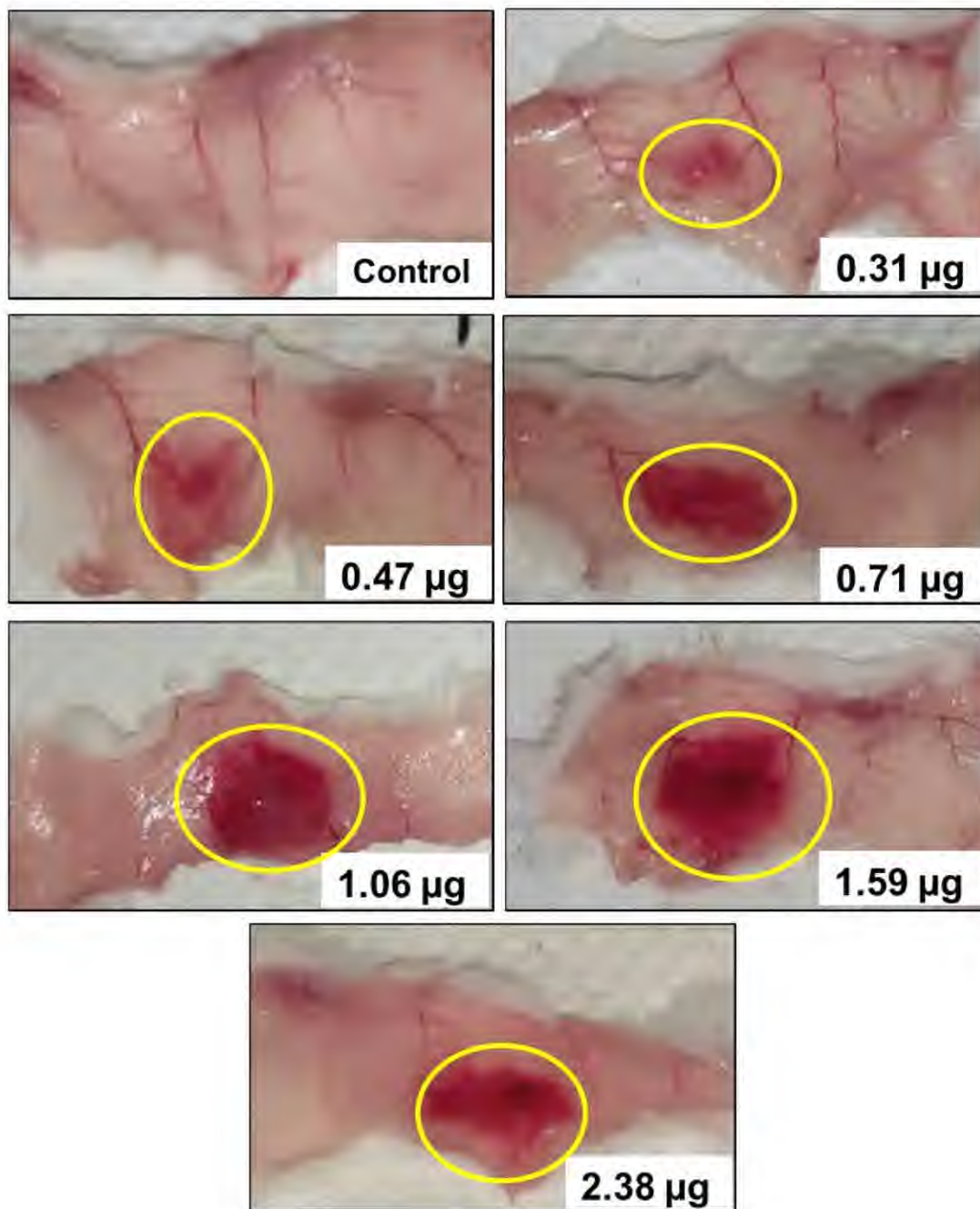
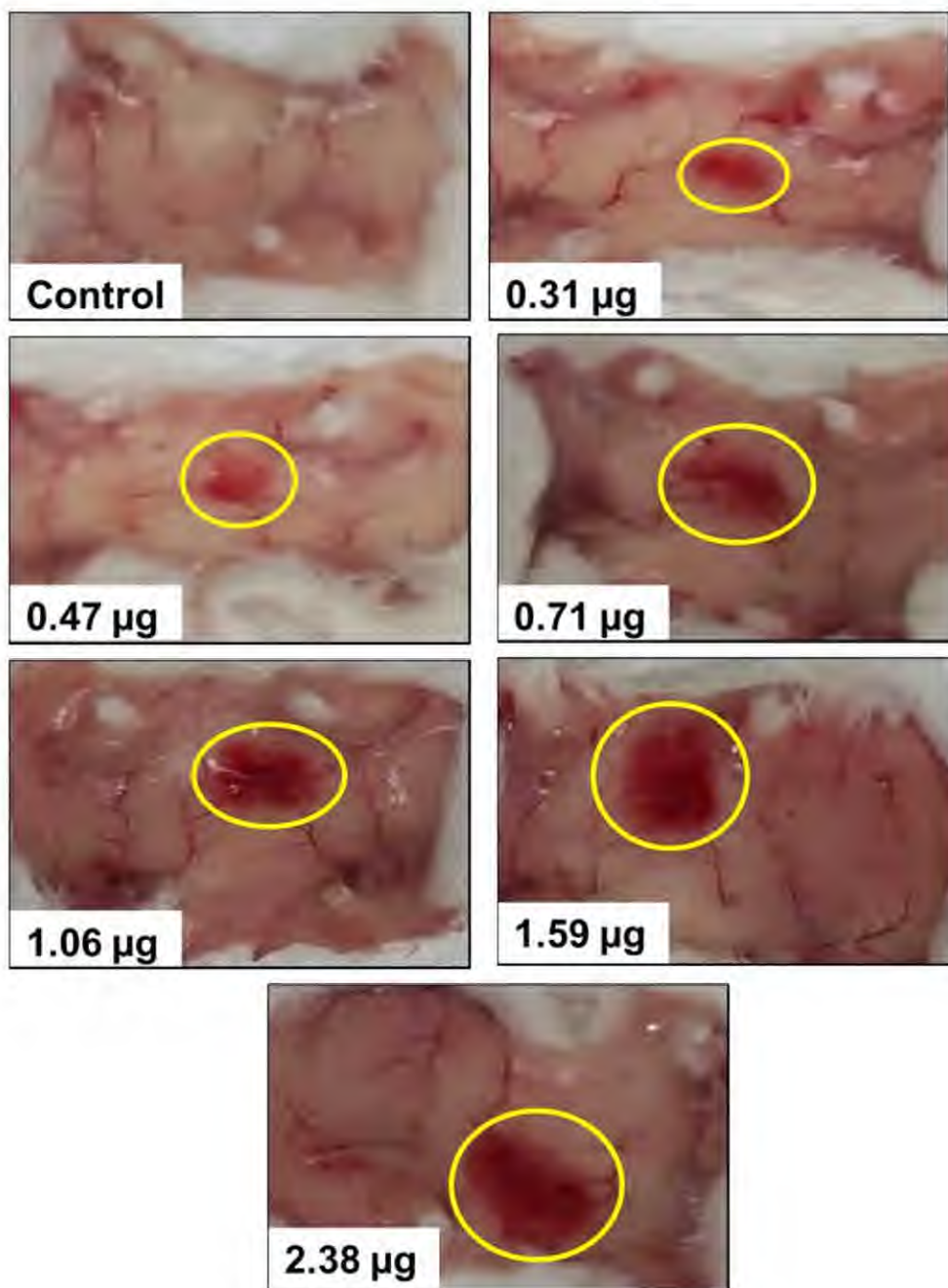


Figura 14. Áreas hemorrágicas producidas por la inyección intradérmica de diferentes dosis de veneno de *P. lansbergii* adultos en ratones CD-1.



La **Tabla 5** muestra los diámetros de las áreas hemorrágicas inducidos para cada una de las dosis de veneno aplicadas tanto de juveniles como adultos y se evidencia que, los ratones inoculados con el veneno de las serpientes juveniles presentan lesiones hemorrágicas con diámetros mayores, en comparación con el efecto ocasionado por las serpientes adultas, tomando en cuenta que se aplicaron dosis iguales para ambos experimentos.

Se demostró que existen diferencias significativas en el diámetro del área hemorrágica producido por ambos venenos, con un nivel de significancia del $P < 0.05$.

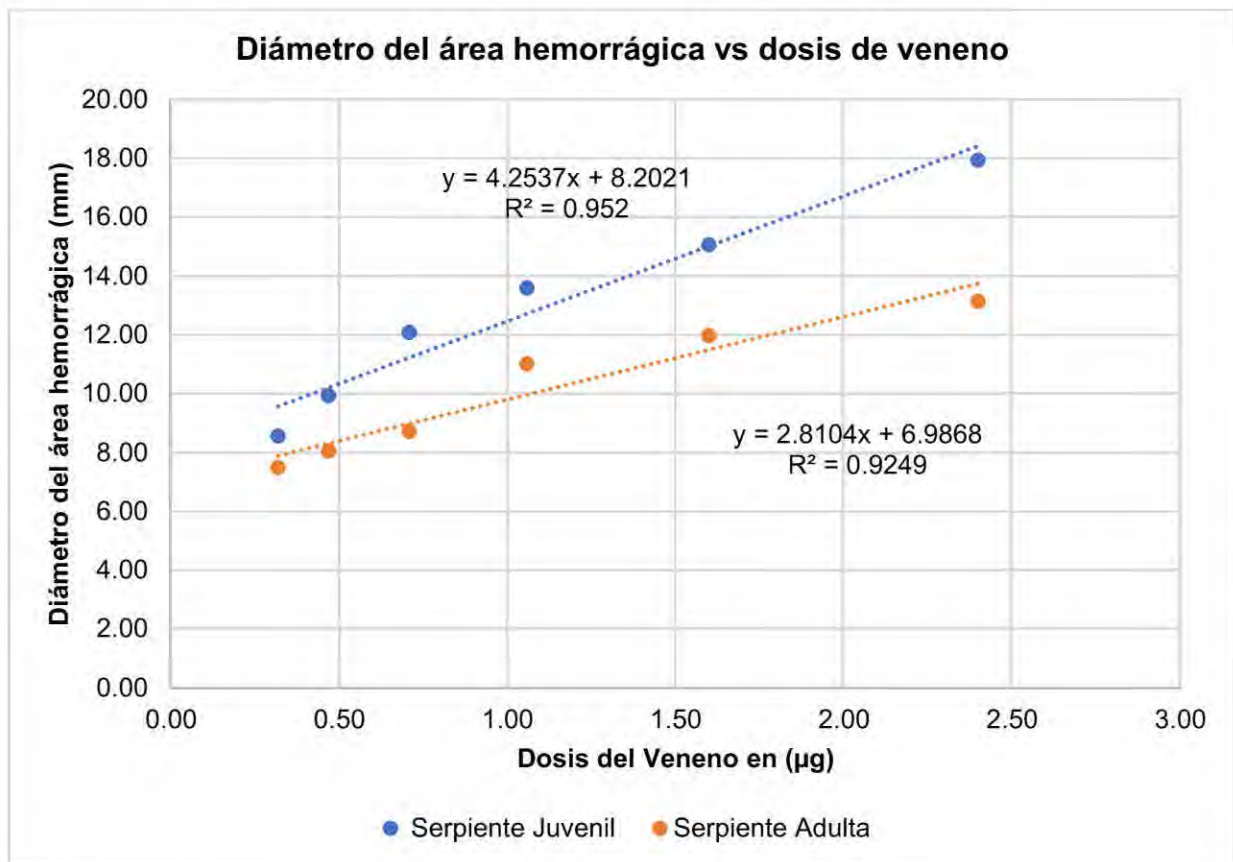
Tabla 5. Diámetros de las áreas hemorrágicas ocasionados por la inoculación de diferentes dosis de los venenos de *P. lansbergii* juveniles y adultos.

