

**EVALUACIÓN DE LA DOXICICLINA UN DERIVADO DE
TETRACICLINA, EL CLORURO DE ZINC, Y EL CLODRONATO
COMO INHIBIDORES DE EFECTOS LOCALES CAUSADOS POR
EL VENENO DE LA SERPIENTE “TERCIOPELO” *Bothrops asper***

Universidad de Costa Rica
Facultad de Microbiología

**Trabajo Final de Graduación Trabajo Final de Graduación para optar
por el grado académico de Licda. en Microbiología y Química
Clínica, y el grado profesional de Dra. en Microbiología y Química
Clínica.**

Jonielle García Quesada

Carné: A01711

Tutora: Dra. Alexandra Rucavado Romero.

2009



**UNIVERSIDAD DE COSTA RICA
VICERRECTORÍA DE DOCENCIA**

**FACULTAD DE MICROBIOLOGÍA
CIUDAD UNIVERSITARIA RODRIGO FACIO**

Acta de presentación de Requisito Final de Graduación

Sesión del Tribunal Examinador celebrada el martes 07 de julio del año 2009 con el objeto de recibir el informe oral de la estudiante **SANDRA JONIELLE GARCÍA QUESADA**, carné A01711 quien se acoge al Reglamento de Trabajos Finales de Graduación bajo la modalidad de **PRACTICA DE GRADUACIÓN**, para optar por el grado académico de **LICENCIADA EN MICROBIOLOGÍA Y QUÍMICA CLÍNICA** y el título profesional de **DOCTORA EN MICROBIOLOGÍA Y QUÍMICA CLÍNICA**.

Están presentes los siguientes miembros del tribunal:

Dr. Javier Mora Rodríguez **PRESIDENTE**
Dr. Adrián Pinto Tomas
Dra. Alexandra Rucavado Romero
Dr. José María Gutiérrez Gutiérrez
Dra. Teresa Escalante Muñoz

ARTICULO 1

El presidente informa que el expediente de **SANDRA JONIELLE GARCÍA QUESADA**, contiene todos los documentos de rigor, incluyendo el recibo de pago de los derechos de graduación. Declara que la postulante cumplió con todos los demás requisitos del plan de estudios correspondientes, y por lo tanto, se solicita que proceda a hacer la exposición.

ARTICULO 2

La postulante **SANDRA JONIELLE GARCÍA QUESADA**, hace la exposición oral de su trabajo de graduación titulo "Evaluación de la doxiciclina, un derivado de tetraciclina, el cloruro de zinc y el clodronato, como inhibidores de los efectos locales causados por el veneno de la serpiente terciopelo *Bothrops asper*."

ARTICULO 3

Terminada la disertación, los miembros del Tribunal Examinador interrogan a la Postulante durante el tiempo reglamentario y, una vez concluido el interrogatorio, el Tribunal se retira a deliberar.

ARTICULO 4

El tribunal considera el trabajo final de graduación satisfactorio y le confiere la calificación de: 9.5

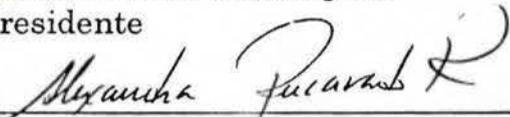
ARTICULO 5

El presidente del Tribunal comunica a la Postulante el resultado de la deliberación y la declara acreedora al grado de **Licenciada en Microbiología y Química Clínica** y al título profesional de **Doctora en Microbiología y Química Clínica**.

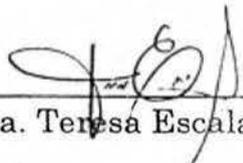
Se le indica la obligación de presentarse al acto público de juramentación al que será oportunamente convocada. Se da lectura al acta que firman los Miembros del Tribunal Examinador y a la Postulante, a las 10:15 am horas.



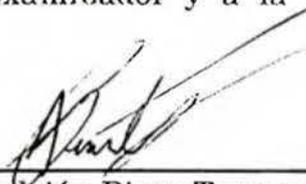
Dr. Javier Mora Rodríguez
Presidente



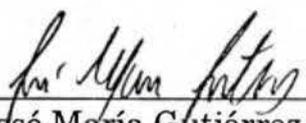
Dra. Alexandra Rucavado Romero



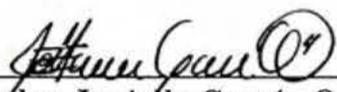
Dra. Teresa Escalante Muñoz



Dr. Adrián Pinto Tomas



Dr. José María Gutiérrez Gutiérrez



Sandra Jonielle García Quesada
Postulante

Dedicatoria

Para todos mis familiares y amigos, que siempre me ayudaron a seguir adelante, que estuvieron ahí para brindarme el apoyo en los momentos más difíciles de mi vida, y que con sus consejos oportunos me permitieron llegar hasta aquí, a mi abuelo Víctor, gracias por darme la fuerza hasta el último momento, por hacerme valorar la vida, y a Dios que sin su ayuda nunca hubiera podido lograr todas mis metas!

