

ALTERACIONES EN MARCADORES SÉRICOS DE LESIÓN TISULAR EN RATONES TRATADOS CON EL VENENO DE LA SERPIENTE *Bothrops colombiensis* (PARACOTOS, ESTADO MIRANDA, VENEZUELA)

Serum Markers Alterations due to Tissue Injury in Mice Treated With *Bothrops colombiensis* Snake Venom (Paracotos, Miranda State, Venezuela)

Carmen Teresa Duque-Zerpa^{1,2*}, Héctor Scannone-Tempone^{2†} y Alba Vargas²

¹Servicio de Análisis Toxicológico (SATOX), Facultad de Farmacia, Universidad Central de Venezuela.

²Unidad de Biotecnología, Facultad de Farmacia, Universidad Central de Venezuela.

*Teléfonos: 58 0412-7012397. Correo: ctduque@gmail.com

RESUMEN

Bothrops colombiensis es una de las serpientes venenosas de elevada importancia médica en Venezuela, esta se considera responsable de un cuadro clínico que implica el desarrollo de edema, necrosis, coagulopatías y hemorragias. La gravedad de este accidente promovió la caracterización bioquímica y biológica de su veneno, sin embargo su potencial tóxico sobre órganos blanco esenciales no ha sido estudiado. Este trabajo evaluó las alteraciones séricas en marcadores de lesión, como creatina fosfoquinasa (CK), aspartato aminotransferasa (AST), alanina aminotransferasa (ALT), urea y creatinina, después de 1; 3; 6; 15; 24; 48; 72; 96; 120; 144 y 168 horas (h) del tratamiento de ratones, con 40 µg del veneno de *B. colombiensis* (Paracotos, Edo. Miranda), vía intramuscular. Los controles incluyeron un grupo de ratones tratados con solución de NaCl 0,85% y otro sin tratamiento. Los resultados obtenidos evidenciaron el incremento en la actividad de la CK, entre las 3 y 15 h post-tratamiento, con un valor máximo de $4001 \pm 196,58$ U/L a las 6 h, adicionalmente a las 144 h se observó un segundo pico ($2831,40 \pm 102,67$ U/L), el cual no retornó a los valores basales a las 168 h. La actividad de la AST incrementó entre las 1-15 h y a las 144 h, mientras que la ALT presentó un aumento significativo ($P < 0,05$) en su actividad de 1 a 24 h. Los niveles de urea incrementaron significativamente ($P < 0,05$) de 1 a 144 h y la creatinina fue prácticamente inalterada. Los resultados obtenidos sugieren el rápido desarrollo de lesiones en tejido muscular y hepático, así como la posible instauración de una uremia de causas pre-renales. Esto implica la necesidad de garantizar la aplicación oportuna de una terapia antifélica efectiva a las víctimas y mantener el estricto seguimiento del cuadro clínico que se presente.

Palabras clave: *Bothrops colombiensis*; CK; ALT; AST; urea.

ABSTRACT

Bothrops colombiensis is one of the poisonous snakes of great medical importance in Venezuela, which is considered responsible for a clinical picture that involves the development of edema, necrosis, coagulopathies and hemorrhages. The severity of this accident promoted the biochemical and biological characterization of its venom; however its toxic potential on essential target organs has not been studied. This work evaluated serum alterations in injury markers, such as creatine phosphokinase (CK), aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT), urea and creatinine, after 1, 3, 6, 15, 24, 48, 72, 96, 120, 144 and 168 hour (h) of the treatment of mice, with 40 µg of venom from *B. colombiensis* (Paracotos, Miranda State), intramuscular route. The controls included a group of mice treated with 0.85% NaCl solution and another group without treatment. The results obtained showed an increase in CK activity, between 3 and 15 h after treatment, with a maximum value of 4001 ± 196.58 U/L at 6 h, in addition to the 144 h a second was observed peak (2831.40 ± 102.67 U/L), which did not return to baseline at 168 h. AST activity increased between 1-15 h and 144 h, while ALT showed a significant increase ($P < 0.05$) in its activity from 1 to 24 h. The urea levels significantly increased between the 1st and 144th h and the creatinine level practically did not have alteration. The results obtained suggest the rapid development of lesions in muscle and liver tissue, as well as the possible establishment of a uremia of pre-renal causes. This implies the need to guarantee the timely application of an effective antifélic therapy to the victims and to maintain the strict follow-up of the clinical presentation.

Key words: *Bothrops colombiensis*; CK; ALT; AST; urea.

INTRODUCCIÓN

Bothrops colombiensis, conocida popularmente en Venezuela como macagua, guayacán o mapanare, es una de las serpientes venenosas más ampliamente distribuida en el país, abarca todo el oriente, centro y occidente, al norte del río Orinoco, desde el nivel del mar hasta unos 2500 metros de altura [25, 37]. Esta especie se considera responsable de un cuadro clínico caracterizado por el desarrollo de hemorragias locales y sistémicas, edema, necrosis y coagulopatías [16, 29], consecuencias del efecto aditivo y/o sinérgico de una gran variedad de enzimas presentes en sus venenos, como fosfolipasas A₂, metaloproteasas, serino proteasas, hialuronidasa y L-amino ácido oxidasas, entre otras, las cuales representan hasta un 90-95 % del peso seco del veneno [6, 40, 41].