Dosis de veneno (μg)	Diámetro promedio de las áreas hemorrágicas (mm)	
	Juveniles	Adultos
0.32	8.55	7.49
0.47	9.92	8.04
0.71	12.07	8.72
1.06	13.58	11.01
1.60	15.06	11.97
2.40	17.93	13.13

En la **Figura 15** se expone la gráfica que ilustra la relación que existe entre el diámetro del área hemorrágica en la dermis de los ratones, con respecto a las dosis de venenos

empleadas, demostrando que a medida que aumentan las dosis de venenos, aumentan las áreas hemorrágicas (correlación dosis respuesta).

Figura 15. Diámetros de las áreas hemorrágicas vs dosis de los venenos de *P. lansbergii* juveniles y adultos.



Diferencias significativas entre grupos $P < 0.05$

Además, se comparó la intensidad del efecto hemorrágico causado por el veneno de *P. lansbergii*, en relación con el producido por *B. asper* (veneno de referencia de vipéridos de Panamá) que se realizó como una prueba experimental adicional.

En la **Figura 16** se aprecia la diferencia en la magnitud del daño hemorrágico (intensidad del sangrado) en la dermis de los ratones inducido por ambas especies de vipéridos.

Figura 16. Comparación de las áreas hemorrágicas producidas por la inyección intradérmica de los venenos de *P. lansbergii* y *B. asper*.



3.1.2. Actividad miotóxica

La miotoxicidad se determinó mediante análisis de la actividad de la creatina quinasa (CK). La **Tabla 6** detalla los resultados obtenidos de las actividades de las CK analizadas en la sangre de los ratones que fueron inoculados con diferentes dosis de veneno, en donde se evidenció que el veneno de *P. lansbergii* juveniles provocó mayor actividad CK, en comparación con el de adultos que fue de menor acción, siendo **(Figuras 17, 18 y 19)** estadísticamente significativo ($P < 0.05$), tomando en cuenta que el grupo control no presentó efecto.

En la **Figura 17 y 18** se exponen las actividades de las CK causado por los venenos de serpientes juveniles y adultas; y en la **Figura 19** se muestran la comparación de ambos venenos con una dosis de 50 µg.

Tabla 6. Actividad CK en sangre producida por los venenos de *P. lansbergii* juveniles y adultos en los ratones.

Actividad CK plasmática producida por <i>P. lansbergii</i>		
	Juveniles (U/L)	Adultos (U/L)
^a PBS	446.57 ± 83.52	331.43 ± 2.98
25 µg veneno	1403.92 ± 47.72	971.21 ± 121.30
50 µg veneno	1591.84 ± 482.22	1128.05 ± 299.08

Actividades de las creatinas quinazas CK expresadas como promedio ± error estándar de la media.

^a Grupos controles inoculados solo con PBS.

Diferencias significativas P<0.05 entre las medias de los grupos.

Figura 17. Actividad de la CK en la sangre de los ratones inoculados con el veneno de *P. lansbergii* juveniles.

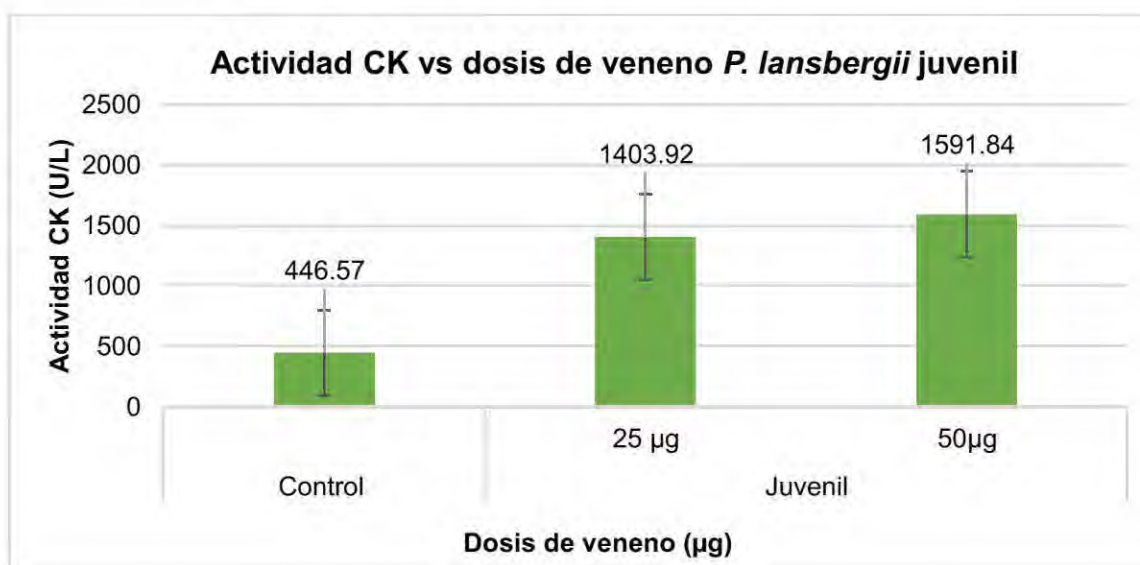


Figura 18. Actividad de la CK en la sangre de los ratones inoculados con el veneno de *P. lansbergii* adultos.

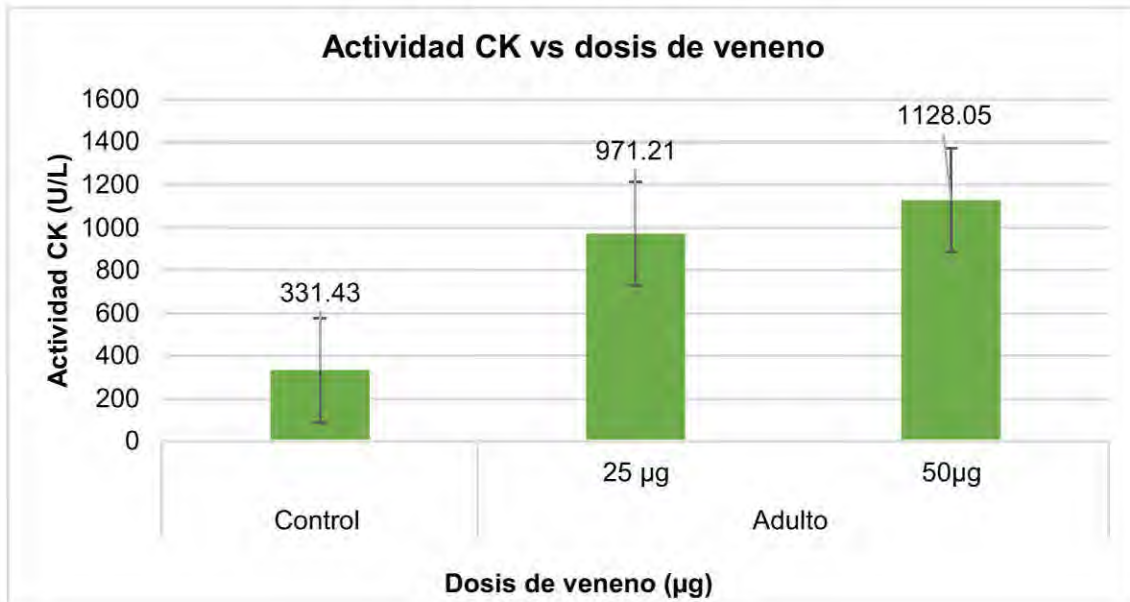
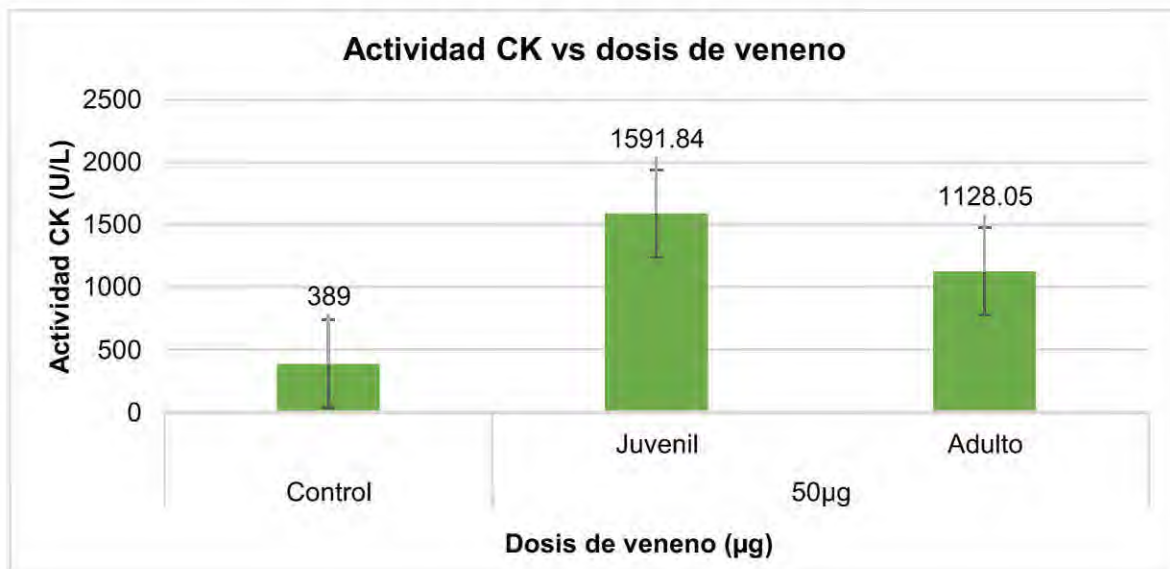
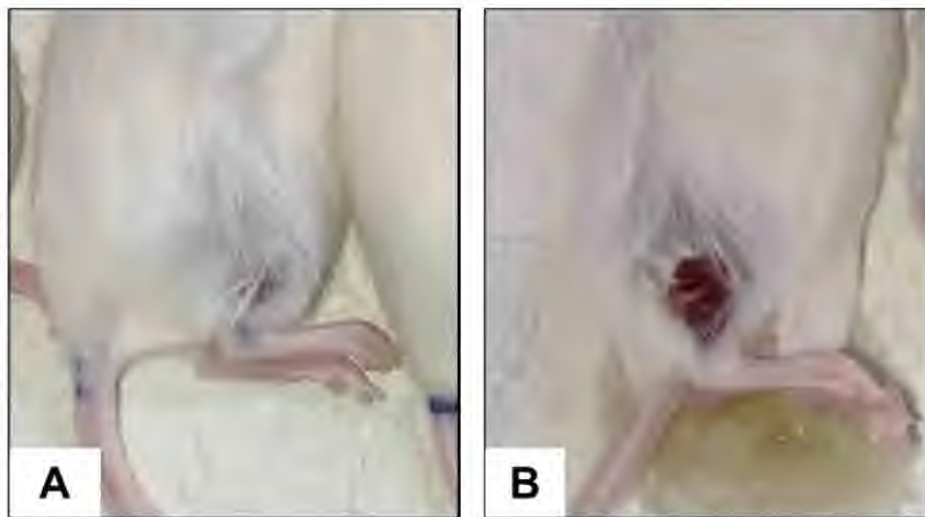


Figura 19. Actividad de la CK en la sangre de los ratones inoculados con 50 µg de los venenos de las serpientes juveniles y adultas.



Asimismo, luego de 3 horas posteriores a la inoculación de los venenos, se manifestaron en el sitio de la inyección los siguientes signos: inflamación de la zona, cambio de coloración a morado, necrosis y disfunción de la extremidad posterior (Figura 20).

Figura 20. Efecto necrótico observado en el sitio de la inoculación.



A. Inflamación posterior a la inyección del veneno de *P. lansbergii* (edema); **B.** Necrosis

En la **Figura 21**, se puede observar la diferencia en el grado de necrosis, en donde los ratones inoculados con el veneno de las serpientes juveniles presentaron un daño más notorio, en comparación con el veneno de las serpientes adultas como se puede corroborar en la **Tabla 6**.

Figura 21. Comparación de la necrosis producida por los venenos de *P. lansbergii* juveniles y adultos.



A. Control inoculado solo con PBS; **B.** Necrosis producida por veneno de *P. lansbergii* adulto; **C.** Necrosis producida por veneno de *P. lansbergii* juvenil.