Agradecimientos:

A todo el personal de Instituto Clodomiro Picado, que de una u otra forma, con su colaboración, hacen que proyectos de graduación como este puedan rendir frutos. A mi tutora Dra. Alexandra Rucavado, por la enorme paciencia, y por crear en mí una mente crítica, y en general a todos los investigadores del Instituto, que con sus comentarios y consejos, nos ayudan a todos los que con ilusión, desarrollamos nuestro proyecto de investigación en tan prestigiosa institución.

A todos mis profesores de la Facultad de Microbiología, lo cuales tuvieron un gran impacto en mí como persona, y como futura profesional, gracias por darme una formación de calidad.

A mi mamá, por contribuir a mi educación, por buscar siempre a su manera, que siguiera adelante, que hiciera valer mis ideas y que nunca me dejara vencer.

A mi papá, por darme la fuerza para nunca rendirme a pesar de las adversidades, y por siempre encontrar la luz para mí en medio de la tormenta, gracias por todos los consejos.

A mi hermano, gracias por estar a mi lado, por crecer conmigo, por reír y sufrir conmigo, por protegerme siempre.

A mis amigos, todos! Los perdidos y los ganados!, por la vida, por las experiencias, por las matadas, por las no dormidas, por las celebradas, y por todo lo que hace que la experiencia universitaria sea muy gratificante, gracias por ser un gran apoyo en mi vida.

INDICE GENERAL

	Pág.
Acta	ii
Dedicatoria	iv
Agradecimientos	v
Índice	vi
Lista de figuras	viii
Resumen	ix
I. Objetivo General	1
II. Objetivos específicos	1
III. Introducción	2
3.1 Generalidades de serpientes y venenos.	2
3.2 Efectos locales de venenos de Vipéridos.	3
3.3 Inhibidores doxiciclina, cloruro de zinc y clodronato.	5
IV. Justificación	7
V. Materiales y Métodos	8
5.1 Veneno e inhibidores.	8
5.2 Toxicidad i.v. de la doxiciclina.	9
5.3 Neutralización de la actividad hemorrágica en piel.	9
5.4 Neutralización de la actividad hemorrágica en músculo.	10
5.5 Inhibición de la actividad edematígena.	11
5.6 Estadística.	12
VI. Resultados.	13
6.1 Toxicidad intravenosa de la Doxiciclina.	13
6.2 Efecto sobre actividad hemorrágica en piel con el método inyección independiente.	13
6.3 Efecto sobre actividad hemorrágica en músculo con el método de inyección independiente.	16

6.4 Efecto sobre la capacidad edematígena del veneno de <i>Bothrops asper</i> en la almohadilla de la pata de ratones con el método de pre-incubación.	20
VII. Discusión	24
VIII. Conclusiones.	30
IX. Bibliografía.	31

Lista de Figuras

Figura 1. Estructura química de los inhibidores doxiciclina (1), Clodronato (2)	8
Figura 2. Inhibición de la actividad hemorrágica del veneno de <i>Bothrops asper</i> (15µg) por el inhibidor doxiciclina con el método inyección independiente en piel.	14
Figura 3. Inhibición de la actividad hemorrágica del veneno de <i>Bothrops asper</i> (15µg) por el inhibidor ZnCl ₂ con el método de inyección independiente en piel	15
Figura 4. Inhibición de la actividad hemorrágica del veneno de <i>Bothrops asper</i> por el inhibidor clodronato con el método de inyección independiente en piel	16
Figura 5. Inhibición de la actividad hemorrágica del veneno de <i>Bothrops asper</i> en una concentración de 50 µg/50 µl por el inhibidor doxiciclina en muslo con el método de inyección independiente.	17
Figura 6. Inhibición de la actividad hemorrágica del veneno de <i>Bothrops asper</i> en una concentración de 50 µg/50 µl por el inhibidor ZnCl ₂ en muslo con el método de inyección independiente.	18
Figura 7. Inhibición de la actividad hemorrágica del veneno de <i>Bothrops asper</i> en una concentración de 50 µg/50 µl por el inhibidor clodronato en muslo con el método de inyección independiente.	19
Figura 8. Inhibición de de la formación del edema por el veneno de <i>Bothrops asper</i> por el inhibidor doxiciclina con inyección s.c. intraplantar.	21
Figura 9. Inhibición de de la formación del edema por el veneno de <i>Bothrops asper</i> por el inhibidor ZnCl ₂ con inyección s.c. intraplantar.	22
Figura 10. Inhibición de de la formación del edema por el veneno de <i>Bothrops asper</i> por el inhibidor Clodronato con inyección s.c. intraplantar.	23