A esta compleja constitución enzimática se suma una importante variabilidad bioquímica intra especie, en la composición de estos venenos, característica que se ha relacionado entre otros factores a diferencias en la procedencia geográfica de los ejemplares [10, 16]. Esta condición, puede ser responsable de variaciones cualitativas y/o cuantitativas en las manifestaciones clínicas que puedan desarrollarse en las víctimas e incluso afectar el potencial neutralizante de los antivenenos empleados [6, 10, 40, 41], lo cual hace necesario no solo caracterizar los venenos de importancia médica sino profundizar los conocimientos sobre los factores implicados en la morbilidad y mortalidad, en los accidentes ocasionadas por estas especies, lo cual podría repercutir en el mejoramiento de los cuidados clínicos de las víctimas del accidente ofídico.

Tomando en cuenta estas consideraciones, los venenos de especímenes de *B. colombiensis* procedentes de diversas regiones geográficas como los estados Aragua y Miranda (Barlovento, Paracotos, El Guapo y Caucagua), han sido objeto de diversas evaluaciones con énfasis en su caracterización bioquímica y biológica [1, 6, 10, 16, 38, 40] e incluso se han purificado proteínas con potencial terapéutico a partir del veneno de dicha especie [15, 16, 39], sin embargo las alteraciones sistémicas inducidas por dosis sub letales del veneno de *B. colombiensis* no han sido evaluadas experimentalmente.

La medida de estas alteraciones *in vivo* puede realizarse mediante la cuantificación de marcadores característicos, en algunos casos enzimas, cuyas actividades sólo se detectan incrementadas en sangre cuando se lesionan las células que las contienen, sugiriendo daño celular [9, 33]. Entre estas se encuentran la creatina fosfoquinasa (CK) enzima citoplasmática, que cataliza la producción de trifosfato de adenosina (ATP) [33], y que se encuentra distribuida principalmente en el tejido muscular (esquelético y cardíaco) y en menor proporción en otros órganos como cerebro, sistema gastrointestinal y aparato genitourinario, por lo que los incrementos en su actividad se consideran un indicador específico de daño tisular del músculo [9, 33]. En el caso del tejido hepático se emplean las enzimas

alanina aminotransferasa (ALT) y aspartato aminotransferasa (AST), miembros de la familia de las transaminasas [28]. La ALT es considerada un marcador de elevada sensibilidad y especificidad, por su predominante localización en el citoplasma hepático, mientras que la AST al localizarse principalmente en mitocondrias hepáticas, músculo esquelético, miocardio y riñón, se considera un marcador de daño hepatocelular de menor especificidad [28, 36, 43]. Otros marcadores de lesión son los productos de desecho metabólico urea y creatinina, los cuales se emplean comúnmente en la evaluación de lesiones a nivel renal, orientando acerca del sitio y la magnitud de la alteración [5].

Con esto en consideración, este estudio evaluó los cambios séricos inducidos en los marcadores de lesión CK, AST, ALT, urea y creatinina en ratones tratados con una dosis sub-letal del veneno de *B. colombiensis* de Paracotos, Edo. Miranda, de manera de obtener datos experimentales que contribuyan a entender la patología sistémica asociada al envenenamiento por esta especie.

MATERIALES Y MÉTODOS

Veneno

Se utilizó una mezcla de veneno cristalizado, obtenido a partir del ordeño manual de cinco individuos adultos (4 hembras y 1 macho) de *B. colombiensis* colectados en la localidad de Paracotos, municipio Guaicaipuro, estado Miranda (Venezuela) y mantenidos en cautiverio en el serpentario de la Unidad de Biotecnología, Facultad de Farmacia, Universidad Central de Venezuela. Dicho veneno fue conservado hasta su evaluación en un vial depositado en un desecador (Duran®, Mod. Tam, Alemania), mantenido a 4°C, (Refrigeración Caiz®, Winter, Venezuela) al vacío y con CaCl₂ como agente desecante.

Animales de experimentación

Se emplearon ratones albinos (*Mus musculus*), cepa NIH, sin distinción de sexo, con peso entre 18-20 gramos (g) procedentes del bioterio del Instituto Nacional de Higiene "Rafael Rangel". Ciudad Universitaria, Caracas, Venezuela.

Procedimiento experimental

Once grupos constituidos por 12 ratones, asignados al azar, fueron inyectados en el músculo gastronemio de la extremidad izquierda con 40 µg del veneno de *B. colombiensis* en 0,1 mL de solución de NaCl al 0,85 %. Los controles incluyeron dos grupos de ratones adicionales, el primero fue tratado con 0,1 mL de NaCl al 0,85 % (control de vehículo), mientras que el segundo grupo no recibió tratamiento (control sano). A intervalos post inyección de 1; 3; 6; 15; 24; 48; 72; 96; 120; 144 y 168 horas (h) y bajo anestesia con éter se extrajeron 200 µL de sangre a través de un corte en la arteria braquial. Las muestras de sangre se centrifugaron

a 1240 g durante 10 minutos (min) (Centrífuga Sorval®, GLC-1, China), se separó el suero de cada una de las muestras y se colectaron empleando un tubo eppendorf por cada tres ratones. Posteriormente, empleando kits de diagnóstico *in vitro* (Stanbio Laboratory®) se cuantificaron los niveles de CK (Procedimiento N° 2910), AST (Procedimiento N° 2920), ALT (Procedimiento N° 2930), urea (Procedimiento N° 2020) y creatinina (Procedimiento N° 0420). Los resultados se expresaron como actividad enzimática (U/L) para las determinaciones de CK, AST y ALT y en términos de concentración (mg/dL) para urea y creatinina, describiendo en todos los casos su comportamiento en función del tiempo.