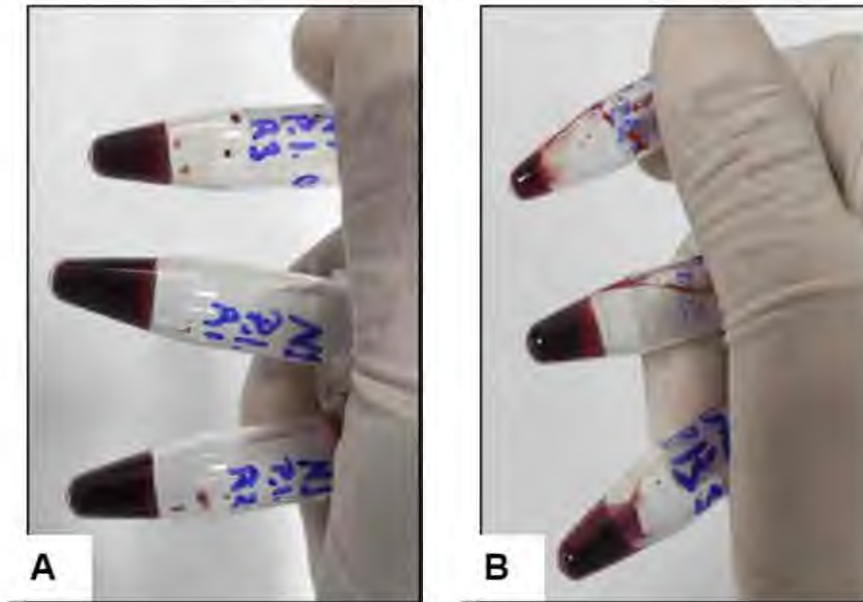
3.2. Efectos sistémicos

Se evaluaron dos efectos sistémicos: desfibrinogénación y letalidad (DL_{50}).

3.2.1. Actividad desfibrinante

Para este efecto se ensayaron dosis de 50 μg y 100 μg , ya que en este tipo de veneno no se cuenta con datos experimentales de donde se pudiera partir para evaluar esta actividad, por lo que se seleccionó la dosis subletal (dosis en la cual se observa el efecto sin ocasionar la muerte al animal), de 50 μg ., evidenciando, en las muestras de sangre recogidas en los tubos de ensayos, que se coagularon de manera normal en comparación con el grupo control, lo que nos indica que no hubo efecto desfibrinante como se evidencia en la **Figura 22**.

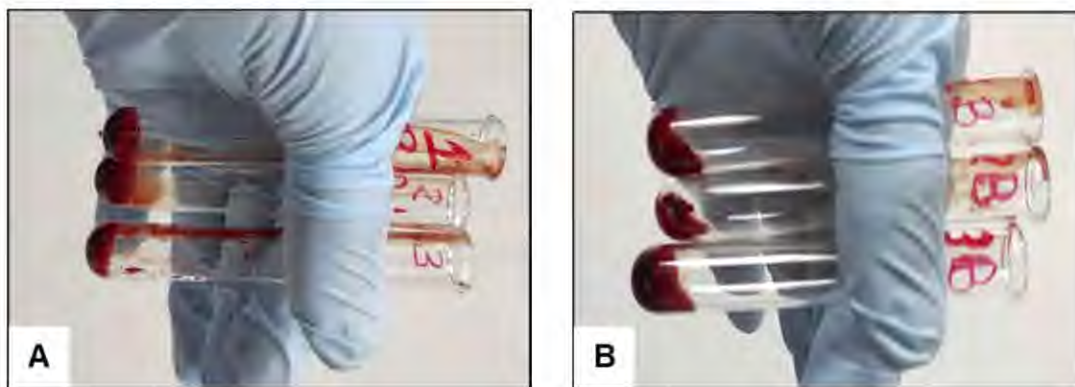
Figura 22. Coagulación normal de la sangre en presencia del veneno de serpientes adultas.



A. Sangre coagulada de los ratones tratados con el veneno de *P. lansbergii* adulto; **B.** Sangre coagulada del grupo control de ratones inoculados con PBS.

Cabe mencionar que adicionalmente, para esta actividad, se comparó la actividad desfibrinante del veneno de *P. lansbergii* juvenil con veneno de *B. asper*, ya que el veneno de *B. asper* sí presenta actividad desfibrinante como se observa en la **Figura 23**.

Figura 23. Comparación entre la actividad desfibrinante ocasionada por venenos de *P. lansbergii* juveniles y *B. asper*.



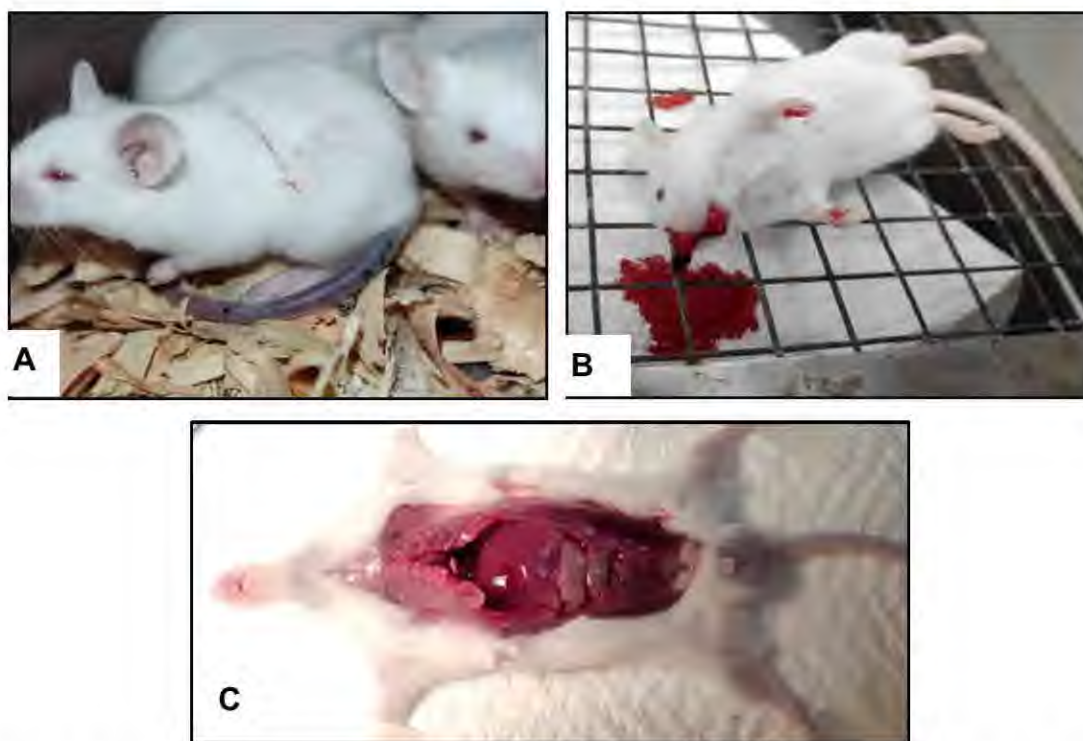
A. Sangre coagulada de ratones tratados con 50 µg de veneno de *P. lansbergii* juveniles; **B.** Sangre sin coagular del grupo de ratones tratados con 2.5 µg de veneno de *B. asper*.

En la **Tabla 7** y la **Figura 24** se describen los signos generales manifestados en los ratones con las dosis de 50 µg y 100 µg de los venenos de *P. lansbergii* juveniles y adultos.

Tabla 7. Signos observados en los ratones con dosis de 50 µg y 100 µg de veneno.

50 µg de veneno	100 µg de veneno
<ul style="list-style-type: none"> • Orina con presencia de sangre. 	<ul style="list-style-type: none"> • Hemorragias sistémicas severas por la nariz, boca y oídos.
<ul style="list-style-type: none"> • Dificultad para respirar. 	<ul style="list-style-type: none"> • Dificultad para respirar.
<ul style="list-style-type: none"> • La cola se tornó de un color morado poco tiempo después de la inyección, esto es característico en el proceso de la inflamación. 	<ul style="list-style-type: none"> • La cola se tornó de un color morado poco tiempo después de la inyección.
	<ul style="list-style-type: none"> • Morían al instante

Figura 24. Signos observados en los ratones inoculados con los venenos de *P. lansbergii* juveniles y adultos al evaluar la actividad desfibrinante.



A. La zona de inoculación del veneno por vía intravenosa (cola) se tornaba de color morado a una dosis de 50 μg ; **B.** Hemorragia severa observada por nariz y boca a dosis de 100 μg . **C.** Hemorragia interna observada en el ratón inoculado con una dosis de 100 μg .

3.2.2. Actividad Letal

En la **Tabla 8** se muestran los resultados obtenidos en los ensayos de letalidad al aplicar diferentes dosis de venenos, donde los individuos corresponden a la cantidad de ratones utilizados por dosis y la respuesta a los ratones que murieron. En la **Tabla 9** se presentan las **DL₅₀** para los venenos de las serpientes juveniles y adultas.

Tabla 8. Determinación de la DL₅₀ en ratones de la cepa CD-1 al aplicar diferentes dosis de los venenos de *P. lansbergii* juveniles y adultos.

<i>P. lansbergii</i>	Dosis (mg/kg ratón)	Individuos/ dosis	^a Respuesta
Juvenil	6.99	5	0
	9.79	5	3
	13.70	5	5
Adulto	4.99	5	0
	6.99	5	2
	9.79	5	2
	13.70	5	4
	19.19	5	5

Nota: ^a La respuesta corresponde a la cantidad de ratones que mueren al aplicar las dosis respectivas de veneno.

Tabla 9. Letalidad de los venenos de *P. lansbergii* juveniles y adultos de Panamá.

<i>P. lansbergii</i>	DL ₅₀ (mg/kg)	DL ₅₀ (µg/ratón)
Juvenil	10.46 (9.45 - 11.02)	198,7 (179.55- 209.38)
Adulto	9.46 (7.09 - 12.63)	179.7 (134.71 – 239.97)

Nota: Los valores se expresan con límite de confianza al 95 % indicado entre paréntesis. Los resultados de DL₅₀ se expresan en miligramos/kilogramos (mg/kg) y microgramo por ratón (µg/ratón).

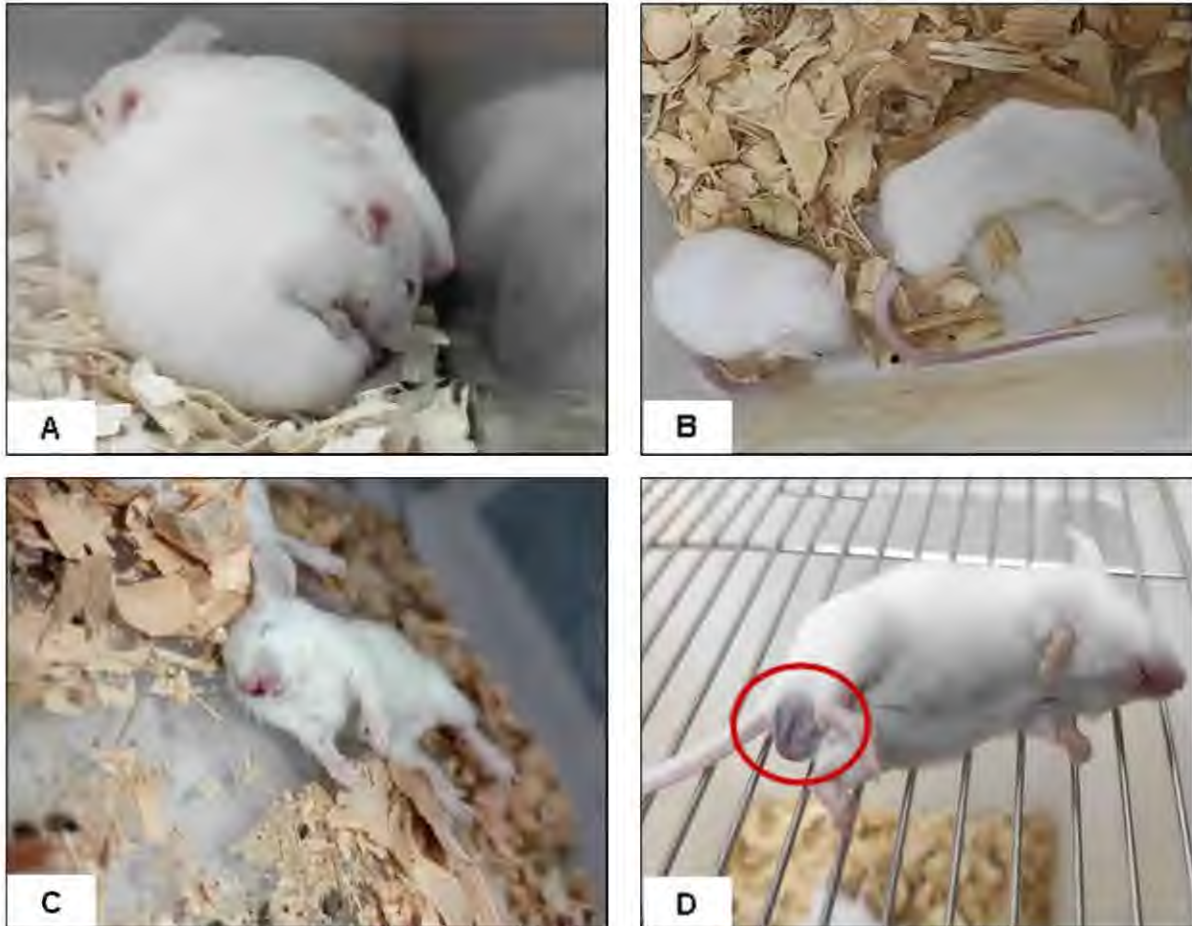
El veneno de *P. lansbergii* juvenil presentó un valor de DL₅₀ de **10.46 mg/kg (9.45 - 11.02 mg/kg)**, mientras que el veneno de *P. lansbergii* adulto obtuvo un valor de DL₅₀ de **9.46 mg/kg (7.09 - 12.63 mg/kg)**. La letalidad también se puede expresar como µg