Resumen

Los miembros de la familia Viperidae producen venenos y son capaces de inyectar estas secreciones en humanos, generando cuadros clínicos de envenenamiento que se caracterizan por una fisiopatología compleja. En Centroamérica y en la parte norte de Sudamérica la especie *Bothrops asper* es la responsable de la mayoría de casos. Se ha mencionado la baja efectividad de algunos antivenenos para neutralizar los efectos locales del envenenamiento dado que las toxinas pueden causar necrosis irreversible rápidamente. Dada la importancia clínica que tienen los efectos locales, tales como hemorragia y edema en la fisiopatología de la mordedura de serpientes, se evaluó en este trabajo la eficacia que tienen los inhibidores, doxiciclina, clodronato, y el cloruro de zinc, sobre estos efectos y así evaluar su posible uso como complemento del suero antiofídico en el tratamiento del paciente accidentado, al aplicarse de manera independiente luego de la exposición al veneno.

Para el estudio de la inhibición de la hemorragia por parte de estos tres inhibidores se probaron distintas concentraciones de inhibidor sobre la actividad hemorrágica de 15 $\mu\text{g}/100\mu\text{l}$ de veneno de *B. asper*, con inyección independiente en piel via i.d. obteniéndose, para la doxiciclina, en la máxima concentración de 100 mM un porcentaje de reducción de 81%, para el cloruro de zinc, la inhibición fue significativa en dos concentraciones y para el clodronato, fue posible observar inhibición significativa en todas las concentraciones ensayadas. Se ensayó además la inhibición de la hemorragia en músculo con una concentración de veneno de 50 $\mu\text{g}/50\mu\text{l}$. Para este método se obtuvieron porcentajes de reducción para el inhibidor doxiciclina de 35% y 44%. Para los otros dos inhibidores se alcanza una reducción significativa a concentraciones muy altas, las cuales ya se asocian a toxicidad. Además de los ensayos realizados para la inhibición de la hemorragia, se evaluó el efecto sobre la capacidad edematígena del veneno de *B. asper*, encontrándose, que en concentraciones de clodronato de 50mM se lograba una disminución del edema producido por el veneno solo. Para los otros inhibidores, no se da una reducción del edema y además contribuyen a este por lo que no pueden ser utilizados para evaluar este efecto local.

I. Objetivo General

Determinar la capacidad de la doxiciclina, un derivado de tetraciclina, el cloruro de zinc, y el clodronato de inhibir algunos de los efectos locales del veneno de la serpiente *Bothrops asper* (Terciopelo), tales como hemorragia y edema.

II. Objetivos específicos:

- 1- Determinar la toxicidad Intravenosa del inhibidor doxiciclina.
- 2- Determinar la capacidad de la doxiciclina, el cloruro de zinc, y el clodronato de inhibir la actividad hemorrágica del veneno de *Bothrops asper* por el método de inyección independiente en piel.
- 3- Determinar la capacidad de la doxiciclina, el cloruro de zinc, y el clodronato de inhibir la actividad hemorrágica del veneno de *Bothrops asper* por el método de inyección independiente en músculo.
- 4- Determinar la capacidad de la doxiciclina, el cloruro de zinc y el clodronato de inhibir la formación de edema a causa del veneno de *Bothrops asper*.

III. Introducción

3.1 Generalidades de Serpientes y Venenos

América Latina posee una fauna de serpientes rica y variada. Algunas especies clasificadas en la familia Colubridae y todas las especies de las familias Elapidae, la cual comprende las dos subfamilias Elapinae e Hydrophiinae y la familia Viperidae producen venenos y son capaces de inyectar estas secreciones en humanos, generando cuadros clínicos de envenenamiento (Campbell et al., 1989; Villalobos, 2008).

Estos accidentes afectan fundamentalmente a la población rural involucrada en faenas agrícolas y se caracterizan por una fisiopatología compleja. La enorme mayoría de los envenenamientos ofídicos en América Latina son causados por especies de la familia Viperidae (Gutiérrez, 2002). En Centroamérica y en la parte norte de Sudamérica la especie *Bothrops asper* es la responsable de la mayoría de casos (Gutiérrez, 1995).

Las mordeduras de serpiente no son reportadas de manera sistemática en muchas regiones del mundo, sin embargo algunos países tienen sistemas confiables de reporte que proveen datos confiables sobre el número de casos de mordedura de serpiente (Chippaux, 1998). Tal es el caso del sistema de salud costarricense, en donde el accidente ofídico es de reporte obligatorio. En Costa Rica durante el periodo de 1990-2000, se reportaron en hospitales y otros centros de atención un total de 5550 accidentes por mordedura de serpiente (Sassa et al., 2003).