Análisis estadístico

La comparación de promedios se realizó por análisis de varianza de una vía (ANOVA), utilizando el programa estadístico STATISTIX® versión 1,0 (1996), considerando valores con diferencia estadísticamente significativa con un intervalo de confianza de 95% ($P < 0,05$).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

B. colombiensis es una de las serpientes venenosas más ampliamente distribuida en Venezuela, se localiza en importantes zonas pobladas y es una especie sumamente agresiva [27], por lo que se considera una de las especies principalmente asociada al accidente ofídico [14, 15, 41]. Estudios previos soportan, que su veneno está constituido esencialmente por enzimas fosfolipasas A_2 (44,3%) y metaloproteasas, principalmente del tipo PI (30,8%) [6, 41], grupos responsables del desarrollo de flictenas, dermonecrosis, edema y mionecrosis [14, 15, 18, 22, 29], efectos relacionados a la instauración de secuelas permanentes en las víctimas, como disfunción funcional o la pérdida de la región corporal afectada [18, 29]. Dada la severidad asociada al envenenamiento por ésta especie, este estudio evaluó las alteraciones en marcadores bioquímicos de lesión, inducidas por una dosis sub letal del veneno de *B. colombiensis* (Paracotos. Edo. Miranda).

La inyección intramuscular de 40 μ g del veneno de *B. colombiensis* en ratones cepa NIH indujo el incremento significativo ($P < 0,05$) de los marcadores CK, AST, ALT y urea, mientras que los niveles de creatinina fueron prácticamente inalterados (FIGS. 1-5).

La actividad sérica de la enzima CK se incrementó significativamente entre las 3 y 15 h post-tratamiento, con un valor máximo de $4001 \pm 196,58$ U/L a las 6 h, alcanzando niveles similares a los controles del experimento a las 24 h post exposición al veneno. Adicionalmente, a las 144 h se observó un segundo pico de actividad ($2831,40 \pm 102,67$ U/L) el cual aún a las 168 h no retornó a los valores basales (FIG. 1). Estos resultados, sugieren el rápido efecto miotóxico inducido por el veneno de *B. colombiensis* (Paracotos. Edo. Miranda) y coinciden con reportes

previos para otros venenos de este género como *B. asper*, *B. atrox*, *B. alternatus*, *B. jararaca* y *B. neuwiedii*, con los cuales se ha reportado el incremento significativo de este marcador entre las 0,5-3 h de exposición al veneno [7, 8, 11-13, 17, 24, 42].

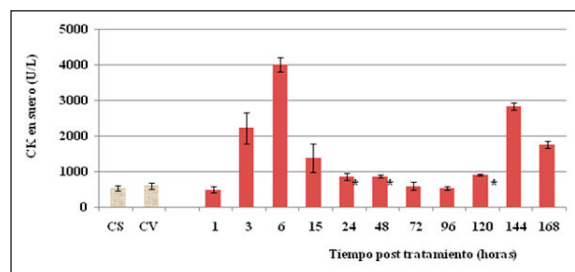


FIGURA 1. EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LA ENZIMA CK EN SUERO DE RATONES TRATADOS CON EL VENENO DE *Bothrops colombiensis* (Paracotos - Edo. Miranda).

*Valores sin diferencia estadísticamente significativa con respecto a los controles ($P < 0,05$). **CS:** Control sano (ratones sin tratamiento). **CV:** Control de vehículo (ratones tratados con 0,1 mL de solución NaCl 0,85 %). Las barras representan la media \pm la desviación estándar ($n = 4$).

Este rápido efecto miotóxico inducido por los venenos del género *Bothrops* ha sido ampliamente estudiado, y se considera consecuencia principalmente de la acción de enzimas tipo fosfolipasas A_2 presentes en estos venenos [4, 23, 32], grupo enzimático que al afectar la integridad de la membrana plasmática de las células, compromete la regulación de la permeabilidad de iones como el calcio, lo cual induce la activación de proteasas calcio dependientes y daño mitocondrial, eventos que culminan en necrosis [4, 29, 42].

En cuanto al incremento en la actividad de la CK registrado a las 144 h (FIG. 1), de acuerdo a estudios previos sobre la degeneración y regeneración del músculo esquelético afectado con venenos de serpiente [2, 13, 20], dicho incremento se presentó en el lapso post tratamiento donde deberían tener lugar los procesos celulares que conducirían a la regeneración del tejido muscular afectado. Esto permite sugerir que el incremento observado, en este estudio, en la actividad de la CK a partir de las 144 h podría ser el resultado de eventos degenerativos (apoptosis/necrosis) experimentados por las células musculares en regeneración [2, 13, 35].