de veneno con relación al peso del ratón, es decir que con el veneno de serpientes juveniles se obtuvo una DL_{50} de **198,7 (179.55- 209.38) $\mu\text{g}/\text{ratón}$** y con el veneno de serpientes adultas fue de **179.7 (134.71 – 239.97) $\mu\text{g}/\text{ratón}$** , considerando que los ratones utilizados para este ensayo pesaban entre 18 y 20 g (**Tabla 9**).

Por otro lado, luego de la inoculación en los ratones se observaron diferentes signos de envenenamiento (**Figura 25**) como:

- Palidez en patas, cola y orejas.
- Hiperactividad, se acicalaban en la zona de la inyección.
- Dificultad para respirar.
- Los machos presentaron inflamación en el saco escrotal con una intensa coloración morada.
- Contorsionaban el cuerpo poco antes de morir.
- Hemorragia por la nariz.
- Los ratones inoculados con las dosis más altas de veneno adulto fallecieron en un período menor a 1 hora, después de la inoculación.

Figura 25. Signos observados en los ratones durante la evaluación de la actividad letal con los venenos de *P. lansbergii*.



A. Los ratones se acicalaban la zona de la inyección; **B.** Se contorsionaba antes de morir; **C.** Hemorragia por la nariz; **D.** Inflamación y hemorragia en el saco escrotal.

CAPÍTULO IV

DISCUSIÓN

De acuerdo con los resultados de esta investigación, los venenos de serpientes *P. lansbergii* juveniles y adultas, resultaron ser hemorrágicos, miotóxicos y letales para los ratones de la cepa CD-1, tal como se ha descrito para otros venenos del género.

Debido a la escasa información que hay en Panamá, relacionada con la historia natural, diferencias toxicológicas, ontogénicas y fisiopatológicas del veneno de esta especie, este estudio toma como referencia investigaciones realizadas en otros países con diferentes especies del género *Porthidium*; destacando las semejanzas de los efectos tóxicos que presentan los venenos de este género, las cuales pueden atribuirse a la similitud en su naturaleza química y proteica, según lo señalan recientes trabajos realizados con *P. lansbergii* de Colombia, *P. porrasi*, *P. nasutum* y *P. ophryomegas* de Costa Rica (Jiménez-Charris, 2015; Méndez, 2019; Lomonte *et al.*, 2012).

El primer efecto local evaluado en esta investigación fue el efecto hemorrágico y se encontró que los venenos de serpientes juveniles y adultas de *P. lansbergii* de Panamá, presentaron un potente efecto hemorrágico, coincidiendo con lo señalado por Jiménez-Charris *et al.* (2015) con *P. lansbergii lansbergii* y Méndez (2019) con *P. porrasi* de Costa Rica.

Además, se pudo evidenciar que el veneno de serpientes juveniles causó mayor intensidad, demostrado por el valor bajo de la DHm, en comparación con el veneno de los adultos, es decir, que entre menor es el valor de la DHm, el veneno es más hemorrágico; lo que indica que se necesita una menor dosis de veneno de *P. lansbergii* juvenil para producir el mismo efecto hemorrágico ocasionado por el veneno de los adultos.

En este mismo sentido, los resultados permitieron establecer la diferencia significativa en el diámetro del área hemorrágica producido por ambos venenos, con un nivel de significancia ($P < 0.05$), siendo el veneno de *P. lansbergii* juvenil más hemorrágico que *P. lansbergii* adulto. Estas diferencias observadas entre el veneno de los juveniles y adultos indican que hay una variación ontogénica; con respecto a esto, existen factores que pueden causar dichas variaciones, uno de estos es la edad de los ejemplares en estudio, la geografía, entre otras; como se ha evidenciado para *B. asper* (Alapé-Girón et al., 2008). En relación con lo anterior, a lo largo de la vida de la serpiente se presentan cambios en sus dietas que pueden provocar las diferencias en los efectos fisiológicos del veneno, como ocurre con los juveniles de *P. lansbergii* que tienen una dieta diferente a los adultos, ya que estos se alimentan de pequeños lagartos e insectos y los adultos de pequeños mamíferos y anuros (Molina-Betancourth et al., 2021).

Es importante mencionar que las diferencias entre las intensidades de los efectos de los venenos de *P. lansbergii* juveniles y adultos guardan relación directa con los componentes de estos, como lo describe Cañas Dávila y De Paz Cobo (Cañas Dávila y De Paz Cobo, 2016). Por lo tanto, la composición del veneno puede ser otro de los factores que causan variación en el efecto hemorrágico, como se encontró en este estudio; un aspecto que se observó en el análisis de espectrometría de masas realizado por el CIIMET, donde se detectó que el veneno de serpientes juveniles de Panamá contiene proteínas que no están presentes en el veneno de serpientes adultas; entre estas proteínas se encontraron las hialuronidasas.

A estas enzimas se les ha descrito en algunos estudios realizados en las familias Elapidae y Viperidae, como responsables de la gravedad de las lesiones ocasionadas por la mordedura de la serpiente a la víctima (Delgadillo et al., 2013).

Sin embargo, en investigaciones realizados por Gutiérrez y Lomonte, (2003); Gutiérrez et al. (2009); Fox y Serrano, (2009), se reportó que las metaloproteasas (SVMPs) son los principales componentes del veneno a los cuales se les atribuye el efecto hemorrágico. Esto lo evidencian Jiménez-Charris et al. (2015) y Lomonte et al. (2012), en donde *P. lansbergii lansbergii* con un contenido de 35.5% de SVMPs es responsable de un menor efecto hemorrágico en comparación con *P. nasutum* formado por 52.1% de SVMPs. Estas enzimas causan extravasación, que fue observada al hacer la administración intradérmica del veneno en el abdomen del ratón, ya que degradan la lámina basal de los capilares, afectando el endotelio con alteración y ruptura del mismo (Gutiérrez y Lomonte, 2003).

La segunda actividad analizada de los efectos locales fue la miotoxicidad, observándose que los venenos de *P. lansbergii* juveniles y adultos, ocasionaron un efecto miotóxico moderado, similar al descrito por Jiménez-Charris, et al. (2015), considerando que otras especies como *B. asper* presentan mayor miotoxicidad (Uribe Arjona, 2014; Vélez Parra, 2016). En cambio, produjo una actividad miotóxica ligeramente menor, al comparar con los valores de CK encontrados en estudios realizados con *P. lansbergii lansbergii* de Colombia (De Arco-Rodríguez et al., 2019) y *P. lansbergii rozei* de Venezuela (Ramos et al., 2010).

De igual forma, se pudo demostrar que existen diferencias en la actividad CK entre el veneno de serpientes juveniles y adultas ($P < 0.05$), siendo el veneno de

serpientes juveniles el que provoca mayor daño en el tejido muscular gastrocnemio, como se observó en los ratones. Esto probablemente está asociado a que los individuos juveniles presentan mayor cantidad de miotoxinas que los adultos. Lo que concuerda con Gutiérrez et al. (1980) quienes mencionan que la ontogenia -en la serpiente- produce variaciones en el veneno.

Por otra parte, un efecto observado durante la evaluación del efecto miotóxico, fue la necrosis, que se produjo minutos después de la inoculación del veneno, extendiéndose poco a poco por todo el sitio de la inyección. La necrosis causa pérdida del tejido muscular y disfunción de la extremidad afectada, como fue evidente en los ratones. Estos signos de toxicidad lo explican Gutiérrez y Lomonte (2003) y se lo atribuyen a la acción combinada de miotoxinas y toxinas hemorrágicas, que originan una lesión celular y daño a vasos sanguíneos desencadenando isquemia en el tejido muscular.

La necrosis observada en esta actividad es causada por la acción de las miotoxinas (fosfolipasas A2), quienes, al unirse al retículo sarcoplásmico de las fibras musculares, provocan un cambio en la permeabilidad de los iones de calcio, desorganizando la membrana plasmática de las células musculares, facilitando la degradación de la masa muscular, lo que conlleva a un daño irreversible en el músculo (Cañas et al., 2016; Jiménez-Charris et al., 2015; Gutiérrez et al., 2011; Lomonte, 2009).

En cuanto a los efectos sistémicos analizados, no se observó el efecto desfibrinante, con ninguno de los dos venenos, ya que todas las muestras de sangre

se coagularon en tiempo normal, al ser comparadas con el grupo control, coincidiendo con lo reportado por Otero et al. (2002), en el veneno de *P. nasutum*.

Es necesario resaltar que otros venenos de vipéridos presentes en Panamá, pueden producir un potente efecto desfibrinante, como es el caso de *B. asper* (Uribe Arjona, 2014; Vélez Parra., 2016).

Un efecto importante que se analizó durante la realización de este ensayo fue que, al utilizar dosis mayores de veneno ($\geq 100 \mu\text{g}$), los ratones murieron instantáneamente, debido a una hemorragia severa que se observó internamente, evidenciada por sangrado en la cavidad abdominal (comprobado por disección) y, externamente, por sangrado profuso en la nariz, boca y oído, también se produjo hematuria. Todo esto confirma la acción potente de las hemorraginas presentes en el veneno de *P. lansbergii*; siendo estas metaloproteinasas hemorrágicas las responsables de los sangrados sistémicos, como lo describe Gutiérrez et al. (2011).

Otro efecto sistémico evaluado fue la letalidad, donde el veneno de adulto de *P. lansbergii* presentó un valor menor de DL_{50} que el veneno del juvenil, esto significa que el ejemplar adulto requiere inocular una menor cantidad de veneno para ocasionar la muerte al ratón.

Hay que resaltar que *P. lansbergii* de Panamá presenta un valor mayor de DL_{50} con respecto a otras especies como *P. nasutum* y *P. lansbergii. lansbergii* de Colombia y *P. lansbergii hutmanni* de Venezuela. A su vez, las DL_{50} reportadas para el género *Porthidium* son mucho mayores que la de *B. asper* de Panamá, lo que indica que este

último es mucho más letal (Otero et al., 2002; De Arco-Rodríguez et al., 2019; Jiménez-Charris, et al., 2015; Vargas et al., 2011; Uribe Arjona, 2014).

Así mismo, los signos observados en los ensayos de letalidad diferían en función de las dosis administradas, obteniendo que, a mayor dosis, se aumentaba la intensidad del efecto, tal como lo expresa Jiménez-Charris et al. (2021) en su estudio, describiendo que los ratones presentaron movimientos tónicos de flexo-extensión de la cabeza, debilidad en las patas traseras y delanteras, bradipnea, desequilibrio toracoabdominal y pérdida del control de los esfínteres anal y vesical. Referente a esto, la dificultad para respirar que se observó en los ratones; Jiménez-Charris et al. (2021) lo atribuyen a la ruptura de las membranas celulares y del epitelio bronquial, que conllevan a la acumulación de eritrocitos, causando la obstrucción de los espacios alveolares, deteniendo el intercambio gaseoso y generando la insuficiencia respiratoria.

Otros aspectos a considerar, son los factores que pueden causar las variaciones en los resultados de DL_{50} para este estudio. Jurado (1989) citado en Cubillos et al. (1999), señalan que la DL_{50} de una sustancia puede variar según la especie del animal, sexo, línea genética y vía de administración; tanto es así, que De Arco-Rodríguez et al. (2019) mencionan que la cepa de ratones CD-1 utilizados en la investigación de Jiménez-Charris et al. (2015), mostraron menor sensibilidad a los componentes tóxicos del veneno de *P. lansbergii lansbergii*, a diferencia de los ratones macho de la cepa BALB/c, empleados en su estudio, con un valor de DL_{50} de 8.2 y 5.7 $\mu\text{g/g}$, respectivamente.

Finalmente, los resultados observados en el ensayo de letalidad pueden ser originados por diversas causas, dado que el veneno se distribuye a nivel sistémico y sus componentes provocan múltiples alteraciones como los son sangrados, coagulopatía y choque cardiovascular (Gutiérrez et al., 2014; ICP, 2009). Además, Jiménez-Charris et al., (2021), señalan que el veneno de *P. lansbergii lansbergii* afecta órganos vitales como el cerebro, hígado y riñones, cuando ingresa a la circulación sanguínea.

CONCLUSIONES

Al caracterizar los efectos toxicológicos del veneno de serpientes juveniles y adultas de *P. lansbergii* en ratones CD-1 se llegó a las siguientes conclusiones:

- Al evaluar los efectos toxicológicos locales se demostró que los venenos de serpientes juveniles y adultas de *Porthidium lansbergii* presentan una fuerte actividad hemorrágica y una moderada miotoxicidad en ratones de la cepa CD-1.
- Se encontró que los venenos de serpientes juveniles y adultas de *Porthidium lansbergii* mostraron efectos toxicológicos sistémicos, sin producir actividad desfibrinante, pero con la capacidad de ocasionar una baja actividad letal.
- Las intensidades de los efectos causados por los venenos de las serpientes juveniles de *P. lansbergii* son diferentes a los provocados por las serpientes adultas.

RECOMENDACIONES

- Es importante que se realicen más estudios referentes a la toxicología, historia natural y ontogenia de la especie *P. lansbergii* de Panamá, debido a la escasez de información.
- Se recomienda llevar a cabo más investigaciones sobre la ontogenia de esta serpiente y los factores que causan las variaciones en el veneno.
- Estos estudios del veneno deben ser profundizados con el fin de enriquecer y aportar más datos, lo cual permitirá mejorar los tratamientos médicos a pacientes por envenenamiento ofídico y al desarrollo de antivenenos más eficaces.
- Es importante que se realicen más estudios de venenos -de otras especies- que son de importancia médica en el país.
- Promover proyectos de educación ambiental, medidas de prevención y primeros auxilios en la población para evitar casos de mordeduras por serpientes y preservar la biodiversidad.

REFERENCIAS

- Acevedo Benítez, E.D. y Chávez José, J.H. (2014) Comportamiento clínico, epidemiológico y uso de suero antiofídico BIOL, en el manejo de accidentes ofídico en hospitales de Chontales, Rio San Juan, Matagalpa y Jinotega, en el período de enero a agosto de 2013. [Tesis doctoral, Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua] Repositorio centroamericano SIIDCA-CSUCA <http://repositorio.unan.edu.ni/3003/1/75123.pdf>
- Alape-Girón, A., Sanz, L., Escolano, J., Flores-Díaz, M., Madrigal, M., Sasa, M., & Calvete, J. J. (2008). Snake venomomics of the lancehead pitviper *Bothrops asper*: geographic, individual, and ontogenetic variations. *Journal of proteome research*, 7(8), 3556–3571. <https://doi.org/10.1021/pr800332p>
- De Arco -Rodríguez, B., Montealegre-Sánchez, L., Solano-Redondo, L., Castro-Herrera, F., Ortega, J. G., Castillo, A., Vargas-Zapata, C., & Jiménez-Charris, E. (2019). Phylogeny and toxicological assessments of two *Porthidium lansbergii lansbergii* morphotypes from the Caribbean region of Colombia. *Toxicon, official journal of the International Society on Toxinology*, 166, 56-65. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2019.05.010>
- Barish, R. A. y Arnold, T. (4 de junio de 2022,). Mordeduras de serpiente. Manual MSD versión para público general. <https://www.msdmanuals.com/es/hogar/traumatismos-y-envenenamientos/mordeduras-y-picaduras/mordeduras-de-serpiente>
- Batista A. y Miranda, M. (2020). Las serpientes venenosas y las no venenosas más comunes de panamá. Los Naturalistas, Panamá.
- Brenes Zúñiga, M. (2014). Accidente ofídico, Toxicología. *Revista médica de Costa Rica y Centroamérica*. 71(611), 539-550. <https://www.medigraphic.com/cgi-bin/new/resumen.cgi?IDARTICULO=51305>
- Bogarín, G., Morais, J.F., Yamaguchi, I.K., Stephano, M.A., Marcelino, J.R., Nishikawa, A.K., Guidolin, R., Rojas, G., Higashi, H.G., & Gutiérrez, J.M. (2000). Neutralization of crotaline snake venoms from Central and South America by antivenoms produced in Brazil and Costa Rica. *Toxicon* 38, 1429-1441.

- Campbell, J. A., & Lamar, W. W. (2004). The venomous reptiles of the western hemisphere. Comstock Publishing Associates.
- Cañas Dávila, C.A. y De Paz Cobo, D.A. (2016). Manifestaciones clínicas causadas por la mordedura de serpientes, en G. J. Tobón García et al (Ed), *Serpientes venenosas: lecciones aprendidas desde Colombia*, (1 ed., pp. 130-150). Fundación Valle del Lili 2016. DOI:10.13140/RG.2.1.2218.8565
- Castoe, T. A., Sasa, M. M., & Parkinson, C. L. (2005). Modeling nucleotide evolution at the mesoscale: the phylogeny of the neotropical pitvipers of the *Porthidium* group (Viperidae: crotalinae). *Molecular phylogenetics and evolution*, 37(3), 881–898. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2005.05.013>
- Castro Herrera, F., Castaño Valencia, R.S. y Cañas Dávila, C.A. (2016). Aspectos anatomofisiológicos de las serpientes. En G. J. Tobón García et al (Eds), *Serpientes venenosas: lecciones aprendidas desde Colombia* (1. ed., pp. 38-57). Fundación Valle del Lili 2016. DOI:10.13140/RG.2.1.2218.8565
- Cubillos, A., Gädicke, P., Von Baer, D., y Ahumada, F. (1999). Determinación de la dosis letal media (DL50) de alcaloides del lupino en pollas de reposición blancas y marón. *Archivos de medicina veterinaria*, 31(2), 249-256. <https://dx.doi.org/10.4067/S0301-732X1999000200014>
- Delgadillo, J., Palomino, M., Lazo, F., Rodríguez, E., González, E., Severino, R., y Yarlequé, A. (2013). Purificación y algunas propiedades de una hialuronidasa del veneno de la serpiente *Bothrops brazili* "jergón shushupe". *Revista de la Sociedad Química del Perú*, 79(4), 348-358. http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1810-634X2013000400006&lng=es&tlng=es.
- De Roodt, Adolfo R., Estévez-Ramírez, J., Paniagua-Solís, J. F., Litwin, Silvana., Carvajal-Saucedo, Alejandro., Dolab, J.A., Robles-Ortiz, L. E., y Alagón, A. (2005). Toxicidad de venenos de serpientes de importancia médica en México. *Gaceta médica de México*, 141(1), 13-21.

http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0016-38132005000100003&lng=es&tlng=es.

- De Paz Cobo, D. A., Cañas Dávila, C. A., y Castro Herrera, F. (2016). Serpientes de importancia médica en el mundo, en G. J. Tobón García et al (Ed), *Serpientes venenosas: lecciones aprendidas desde Colombia* (1. ed., pp. 165-82). Fundación Valle del Lili 2016. DOI:10.13140/RG.2.1.2218.8565
- Díaz Concepción, A. y Almagro Vázquez, D. (2001). Estado actual del mecanismo de la coagulación sanguínea. *Revista Cubana de Hematología, Inmunología y Hemoterapia*, 17(2),77-89.<https://www.imbiomed.com.mx/articulo.php?id=6161>
- Elizondo-Lara, L. (2019). Reptiles. En O. López y M. Mainieri (Eds), *Importancia medica de la flora y la fauna panameña* (ed.1., vol 1., pp. 120-143) SENACYT
- Flores-Padrón, D., Gregoriani, T., Kiriakos, D. y Cornejo-Escobar, P. (2014). Extensión en el rango de distribución de *Porthidium lansbergii rozei* Peters, 1968 (toxicofera: Viperidae) para la región Nororiental de Venezuela, incluyendo datos morfológicos y de historia natural. *Saber, Revista Multidisciplinaria del Consejo de Investigación de la Universidad de Oriente*, 26(1),91-96. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=427739465015>
- Fondevila, C.G. (2018). Coagulación intravascular diseminada. *Revista Hematología*, 22, 37–39. https://www.sah.org.ar/revistasah/numeros/vol22/sup/09_Coagulacion_intravascular_diseminada.pdf
- Fox, J. W., & Serrano, S. M. (2009). Timeline of key events in snake venom metalloproteinase research. *Journal of proteomics*, 72(2), 200–209. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2009.01.015>
- Girón, M.E., Ramos, M.I., Cedeño, L., Carrasquel, A., Sánchez, E.E., Navarrete, L.F., & Rodríguez-Acosta, A. (2018). Exploring the biochemical, haemostatic and toxinological aspects of mapanare dry-tail (*Porthidium lansbergii rozei*) snake´s

venom causing human accidents in Eastern Venezuela. *Investigación Clínica*, 59(3), pp.260 - 277. <https://doi.org/10.22209/IC.v59n3a06>

National Research Council. 2011. Guide for the Care and Use of Laboratory Animals: Eighth Edition. Washington, DC: The National Academies Press. <https://doi.org/10.17226/12910>

Gutiérrez J M., Chaves. F., y Bolaños, R. (1980). Estudio comparativo de venenos de ejemplares recién nacidos y adultos de *Bothrops asper*. *Revista Biología Tropical*, 28(2), 341–351. <https://revistas.ucr.ac.cr/index.php/rbt/article/view/25552>

Gutiérrez, J.M. y Cerda Fallas, L. (1984). Mecanismo de acción de miotoxinas aisladas de venenos de serpientes. *Revista de biología tropical*, 32(2), 213-221. <https://hdl.handle.net/10669/29128>

Gutiérrez, J.M., Gené, J.A., Rojas, G., & Cerdas, L., (1985). Neutralization of proteolytic and hemorrhagic activities of Costa Rican snake venoms by a polyvalent antivenom. *Toxicon: official journal of the International Society on Toxinology*, 23, 887-893. [https://doi.org/10.1016/0041-0101\(85\)90380-0](https://doi.org/10.1016/0041-0101(85)90380-0)

Gutiérrez, J. M, Lomonte B, (2003). Efectos locales en el Envenenamiento ofídico en América Latina. En J.L C. Cardoso et al (Eds), *Animais Peçonhentos no Brasil Biología, Clínica e Terapêutica dos Acidentes*, (1 ed, pp 310-323) Sarvier FAPESP, Sao Paulo. <https://hdl.handle.net/10669/74749>

Gutiérrez, J. M., Fan, H. W., Silvera, C. L., & Angulo, Y. (2009). Stability, distribution and use of antivenoms for snakebite envenomation in Latin America: report of a workshop. *Toxicon: official journal of the International Society on Toxinology*, 53(6), 625–630. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2009.01.020>

Gutiérrez, J. M., Escalante, T., & Rucavado, A. (2009). Experimental pathophysiology of systemic alterations induced by *Bothrops asper* snake venom. *Toxicon: official journal of the International Society on Toxinology*, 54(7), 976–987. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2009.01.039>