La escasa e incompleta regeneración del músculo esquelético, tras los eventos degenerativos inducidos por venenos del género *Bothrops*, ha sido relacionada esencialmente con la presencia de metaloproteasas de débil actividad hemorrágica (clase PI) en estos venenos [2, 13, 21, 23], las cuales al afectar la microvasculatura comprometen el flujo sanguíneo del tejido, la lámina basal y la inervación nerviosa muscular [2, 13, 18, 20, 23]. Estos antecedentes, sumados a estudios previos los cuales soportan que el veneno de *B. colombiensis* está constituido esencialmente por enzimas fosfolipasas A_2 (44,3%) y metaloproteasas, principalmente del tipo PI (30,8%) [6, 41],

podrían explicar el incremento en la actividad de la CK registrado en este estudio a partir de 144 h y sugieren la necesidad de estudiar el efecto del veneno de *B. colombiensis* (Paracotos) sobre los procesos de regeneración del tejido muscular afectado, ya que las alteraciones fisiopatológicas que afecten dicho proceso se han relacionado al desarrollo de fibrosis y pérdida permanente de tejido afectado tras el envenenamiento [15, 21-23].

En el caso de las enzimas AST y ALT, los resultados obtenidos se presentan en las FIGS. 2 y 3, respectivamente, las cuales evidencian el incremento significativo ($P < 0,05$) en la actividad de la AST entre las 1-15 h y a las 144 h, mientras que la actividad de la ALT solo incrementó en el lapso de 1 a 24 h. Al comparar estos resultados entre sí se evidenció un comportamiento similar para estos marcadores, caracterizado por: un incremento en la actividad de ambas enzimas a la 1era h post tratamiento, un máximo de actividad a las 6 h y una marcada reducción de los mismos a partir de las 24 h de exposición al veneno, lo cual sugiere que ambos marcadores podrían tener una procedencia tisular en común, el tejido hepático. Por otra parte, desde el punto de vista cuantitativo, los incrementos detectados en la actividad de la enzima AST son mayores a los de la ALT (AST>ALT), esto podría implicar el desarrollo de lesiones que comprometen organelos citoplasmáticos como las mitocondrias hepáticas, donde la AST se concentra alcanzando hasta un 80% [35, 44], y sugiere la necesidad de realizar estudios ultraestructurales para esclarecer la posible extensión de la hepatotoxicidad inducida por el veneno evaluado. Aunque no se debe obviar que la AST también se encuentra ampliamente localizada en tejido muscular [5, 44], pudiendo este tejido también contribuir a los incrementos de AST evidenciados. Adicionalmente, dicho tejido también pudiera estar relacionado con el incremento en la actividad de este marcador evidenciado a partir de las 144 h (FIG. 2), observación respaldada por el registro del incremento sérico en la actividad de la CK y niveles de ALT similares a los controles, al mismo lapso post tratamiento (FIGS. 1 y 3).

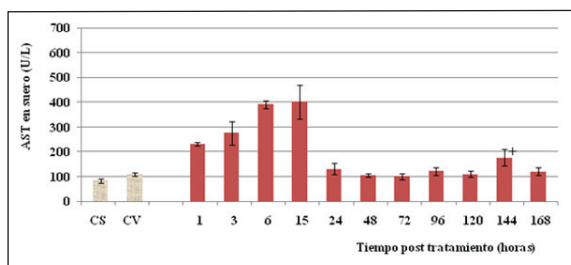


FIGURA 2. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LA ENZIMA AST EN SUERO DE RATONES TRATADOS CON VENENO DE *Bothrops colombiensis*. (Paracotos - Edo. Miranda).

*Valores con diferencia estadísticamente significativa con respecto a los controles ($P < 0,05$) **CS:** Control sano (ratones sin tratamiento). **CV:** Control de vehículo (ratones tratados con 0,1 mL de solución NaCl 0,85 %). Las barras representan la media \pm desviación estándar (n= 4).

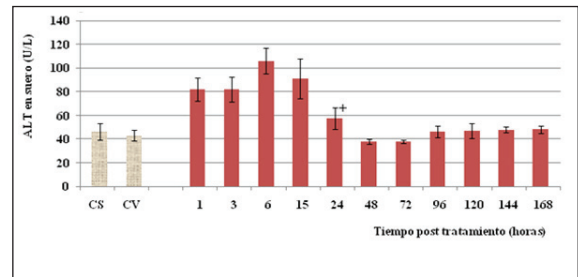


FIGURA 3. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LA ENZIMA ALT EN SUERO DE RATONES TRATADOS CON VENENO DE *Bothrops colombiensis* (Paracotos - Edo. Miranda).

*Valores con diferencia estadísticamente significativa con respecto a los controles ($P < 0,05$). **CS:** Control sano (ratones sin tratamiento). **CV:** control de vehículo (ratones tratados con 0,1 mL de solución NaCl 0,85 %). Las barras representan la media \pm desviación estándar (n= 4).

El incremento simultáneo en las actividades de los marcadores AST y ALT observado durante las primeras horas de exposición al veneno de *B. colombiensis*, también ha sido reportado en estudios previos con venenos de *B. atrox* y *B. alternatus* [8, 17], resultados que fueron relacionados por los autores con una posible lesión en los hepatocitos, aunque también se pueden referir diferencias con otros venenos como *B. jararacussu* y *B. asper*, los cuales no indujeron el incremento significativo en la actividad de la enzima ALT en ratones tratados con dosis de 50 y 100 μ g de veneno, respectivamente [7, 44].

Simultáneamente, en el caso de las evaluaciones de urea y creatinina, se observó que los niveles de urea incrementaron significativamente ($P < 0,05$) en el lapso de 1-144 h, con un máximo de aproximadamente 59% durante las primeras 6 h de exposición al veneno (FIG. 4), mientras que la creatinina fue prácticamente inalterada, solo se observó un incremento significativo de un 14 y 15% a las 72 y 144 h, respectivamente (FIG. 5).

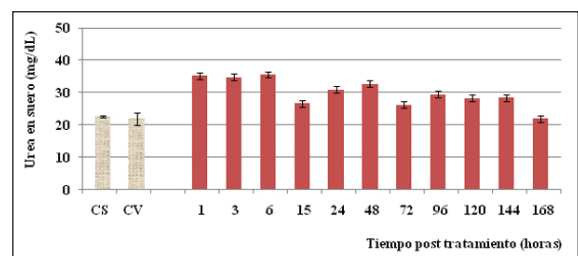


FIGURA 4. DETERMINACIÓN DE UREA EN SUERO DE RATONES TRATADOS CON VENENO DE *Bothrops colombiensis* (Paracotos - Edo. Miranda).

CS: Control sano (ratones sin tratamiento). **CV:** control de vehículo (ratones tratados con 0,1 mL de solución NaCl 0,85 %). Las barras representan la media \pm desviación estándar (n= 4).

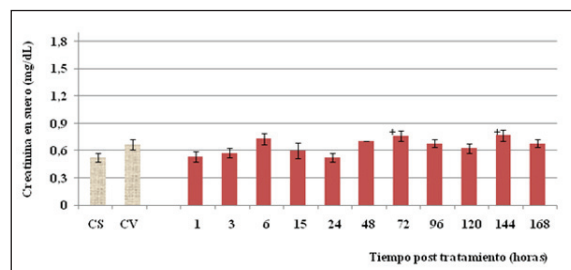


FIGURA 5. DETERMINACIÓN DE CREATININA EN SUERO DE RATONES TRATADOS CON VENENO DE *Bothrops colombiensis* (Paracotos - Edo. Miranda).

*Valores con diferencia estadísticamente significativa con respecto a los controles ($P < 0,05$). **CS:** Control sano (ratones sin tratamiento). **CV:** Control de vehículo (ratones tratados con 0,1 mL de solución NaCl 0,85 %). Las barras representan la media \pm desviación estándar ($n = 4$).

Los incrementos séricos en los niveles de urea, en ausencia de alteraciones en los niveles de creatinina, han sido reportado en estudios previos con otros venenos de este género como *B. atrox*, *B. pauloensis*, *B. jararacussu* o *B. jararacá* y permiten sugerir la usencia de lesiones renales directas bajo las condiciones ensayadas [8, 35, 44]. Adicionalmente, también se debe referir que estos resultados han sido relacionados por algunos autores a la degradación de proteínas tisulares, como una consecuencia de las actividades proteolítica y miotóxica de estos venenos, lo cual se ha señalado por ejemplo para el veneno de *B. jararacussu* [44]. Sin embargo con dicho veneno, a diferencia de la prolongada uremia observada en este estudio (1-144 h), los autores refieren el incremento de los niveles séricos de urea en ratones, tratados con 50 μg de veneno, solo durante las primeras 4 h de exposición al tratamiento, aunque el incremento sérico de proteínas totales se manifestó en el lapso de 4 a 24 h.

Por otra parte, otros grupos de investigación, con venenos de *B. jararacá*, *B. pauloensis* y *B. atrox*, sugieren que estos resultados (urea elevada, creatinina inalterada) podrían ser la consecuencia de una insuficiencia renal de causas pre-renales o uremia pre-renal [8, 31, 34]. Dicho efecto es una respuesta fisiológica a la hipoperfusión renal, la cual se desarrolla a consecuencia de eventos como hipovolemia, hipotensión, anomalía cardíaca, lesiones estructurales en las arterias renales, entre otras [3, 5, 8, 31, 34] y aunque este efecto no es una señal de alarma, ya que revierte rápidamente tras la restauración del flujo sanguíneo renal, podría convertirse en un factor de riesgo para el desarrollo de falla renal intrínseca, usualmente necrosis tubular aguda, si la hipoperfusión renal es prolongada [30, 31].

Estas consideraciones, aunadas a reportes previos de la presencia en el veneno de *B. colombiensis* de constituyentes tipo fosfolipasas A_2 , serino proteasas (tipo calicreina) y péptidos potenciadores de bradiquinina [6, 41], los cuales podrían mediar hipotensión [19, 26, 27] y el reporte de alteraciones en la funcionalidad del músculo cardíaco, en embriones de pollo

(*Gallus gallus domesticus*) tratados con una concentración sub-lethal del veneno de *B. colombiensis* [1], permiten considerar que la prolongada uremia evidenciada bajo las condiciones de este estudio, pudiera ser la consecuencia de una insuficiencia renal de causas pre-renales renales o uremia pre-renal [3] e implica la necesidad de ampliar estudios al respecto.