- Gutiérrez, J.M., Lomonte, B., Rucavado, A. y Chávez, F. (2011). Veneno de serpientes de la familia Viperidae en América: bioquímica y fisiopatología. En G. D'Suze et al (Eds), *Emergencia por animales ponzoñosos en las Américas*, pp. 461-487. <https://hdl.handle.net/10669/74734> Dicresa, SA de CV.
- Gutiérrez, J.M. (2014). Current challenges for confronting the public health problem of snakebite envenoming in Central America. *Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases*, 20 (7). <https://doi.org/10.1186/1678-9199-20-7>
- Gutiérrez, J.M., Rucavado, A., Solano, G., Lomonte, B., Herrera, M., Segura, A., Villalta, M., Vargas, M., Escalante, T. y León, G. (2015). Métodos para el estudio de actividades toxicas de venenos de serpientes. https://repositorio.unne.edu.ar/bitstream/handle/123456789/33873/RIUNNE_FACENA_FG_Gonzalez_KY.pdf?sequence=1
- En Pazos, F. y Álvarez, C (Eds), Estrategias y avances en el estudio de toxinas de interés para la biomedicina. Enemérita Universidad Autónoma de Puebla (19 - 43). https://www.researchgate.net/publication/323902876_Estrategias_y_Avances_en_el_Estudio_de_Toxinas_de_Interes_para_la_Biomedicina
- Instituto Clodomiro Picado. (2007). Determinación de actividades tóxicas de venenos de serpientes y su neutralización por antivenenos. *Manual de métodos de laboratorio*. <https://docplayer.es/65879696-Determinacion-de-actividades-toxicas-de-venenos-de-serpientes-y-su-neutralizacion-por-antivenenos.html>
- Instituto Clodomiro Picado. (2009). El envenenamiento por mordedura de serpiente en Centroamérica. Repositorio Institucional de la Universidad de Costa Rica. <https://hdl.handle.net/10669/30344>
- Jiménez-Charris, E., Montealegre-Sánchez, L., Solano-Redondo, L., Mora-Obando, D., Camacho, E., Castro-Herrera, F., Fierro- Pérez, L., & Lomonte, B. (2015). Proteomic and functional analyses of the venom of *Porthidium lansbergii lansbergii* (Lansberg's hognose viper) from the Atlantic Department of Colombia. *Journal of Proteomics*, 114, 287–299. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jprot.2014.11.016>

- Jiménez-Charris, E., González-Duque, D., Moreno, M. C., Solano-Redondo, L., Montoya-Gómez, A., Montealegre-Sánchez, L., & Buriticá, E. (2021). Evaluation of the systemic alterations triggers by *Porthidium lansbergii lansbergii* snake venom. *Acta tropica*, 222, 106047. 1-8. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2021.106047>
- Jurado, C. 1989. Toxicología Veterinaria. (2ª ed.), Salvat, Barcelona.
- Kondo, H., Kondo, S., Ikezawa, H., & Murata, R. (1960). Studies on the quantitative method for determination of hemorrhagic activity of Habu snake venom. *Japanese journal of medical science & biology*, 13, 43–52. <https://doi.org/10.7883/yoken1952.13.43>
- Lomonte, B. (1994). Tissue damage and inflammation induced by snake venoms. Ph.D. Dissertation, Göteborgs Universitet, Sweden.
- Lomonte, B., Rey-Suárez, P., Tsai, W. C., Angulo, Y., Sasa, M., Gutiérrez, J. M., & Calvete, J. J. (2012). Snake venomomics of the pit vipers *Porthidium nasutum*, *Porthidium ophryomegas*, and *Cerrophidion godmani* from Costa Rica: toxicological and taxonomical insights. *Journal of proteomics*, 75(5), 1675–1689. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2011.12.016>
- Lomonte, B. (2012). Venenos de serpiente: de la investigación al tratamiento. *Acta Médica Costarricense*, 54(2), 86-96. <https://hdl.handle.net/10669/686>
- López Batista, C. A., Garcés Rizo, Y., Borrero Hechavarría, R. y Gómez Matamoros, R. (2020). *Fisiopatología de la coagulación intravascular diseminada en Cuba*. CIBAMANZ 2020. I Congreso Virtual de Ciencias Básicas Biomédicas de Granm. <http://www.cibamanz2020.sld.cu/index.php/cibamanz/cibamanz2020/paper/view/146>
- Martins, M., Marques, O. & Sazima, I. (2002). Ecological and phylogenetic correlates of feeding habits in neotropical pitvipers of the genus *bothrops*. *Biology of the Vipers*. 307-328. https://ecoevo.com.br/publicacoes/pesquisadores/otavio_marques/2002_EcolPhylogeneticcorrelatesfeedhabitas.pdf

- Medina Rangel, G., & López-Perilla, Y. (2015). *Porthidium lansbergii* Geographic distribution. *Herpetological Review*, 46(4), 575-576. https://www.researchgate.net/publication/287818274_Porthidium_lansbergii_Geographic_distribution
- Méndez Argüello, R. (2019). Caracterización proteómica, funcional e inmunoneutralización del veneno de serpiente de *Porthidium porrasi* de Costa Rica [Tesis de postgrado, Universidad de Costa Rica]. Repositorio institucional de la universidad de Costa Rica. <https://hdl.handle.net/10669/79404>
- Molina-Betancourth K. J., Loaiza-López, M. F., y Cubides-Cubillos, S. D. (2021). *Porthidium lansbergii* (Schlegel, 1841). *Catálogo de Anfibios y Reptiles de Colombia*, 7(2). 51-63. <https://www.acherpetologia.org/publicaciones/>
- Monteza-Moreno, C. M., Ramos, C., Martínez, V., & Sasa, M. (2020). On the identity of hog-nosed pit-vipers from western Panama: a review of specimens of *Porthidium lansbergii* (schlegel, 1841) in lower Central America. *Tecnociencia*, 22(2), 27–44. <https://doi.org/10.48204/j.tecno.v22n2a2>
- Morton, D. B., Jennings, M., Buckwell, A., Ewbank, R., Godfrey, C., Holgate, B., Inglis, I., James, R., Page, C., Sharman, I., Verschoyle, R., Westall, L., y Wilson, A. B. (2001). Refinando los procedimientos para la administración de sustancias - Edición en español. *Laboratory Animals* 35, Vol. 1-41. <https://sea.umh.es/files/2011/07/Refinamiento-administraci%C3%B3n-sustancias.pdf>
- Múnera Bohórquez, G. (2011). Manejo del Accidente ofídico. *Revista Colombiana de Ortopedia y traumatología*, 25(3), 274-279. <https://www.imbiomed.com.mx/articulo.php?id=80358>
- Orduna, T.A., Lloveras, S.C., De Roodt, A.R., García, S.I., Haas, A.I., Moreno, I., Penna, A.M. y Sagardoyburu, S. (2007). Guía de prevención diagnóstico, tratamiento y vigilancia epidemiológica de los envenenamientos ofídicos
- Organización Mundial de la Salud (17 de mayo de 2021), Mordeduras de Serpientes Venenosas. <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/snakebite-envenoming>

- Otero, R., Gutiérrez, J., Mesa, M.B., Duque, E., Rodríguez, O., Arango, J.L., Gómez, F., Toro, A., Cano, F., Rodríguez, L.M., Caro, E., Martínez, J., Cornejo, W., Gómez, L.M., Uribe, F.L., Cárdenas, S., Núñez, V., & Díaz, A. (2002). Complications of *Bothrops*, *Porthidium*, and *Bothriechis* snakebites in Colombia. A clinical and epidemiological study of 39 cases attended in a university hospital. *Toxicon, official journal of the International Society on Toxinology*, 40(8), 1107–1114. [https://doi.org/10.1016/s0041-0101\(02\)00104-6](https://doi.org/10.1016/s0041-0101(02)00104-6)
- Otero Patiño, R., Núñez, V., Barona Acevedo, M.J., Díaz Cadavid, A., y Saldarriaga, M. (2002). Características bioquímicas y capacidad neutralizante de cuatro antivenenos polivalentes frente a los efectos farmacológicos y enzimáticos del veneno de *Bothrops asper* y *Porthidium nasutum* de Antioquia y Chocó. *Iatreia*. 15(1), 5-15. <https://revistas.udea.edu.co/index.php/iatreia/article/view/3940>
- Otero-Patiño, R. (2009). Epidemiological, clinical and therapeutic aspects of *Bothrops asper* bites. *Toxicon: official journal of the International Society on Toxinology*, 54(7), 998–1011. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2009.07.001>
- Pecchio, M., Suárez, J. A., Hesse, S., Hersh, A. M., & Gundacker, N. D. (2018). Descriptive epidemiology of snakebites in the Veraguas province of Panama, 2007–2008. *Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 112(10), 463–466. <https://doi.org/10.1093/trstmh/try076>
- Pérez Barly, L., Guirola Fuentes, J., Fleites Mestres, P., Pérez García, Y., Milián Pérez, T.M. y López García, D. (2014). Origen e historia de la Toxicología. *Revista Cubana de Medicina Militar*, 43(4), 499-514. <https://www.medigraphic.com/cgi-bin/new/resumen.cgi?IDARTICULO=55464>
- Pineda, M. E., Girón, M. E., Estrella, A., Sánchez, E. E., Aguilar, I., Fernandez, I., Vargas, A. M., Scannone, H., & Rodríguez-Acosta, A. (2008). Inhibition of the hemorrhagic and proteolytic activities of Lansberg's hognose pit viper (*Porthidium lansbergii hutmanni*) venom by opossum (*Didelphis marsupialis*) serum: isolation of *Didelphis marsupialis* 0.15Dm fraction on DEAE-cellulose

- chromatography. *Immunopharmacology and immunotoxicology*, 30(4), 883–896. <https://doi.org/10.1080/08923970802135849>
- Pineda, M.E. y Rodríguez, Alexis. (2018). El impresionante universe de los venenos, su variabilidad bioquímica, hemostática y tóxica en las serpientes (Serpentes: Viperidae). <https://www.researchgate.net/publication/331647986>
- Pineda, M., Vargas, A., & Rodríguez-Acosta, A. (2019). Haemostatic alterations caused by the venom of Lansberg's hognosed pitviper (*Porthidium lansbergii hutmanni*) in Venezuelan patients. *Revista Cubana de Medicina Tropical*, 71(2),1-27. <http://www.revmedtropical.sld.cu/index.php/medtropical/article/view/371/270>
- Ramírez, M. y Rojas, M. (2010). La necrosis un mecanismo regulado de muerte celular. *Revista Iatreia*, 23(2), 166-177. http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0121-07932010000200008&lng=pt&lng=es.
- Ramos, J., Veliz, D., Bremo, A., & Irausquín, J. (2010). Efecto de la toxicidad *in vivo* e *in vitro* del veneno de *Porthidium lansbergii rozei*. *Comunidad y Salud*, 8(1), 25-31. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=375740246005>
- Ray, J. (2017). Snakes of Panama: A Field Guide to all Species (Team Snake Panama) (English Edition) (1.a ed.).
- Rivera Prieto, D. (2017). Efecto del cambio en el uso del suelo sobre la incidencia del accidente ofídico provocado por *Bothrops asper* y *Porthidium lansbergii* (Serpentes: Viperidae) en el departamento de Antioquia, Colombia [Tesis de grado-maestría, Universidad nacional de Colombia] Repositorio institucional Biblioteca digital – Universidad Nacional de Colombia. <https://repositorio.unal.edu.co/handle/unal/60823>
- Rodríguez, A., Acosta de Patiño, H., Correa, D., Saldaña, J., Navarro, D., Gordón, C., Rujano, F., Nieto, M., Moreno, M., Serracín, D., Flores, N., Sánchez, Y., Medina, F., Torres, F., Urieta, A., Leynaud, G. y Non, J. (2012). Distribución geográfica y potencial de serpientes venenosas, con énfasis en las vinculadas en accidentes ofídicos en Panamá. 2005-2011. En XIV Congreso Nacional de

Ciencia y Tecnología: Libro de resúmenes. Ciudad de Panamá, Panamá: APANAC. <https://www.senacyt.gob.pa/wp-content/uploads/2018/10/Libro-XIV-CONGRESO-NACIONAL-DE-CIENCIA-Y-TECNOLOGIA.pdf>

Román Barrientos, C. (2000). Determinación de la DL50 y de toxicidad retardada a siete días del extracto de *Allium ampeloprasum* en ratones [Tesis de Grado, Universidad austral de Chile]. <http://cybertesis.uach.cl/tesis/uach/2000/fvr758d/doc/fvr758d.pdf>

Ruiz-Campos, M., Sanz, L., Bonilla, F., Sasa, M., Lomonte, B., Zaruma-Torres, F., Terán, M., Fernández, J., Calvete, J. J., Caldeira, C., & Da Silva, S. L. (2021). Venomics of the poorly studied hognosed pitvipers *Porthidium arcosae* and *Porthidium volcanicum*. *Journal of proteomics*, 249, 104379. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2021.104379>

Solís López, D. L. y Tinoco Carvajal, B. L. (2017). Manejo clínico según norma terapéutica, de pacientes atendidos con accidente ofídico en el área de Emergencia. Hospital Gaspar García Laviana-Rivas. Enero 2010- diciembre 2014 [Tesis monográfica para optar al título de médico y cirujano, Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua]. Repositorio Institucional UNAN-Managua <http://repositorio.unan.edu.ni/id/eprint/7337>

Theakston, R.D.G. & Reid, H.A. (1983). Development of simple standard assay procedures for the characterization of snake venoms. *Bulletin of the World Health Organization* 61, 949-956.

Tomba, A. N. (2019). Patrones Biogeográficos en las serpientes de la familia Viperidae de Perú; Distribución e impacto antrópico [Tesina grado en Ciencias Biológicas, Universidad nacional de Córdoba]. Repositorio digital Universidad nacional de Cordoba. <http://hdl.handle.net/11086/11558>

Uribe Arjona, A. Y. (2014). Caracterización bioquímica, farmacológica y toxicológica del veneno de *Bothrops asper* de La República de Panamá [Tesis de maestría, Universidad de Panamá, Vicerrectoría de Investigación y Postgrado].

Repositorio Institucional Digital de la Universidad de Panamá. <http://up-rid.up.ac.pa/1943/>

Valderrama O.M. (2010). El Accidente Ofídico en Panamá. *Revista Médico Científica*, 16(1), 28-36.

<https://www.revistamedicocientifica.org/index.php/rmc/article/view/152>

Vargas, A., Finol, H., Girón, M., Scannone, H., Fernández, I., & Rodríguez-Acosta, A. (2011). Effects of lansberg's hognose pit vipers (*Porthidium lansbergii hutmanni*) venom on renal ultrastructure in experimental mice. *Acta Scientiae Veterinariae*, 39(1), 1-6. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=289022244002>

Vargas Ruíz, A. (2016). El fibrinógeno: su fisiología e interacciones en el sistema de la coagulación. *Revista mexicana de Anestesiología*, 39(2), 321-323. <https://www.medigraphic.com/cgi-bin/new/resumen.cgi?IDARTICULO=66119>

Vélez Parra, S. M. (2016). Variación geográfica de la actividad farmacológica y tóxica del veneno de *Bothrops asper* de Panamá [Tesis de maestría, Universidad de Panamá]. Repositorio institucional digital de la Universidad de Panamá. <http://up-rid.up.ac.pa/1321/>

Vera, A., Páez, M. y Gamarra de Cáceres, G. (2006). Caracterización Epidemiológica de los accidentes ofídicos, Paraguay 2004. *Memorias Del Instituto De Investigaciones En Ciencias De La Salud*, 4(1), 20–24. <https://revistascientificas.una.py/index.php/RIIC/article/view/717>

Voelger, M., Gómez-Fonseca, E. D. y Merlo, L. (2020). Serpientes venenosas presentes en el Estado Zulia, Venezuela. Versión 1. <https://fieldguides.fieldmuseum.org/es/gu%C3%ADas/gu%C3%ADa/1307>

WCH Toxicological Clinical Resources (S.f). Clinical Toxinology Resources. <http://www.toxinology.com/>

World Health Organization (2013). Annex 5 Guidelines for the production, control and regulation of snake antivenom immunoglobulins Replacement of Annex 2 of WHO Technical Report Series, No. 964.

<https://www.who.int/publications/m/item/snake-antivenom-immunoglobulins-annex-5-trs-no-1004>

World Society of Protection of Animals. World Protection of Animals.
<https://www.worldanimalprotection.ca/>

Yañez-Arenas, C. (2004). Colmillos mortales: revisión sobre las serpientes venenosas de Yucatán. BA Íche, Universidad autónoma de Yucatán. 1(3), 2-7.

Yarleque, A. (2000). Las serpientes peruanas y sus venenos. Fondo editorial de la universidad nacional mayor de San Marcos. Lima, Perú.

Yarlequé Chocas, A. (2019). Las serpientes venenosas: un modelo de evolución y de producción de componentes tóxicos. *Revista de la Sociedad Química del Perú*, 85(4), 387–388. http://www.scielo.org.pe/scielo.php?pid=S1810-634X2019000400387&script=sci_arttext

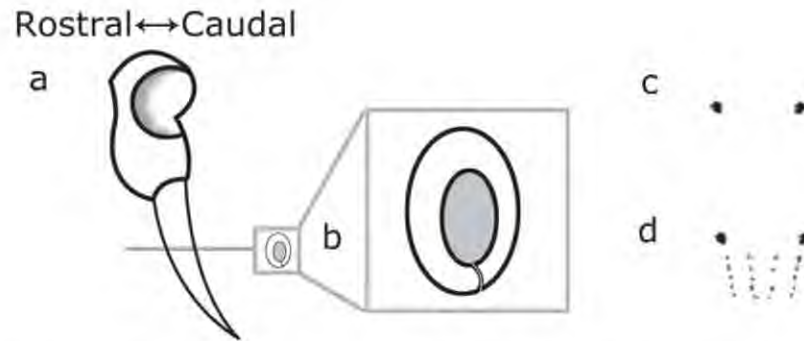
Zambrano-Montesdeoca, A.J., Rendón-Párraga, J.Z., Trujillo-Chávez, M.B. y Valero-Cedeño, N. (2019). Concentración sérica de creatina-quinasa y funcionalismo renal en adultos de centros de entrenamiento físico de Calceta. *Revista científica Dominio de las Ciencias*, 5(1), 818-843. <http://dx.doi.org/10.23857/dc.v5i1.1085>

Zúñiga Carrasco, I. R. y Caro Lozano, J. (2013). Aspectos clínicos y epidemiológicos de la mordedura de serpientes en México. *Evidencia médica e investigación en salud*, 6 (4), 125-136. <https://www.medigraphic.com/pdfs/evidencia/eo-2013/eo134d.pdf>

ANEXOS

Anexo 1. Algunas características de la familia Viperidae.

Maxilar de una serpiente solenoglifa (Viperidae).



a) Vista lateral del maxilar, b) Corte transversal del colmillo “tubulado”, c) Simulación del patrón de mordida con los colmillos y d) Con las marcas de las otras denticiones superiores.

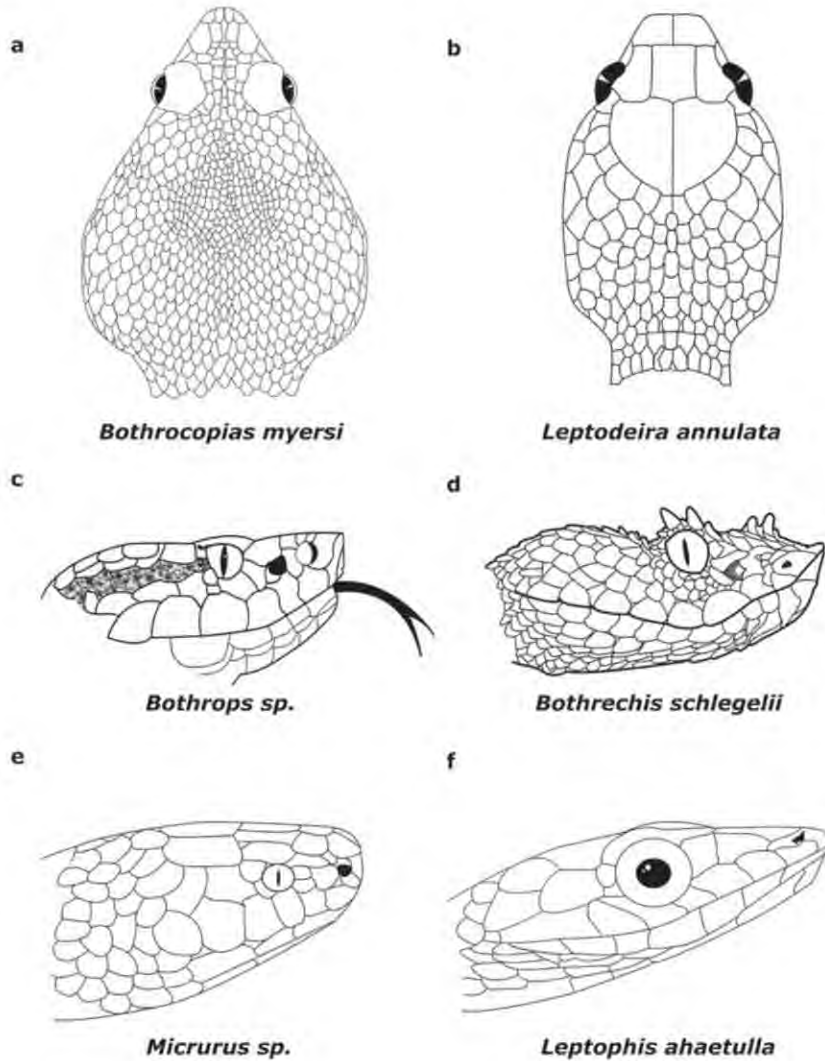
Figura elaborada por Rafael Santiago Castaño.

Variación fenotípica en *Porthidium lansbergii* de Panamá y Colombia.



Fotografías: diseño dorsal y coloración. A) Claudio Monteza-Moreno (Panamá); B, E y F) Guido Fabian Medina-Rangel; C) Esteban Alzate; D) Sergio D. Cubides-Cubillos. Fuente: Molina-Betancourth et al. (2021).

Anexo 2. Diferenciación práctica entre víboras y serpientes no venenosas por las características de sus cabezas.

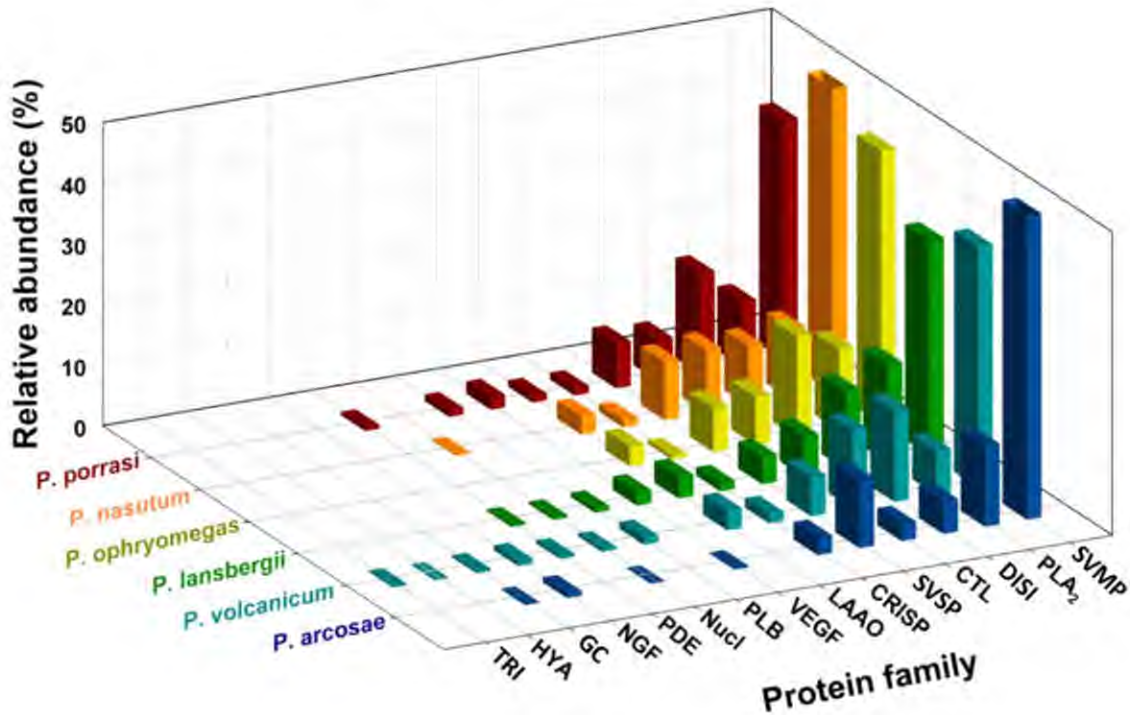


a) Escamas superiores de la cabeza muy pequeñas; serpiente venenosa. b) Escamas superiores de la cabeza grandes, laminares; serpientes no venenosas y corales. c) y d) Foseta termoreceptora; punto oscuro delante del ojo, venenosas. e) Ojo muy pequeño, coral venenosa. f) Ojo grande, muy visible, serpientes no venenosas.