La evaluación en conjunto de los resultados obtenidos, permiten sugerir el rápido efecto miotóxico, hepatotóxico y nefrotóxico indirecto del veneno evaluado. Esto implica la necesidad de suministrar a las víctimas, de accidentes por esta especie, el tratamiento específico lo más pronto posible tras el envenenamiento y mantener un estricto monitoreo de los parámetros bioquímicos CK, AST, ALT, urea y creatinina, para prevenir el desarrollo de posibles complicaciones. De igual forma, se recomienda el desarrollo de estudios histopatológicos para dilucidar las alteraciones inducidas por este veneno sobre las estructuras renales, hepáticas y musculares y evaluar el potencial neutralizante de los antivenenos empleados clínicamente en Venezuela.

CONCLUSIONES

El veneno de la serpiente *Bothrops colombiensis*, de Paracotos-Edo. Miranda, indujo el incremento significativo de la actividad de las enzimas CK, AST y ALT, lo cual sugiere el desarrollo de lesiones en tejido muscular y hepático. Adicionalmente, el veneno indujo un prolongado incremento en los niveles séricos de urea, con niveles de creatinina en rango basal, sugiriendo una posible uremia pre-renal.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] ÁLVAREZ, M.; GIRÓN, M. E.; ERCOLINO, J.; SUÁREZ, E.; PERDOMO, L.; RODRÍGUEZ-ACOSTA, A. Cardiotoxicidad inducida por veneno crudo de mapanare (*Bothrops colombiensis*) en modelo experimental de embrión de pollo "In vivo" e "In vitro". **RETEL**. 27:20-32. 2010.
- [2] ARCE, V.; BRENEST, F.; GUTIÉRREZ, J. M. Degenerative and regenerative changes in murine skeletal muscle after injection of venom from the snake *Bothrops asper*: a histochemical and immunocytochemical study. **Int. J. Exp. Path.** 72: 211-226. 1991.
- [3] ARONSON, P.; THEIR, S. El riñón. En: Smith L.; Their, S. (Eds.) **Fisiopatología. Principios biológicos de la enfermedad**. 2da. Ed. Editorial Médica Panamericana. Argentina. Pp 663-682. 1988.
- [4] BALDO, C.; FERREIRA, M.; LOPES, D.; IZIDORO, L.; GOMES, A.; FERRO, E.; HAMAGUCHI, A.; HOMSI, M.; RODRIGUES, V. Action of neuwiedase, a metalloproteinase isolated from *Bothrops neuwiedi* venom, on skeletal