Figura realizada por Rafael Santiago Castaño.

Anexo 3. Componentes de algunos venenos del género *Porthidium* de otros países.

Comparación de algunos venenos del género *Porthidium*.



PLA₂: fosfolipasas A₂; **SVSP**: serina proteinasas; **LAAO**: L-aminoácido oxidasa; **SVMP**: metalloproteinasas, **DIS**: desintegrina; **CTL**: lectina tipo C; **5'-NU**: 5' nucleotidasa; **PLB**: fosfolipasa B; **PDE**: fosfodiesterasa; **VEGF**: factor de crecimiento endotelial vascular; **CRISP**: proteína secretora rica en cisteína; **PEP**: péptidos; **NGF**: factor de crecimiento nervioso; **GC**: glutaminil ciclotransferasa; **HYAL**: hialuronidasa; **TRI**: triosafosfato isomerasa. Fuente: Ruiz-Campos et al. (2021).

Composición proteica comparativa de los venenos de las especies de *Porthidium* encontradas en Colombia y Costa Rica.

Familia de proteínas	% del total de proteínas del veneno		
	<i>P. lansbergii lansbergii</i> ^a	<i>P. nasutum</i> ^b	<i>P. ophryomegas</i>
Metaloproteinasas	35.5	52.1	45.0
Fosfolipasas A ₂	16.2	11.6	13.5
Desintegrinas	12.9	9.9	16.7
Péptidos pequeños	12.4	1.9	4.2
Lectina tipo C	6.7	10.4	8.0
Serina proteinasas	4.5	9.6	7.3
L-amino ácido oxidasas	3.6	3.0	3.3
svVEGF	2.2	–	–
CRISP	1.4	1.3	0.6
Fosfolipasas B	0.7	–	–
5' nucleotidasas	0.4	0.2	–
Fosfodiesterasas	0.3	–	–
Desconocida	3.2	–	1.4
Número de familias	12	9	8

^a estudio actual; ^b Aunque *P. nasutum* se encuentra en Colombia, los datos corresponden a especímenes de Costa Rica (Lomonte et al., 2012).

Fuente: (Jiménez-Charris et al., 2015; Lomonte et al., 2012)

Anexo 4. Análisis estadístico de la actividad hemorrágica mediante el programa SPSS.

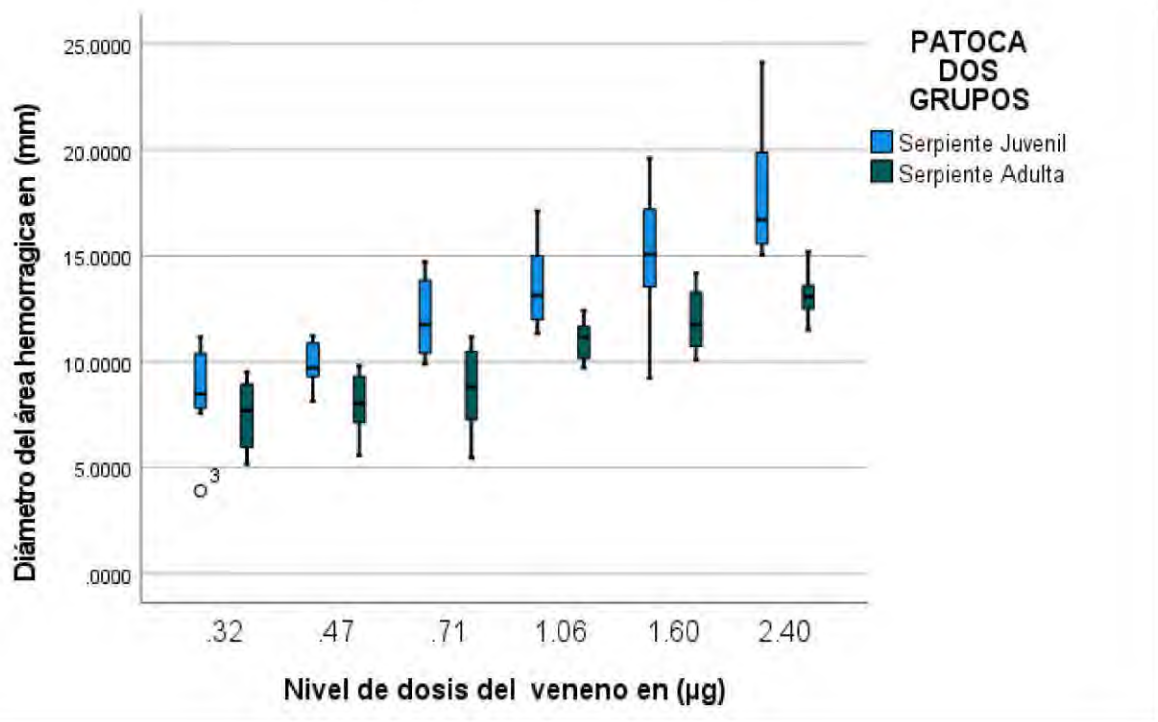
Análisis ANOVA

Comparación de las medias de todos los datos con las dosis aplicadas de los venenos juveniles y adultos de *P. lansbergii*.

		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	(Combinado)	647.79	5	129.558	20.87	<.001
Dentro de grupos		552.50	89	6.208		
Total		1200.29	94			

Comparando las medias de todos los datos en los dos grupos por dosis administrada del veneno, se puede establecer la diferencia significativa en el diámetro del área en (mm) en los grupos en estudio, para un nivel de significancia del $P < 0.05$.

Comparación entre los diámetros hemorrágicos producidos por los venenos de *P. lansbergii* juveniles y adultos.



Anexo 5. Análisis estadístico de la actividad mitotóxica mediante el programa SPSS.

Comparaciones múltiples entre todos los grupos empleados durante el estudio de la actividad mitotóxica.

Grupos	Controles	Diferencia de medias (grupos y controles)	Error estándar	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
					Límite inferior	Límite superior
Control A	25 µg A	-639.78461*	289.91990	.032	-1220.7971	-58.7721
	50 µg A	-796.62741*	283.60892	.007	-1364.9924	-228.2624
	Control J	-115.14684	317.98907	.719	-752.4112	522.1175
	25 µg J	-1072.49430*	278.24044	<.001	-1630.1006	-514.8880
	50 µg J	-1260.41280*	278.24044	<.001	-1818.0191	-702.8065
25 µg A	Control A	639.78461*	289.91990	.032	58.7721	1220.7971
	50 µg A	-156.84280	275.69938	.572	-709.3567	395.6711
	Control J	524.63777	310.95527	.097	-98.5305	1147.8061
	25 µg J	-432.70969	270.17378	.115	-974.1500	108.7307
	50 µg J	-620.62819*	270.17378	.025	-1162.0685	-79.1878
50 µg A	Control A	796.62741*	283.60892	.007	228.2624	1364.9924
	25 µg A	156.84280	275.69938	.572	-395.6711	709.3567
	Control J	681.48057*	305.07974	.030	70.0871	1292.8740
	25 µg J	-275.86689	263.39009	.300	-803.7124	251.9786
	50 µg J	-463.78539	263.39009	.084	-991.6309	64.0601
Control J	Control A	115.14684	317.98907	.719	-522.1175	752.4112
	25 µg A	-524.63777	310.95527	.097	-1147.8061	98.5305

	50 µg A	-681.48057*	305.07974	.030	-1292.8740	-70.0871
	25 µg J	-957.34746*	300.09561	.002	-1558.7525	-355.9424
	50 µg J	-1145.26596*	300.09561	<.001	-1746.6710	-543.8609
25 µg J	Control A	1072.49430*	278.24044	<.001	514.8880	1630.1006
	25 µg A	432.70969	270.17378	.115	-108.7307	974.1500
	50 µg A	275.86689	263.39009	.300	-251.9786	803.7124
	Control J	957.34746*	300.09561	.002	355.9424	1558.7525
	50 µg J	-187.91850	257.60059	.469	-704.1616	328.3246
50 µg J	Control A	1260.41280*	278.24044	<.001	702.8065	1818.0191
	25 µg A	620.62819*	270.17378	.025	79.1878	1162.0685
	50 µg A	463.78539	263.39009	.084	-64.0601	991.6309
	Control J	1145.26596*	300.09561	<.001	543.8609	1746.6710
	25 µg J	187.91850	257.60059	.469	-328.3246	704.1616

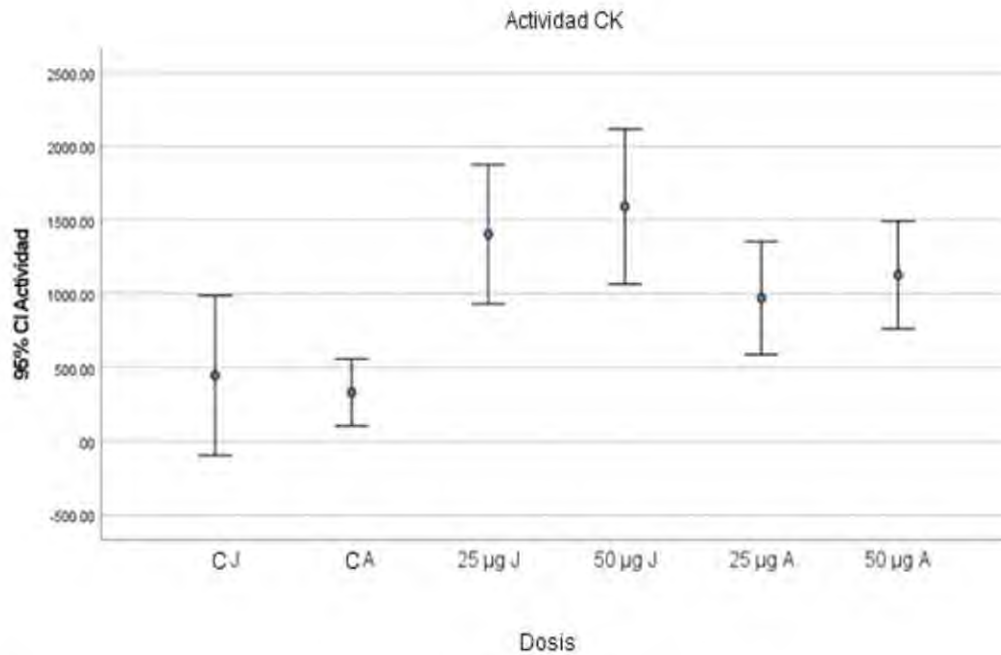
La diferencia de medias es significativa en el nivel 0.05.

Análisis ANOVA

Comparación de todas las medias de los datos de los grupos

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	12351016.078	5	2470203.216	6.204	<.001
Dentro de grupos	21898161.278	55	398148.387		
Total	34249177.356	60			

Actividad CK plasmática en la sangre de los ratones inoculados con los venenos de *P. lansbergii* juveniles y adultos.



Nota. C.J: grupo control (PBS) en la actividad con veneno juvenil; CA: grupo control (PBS) en la actividad con veneno adulto; dosis de 25 µg y 50 µg con veneno de juveniles; dosis de 25 µg y 50 µg con veneno de adultos.