- muscle: an ultrastructural and immunocytochemistry study. **J. Venom. Anim. Toxins Incl. Trop. Dis.** 16 (3): 462-469. 2010.
- [5] BOUDA, J.; DOUBEK, J.; QUIROZ, G. Patología clínica del aparato urinario. En: Núñez, L.; Bouda, J. (Eds.) **Patología Clínica Veterinaria**. 2da. Ed. Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Ciudad Universitaria. Pp 99-119. 2007.
- [6] CALVETE, J.; BORGES, A.; SEGURA, A.; FLORES, M.; ALAPE, A.; GUTIÉRREZ, J. M.; DIEZ, N.; DE SOUSA, L.; KIRIAKOS, D.; SÁNCHEZ, E.; FAKS, J.; ESCOLANO, J.; SANZ, L. Snake venomomics and antivenomic of *Bothrops colombiensis*, a medically important pitviper of *Bothrops atrox-asper* complex endemic to Venezuela: contributing to its taxonomy and snakebite management. **J. Proteomics**. 72: 227-240. 2009.
- [7] CHAVES, F.; GUTIÉRREZ, J. M.; LOMONTE, B.; CERDAS, L. Histopathological and biochemical alterations induced by intramuscular injection of *Bothrops asper* (terciopelo) venom in mice. **Toxicon**. 27 (10):108-1093. 1989.
- [8] DE SOUZA, C; KAYANO, A.; SETÚBALA, S.; PONTES, A.; FURTADO, J.; KWASNIEWSKI, F.; ZAQUEO, K.; SOARES, A; STÁBELI, R.; ZULIANI, J. Local and systemic biochemical alterations induced by *Bothrops atrox* snake venom in mice. **J. Venom Res.** 3: 28-34. 2012.
- [9] D'OTTAVIO, G.; PARODI, R.; MONTERO, J.; EGRI, N.; CARLSON, D.; GRECA, A. Creatinfosfoquinasa y su aplicación clínica. **Anuario Fundación Dr. J. R. Villavicencio**. 16: 156-159. 2008.
- [10] DUQUE, C.; VARGAS, A. Caracterización toxinológica del veneno de la serpiente *Bothrops colombiensis* de Paracotos, Estado Miranda, Venezuela. **Rev. Cientif. FCV-LUZ**. XXV (3): 239-247. 2015.
- [11] GARCIA, M.; MARUÑAK, S.; TODARO, J.; PONCE-SOTO, L; ACOSTA, O.; LEIVA, L. Neutralization of the pharmacological activities of *Bothrops alternatus* venom by anti-PLA₂ IgGs. **Toxicon**. 86: 89-95. 2014.
- [12] GARCIA, M.; REY, L.; LEIVA, L.; ACOSTA, O. Histochemical analyses of muscle injury induced by venom from Argentine *Bothrops alternatus* (víbora de la cruz). **Rev. Vet.** 17 (2): 67-21. 2006.
- [13] GARCIA, M. E.; TEIBLER, G.; MARUÑAK, S.; HERNÁNDEZ, D.; ACOSTA, O.; LEIVA L. Efficient muscle regeneration after highly haemorrhagic *Bothrops alternatus* venom injection. **Toxicon**. 122: 167-175. 2016.
- [14] GIRÓN, M. E.; GUERRERO, B.; SALAZAR, A. M.; SÁNCHEZ, E.; ÁLVAREZ, M.; RODRÍGUEZ-ACOSTA, A. Functional characterization of fibrinolytic metalloproteinases (colombienases) isolated from *Bothrops colombiensis* venom. **Toxicon**. 74: 116-126. 2013.
- [15] GIRÓN, M. E.; RODRÍGUEZ-ACOSTA, A.; SALAZAR, A.; SÁNCHEZ, E.; GALÁN, J.; IBARRA, C.; GUERRERO; B. Isolation and characterization of two new non-hemorrhagic metalloproteinases with fibrinogenolytic activity from the mapanare (*Bothrops colombiensis*) venom. **Arch. Toxicol.** 87: 197-208. 2013.
- [16] GIRÓN, M. E.; SALAZAR, A.; AGUILAR, I.; PÉREZ, J.; SÁNCHEZ, E.; AROCHA-PIÑANGO, C.; RODRÍGUEZ-ACOSTA, A.; GUERRERO, B. Hemorrhagic, coagulant and fibrino(geno)lytic activities of crude venom and fractions from mapanare (*Bothrops colombiensis*) snakes. **Comp. Biochem. Physiol. Part C** 147: 113-121. 2008.
- [17] GONCALVES, D.; SILVA, E; GRACA, F.; LIRA, E.; ZANON, N.; MENDES, G.; BURDMANN, E.; MIGLIORINI, R.; KETTELHUT, I.; NAVEGANTES, L. *In vivo* effects of *Bothrops jararaca* venom on metabolic profile and on muscle protein metabolism in rats. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** 79 (5): 771-778. 2008.
- [18] GUTIÉRREZ, J. M.; ESCALANTE, T.; RUCAVADO, A.; HERRERA, C. Hemorrhage caused by snake venom metalloproteinases: A journey of discovery and understanding. **Toxins**. 8 (4): 93. 2016.
- [19] GUTIÉRREZ, J. M; LOMONTE, B. Phospholipases A₂: Unveiling the secrets of a functionally versatile group of snake venom toxins. **Toxicon**. 62: 27-39. 2013.
- [20] GUTIÉRREZ, J. M.; OWNBY, C.; ODELL, G. Skeletal muscle regeneration after myonecrosis induced by crude venom and myotoxin from the snake *Bothrops asper* (Ferde-Lance). **Toxicon**. 22 (5): 719-731. 1984.
- [21] GUTIÉRREZ, J. M.; RUCAVADO, A. Snake venom metalloproteinases: Their role in the pathogenesis of local tissue damage. **Biochimie** 82: 841-850. 2000.
- [22] GUTIÉRREZ, J. M.; RUCAVADO, A.; CHAVES, F; DÍAZ, C.; ESCALANTE, T. Experimental pathology of local tissue damage induced by *Bothrops asper* snake venom. **Toxicon**. 54 (7): 958-75. 2009.
- [23] HERNÁNDEZ, R.; CABALCETA, C.; SARAVIA-OTTEN, P.; CHAVES, A.; GUTIÉRREZ, J. M.; RUCAVADO, R. Poor Regenerative Outcome after Skeletal Muscle Necrosis Induced by *Bothrops asper* Venom: Alterations in Microvasculature and Nerves. **PLOS ONE**. 6 (5): e19834. 2011.

- [24] KOSCINCZUC, P.; ORTEGA, H.; DAILLARD, B.; MUSSART, N. Valoración bioquímica, histopatológica e inmunohistoquímica del daño renal causado por veneno de *Bothrops neuwiedii* en ratas. **Rev. Vet.** 18 (1): 14-19. 2007.
- [25] LANCINI, A. Familia Viperidae. En: **Serpientes de Venezuela**. 2da. Ed. Tecniciencia. Venezuela. Pp 194-214. 1986.
- [26] LEÓN, G.; SÁNCHEZ, L.; HERNÁNDEZ, A.; VILLALTA, M.; HERRERA, M.; SEGURA, A.; ESTRADA, R.; GUTIÉRREZ, J. M. Immune response towards snake venoms. **Inflam. Allergy Drug Targets**. 10 (5): 1-18. 2011.
- [27] LIBERATO, I.; COSTA, A.; FALCAO, N.; HAVT, A.; AZUL, J.; BATISTA, T.; HIJARI, M.; BRITO, E.; DE OLIVEIRA, D.; FONTELES, M.; AZUL, H. Renal and cardiovascular effects of *Bothrops marajoensis* venom and phospholipase A₂. **Toxicon**. 55 (6): 1061-1070. 2010.
- [28] LIMDI, J.; HYDE, G. Evaluation of abnormal liver function test. **Postgrad. Med. J.** 79: 307-312. 2003.
- [29] LOMONTE, B.; GUTIÉRREZ, J. M. Phospholipases A₂ From *Viperidae* Snake Venoms: How do They Induce Skeletal Muscle Damage? **Acta Chim. Slov.** 58: 647-659. 2011.
- [30] MARTÍNEZ, T.; DELGADO, V.; D'ACHIARDI, R. Insuficiencia renal aguda. **Univ. Med.** 45 (2): 57-64. 2004.
- [31] MIYAHIRA, J. Insuficiencia renal aguda. **Rev. Med. Hered.** 14 (1): 36-43. 2003.
- [32] MORA, D.; DÍAZ, C.; ANGULO, Y.; GUTIÉRREZ, J. M.; LOMONTE, B. Role of enzymatic activity in muscle damage and cytotoxicity induced by *Bothrops asper* Asp49 phospholipase A₂ myotoxins: are there additional effectors mechanisms involved? **Peer J.** 2: e569. 2014.
- [33] NORIEGA, J.; COLMENAREZ, D.; MOGOLLÓN, A.; MÁRQUEZ, N.; HERNÁNDEZ, V.; PÉREZ, M. Cambios séricos en las enzimas ALT, AST, FA, CK-total y LDH inducidos por venenos de *Crotalus durissus cumanensis* en ratones Balb/c. **Rev. Cientif. FVC-LUZ**. XIX (4): 408-413. 2009.
- [34] OLIVEIRA, L.; SAKATE, M.; MADRUGA, R.; BARBOSA, N. Biochemical and hematological study of goat envenomed with natural and 60Co-irradiated bothropic venom. **J. Venom. Anim. Toxins Incl. Trop. Dis.** 13 (33): 576-597. 2007.
- [35] PINO, O.; LI, O.; ALVARADO, A.; FERNÁNDEZ, V.; DÁVILA, R.; GAVIDIA, C. Determinación de los niveles séricos de enzimas cardíacas en perros adultos con enfermedad cardiovascular. **Rev. Inv. Vet. Perú.** 19 (2):144-147. 2008.
- [36] QUEIROZ, G.; BOUDA, J. Patología clínica del hígado. En: Núñez, L.; Bouda, J. (Eds.) **Patología Clínica Veterinaria**. 2da. Ed. Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Ciudad Universitaria. Pp 120-135. 2007.
- [37] RODRÍGUEZ-ACOSTA, A.; MONTERREY, F.; CESPEDES, G.; FINOL, H. Alteraciones estructurales y ultraestructurales del encéfalo ocasionados por veneno de la serpiente mapanare (*Bothrops colombiensis*). **Rev. Toxicol.** 20:199-203. 2003.
- [38] SÁNCHEZ, E.; GIRÓN, M. E.; GUERRERO, B.; UZCATEGUI, NL.; RODRÍGUEZ-ACOSTA, A. Caracterización bioquímica y biológica del veneno de la serpiente Neotropical Macagua (*Bothrops colombiensis*) de la región de Barlovento, estado Miranda, Venezuela **Rev. Cub. Med. Trop.** 67 (2): 213-230. 2015.
- [39] SÁNCHEZ, E.; RODRÍGUEZ-ACOSTA, A.; PALOMAR, R.; LUCENA, S. BASHIR, S.; SOTO, J.; PÉREZ, J. Colombistatin: a disintegrin isolated from the venom of the South American snake (*Bothrops colombiensis*) that effectively inhibits platelet aggregation and SK-Mel-28 cell adhesion. **Arch. Toxicol.** 83: 271-279. 2009.
- [40] SCANNONE, H.; GRILLO, O. Physical, chemical and biological characteristics of the venom of *Bothrops colombiensis*. **Toxicon**. 17 (Suppl. 1): 161. 1979.
- [41] SUNTRAVAT, M.; UZCATEGUI, N.; ATPHAISIT, C.; HELMKE, T.; LUCENA, S.; SÁNCHEZ, E.; RODRÍGUEZ-ACOSTA, A. Gene expression profiling of the venom gland from the Venezuelan mapanare (*Bothrops colombiensis*) using expressed sequence tags (ESTs). **BMC Mol. Biol.** 17 (7): 2-18. 2016.
- [42] TEIBLER, P.; ACOSTA, O.; MARUÑAK, S.; RUIZ, R.; KOSCINCZUK, P.; SÁNCHEZ, M.; MUSSART, N. Lesiones locales y sistémicas inducidas por veneno de *Bothrops alternatus* (víbora de la cruz) de Argentina. **Acta Toxicol. Argent.** 7 (1): 7-10. 1999.
- [43] WARD, K.; COCKAYNE, S. Enzimología. En: Anderson, S.; Cockayne, S. (Eds.) **Química Clínica**. 1era. Ed. Editorial Interamericana McGraw-Hill. México. Pp 241-281. 1993.
- [44] ZENI, L.; BECKER, A.; KRUG, M.; ALBUQUERQUE, A. Histological and biochemical effects induced by sublethal doses of *Bothrops jararacussu* venom in mice **J. Venom. Anim. Toxins. Incl. Trop. Dis.** 13 (3): 664-676. 2007.