A pesar de que los antivenenos son producidos por varios laboratorios en varios continentes, el envenenamiento por mordedura de serpiente, causante de gran morbilidad y mortalidad, tiene todavía un impacto importante en la población

y sistemas de salud de regiones como África, Asia, Oceanía y América Latina (Gutiérrez et al., 2006).

Los venenos de vipéridos consisten en una mezcla altamente bioactiva de proteasas, péptidos, y proteínas no enzimáticas que interactúan con múltiples componentes de la homeostasis de los mamíferos, resultando en un rápido colapso cardiovascular de la presa envenenada, y en víctimas humanas, un estado de incoagulabilidad y hemorragia potencialmente mortales (Wagstaff et al., 2008).

El veneno de las serpientes es secretado y almacenado por glándulas de veneno, estas son glándulas salivales modificadas que secretan una mezcla compleja de proteínas especializadas y enzimas, las serpientes usan este veneno para matar, ayudar a digerir la presa y como defensa. En una mordedura el veneno es inyectado en la víctima por medio de dientes afilados y causa daño de múltiples maneras. Los venenos afectan elementos clave en la mayoría de vías fisiológicas de los animales (Doherty y Way, 2006)

3.2 Efectos Locales de venenos de Vipéridos.

Los venenos de serpientes son mezclas complejas de sustancias con una amplia gama de características bioquímicas y farmacológicas. Entre ellas encontramos proteínas, lípidos y compuestos inorgánicos (Franceschi, 1999).

Las proteínas constituyen más del 90% del peso seco de estos venenos, conteniendo enzimas, proteínas no enzimáticas y proteínas no tóxicas.

Dado que las proteasas están presentes en la mayoría de venenos han sido muy investigadas. Las proteasas aisladas se han clasificado por estructura en serina proteasas que tienen actividad coagulante, fibrinogenolítica y fibrinolítica, y en metaloproteinasas, las cuales son altamente tóxicas y causan sangrado severo, ya sea por interferencia en la coagulación o por degradación de la membrana basal de capilares sanguíneos y componentes de la matriz extracelular. Las

metaloproteinasas son dependientes de zinc (Zn^{2+}) y tienen la secuencia HEXXHXXGXXH para la unión de este metal (Matsui et al., 2000)

Los venenos de Viperidae contienen varias metaloproteinasas que actúan sinérgicamente para degradar la matriz extracelular del vaso sanguíneo afectando la hemostasis. (Lu et al., 2005).

En el envenenamiento, se da un daño tisular local característico, por ejemplo, necrosis del músculo esquelético, edema, hemorragia, dermonecrosis y formación de ampollas, así como alteraciones sistémicas, de hemorragia, shock cardiovascular, fallo renal agudo y coagulopatías (Gutiérrez, 1995; Warrel, 1996).

Muchos de estos efectos locales y patológicos son debidos a la acción de las metaloproteinasas del veneno de serpiente (SVMP), las cuales son endopeptidasas dependientes de zinc que pertenecen al grupo reprotisina de las metaloproteinasas (Fox y Serrano, 2005). Su clasificación estructural se da de la siguiente manera: PI son las que tienen únicamente el dominio de metaloproteinasas, las PII tienen tanto el dominio metaloproteinasas como uno tipo disintegrina, las PIII tienen los dos dominios mencionados y uno adicional rico en cisteína, y las PIV tienen la estructura de dominios de las PIII más un dominio tipo lectina unido por enlaces disulfuro (Bjarnason y Fox, 1995). En otros análisis se han encontrado además subclases de PII y PIII que reflejan un potencial proteolítico, así como la formación de estructuras diméricas (Fox y Serrano, 2005).

Un problema clínico importante es el tiempo que transcurre entre la mordedura y la administración del antiveneno. Se ha mencionado la baja efectividad de algunos antivenenos para neutralizar los efectos locales del envenenamiento dado que las toxinas pueden causar necrosis irreversible rápidamente (Theakston et al., 2003) por lo que el tiempo que transcurre entre un evento y otro es de suma importancia. En el veneno existen hidrolasas como las metaloproteinasas, fosfolipasas A2, y posiblemente hialuronidasas, las cuales son

las principales responsables del daño local observado frecuentemente en el envenenamiento. Estas toxinas son difíciles de neutralizar por las IgG y sus fragmentos cuando se encuentran en el tejido, por lo que es urgente el desarrollo de nuevas terapias que se apliquen en el lugar de la mordedura y contrarresten los efectos locales del veneno (Gutiérrez, 2006).

3.3 Inhibidores doxiciclina, cloruro de zinc y clodronato

Las metaloproteinasas de matriz (MMPs) encargadas de la degradación de la matriz extracelular son estructural y funcionalmente homólogas a las SVMPs. En muchos estudios se han buscado inhibidores de estas metaloproteinasas como ayuda en diversas patologías en las cuales se ven involucradas (Liu, 2003; Saarto et al, 2008; Diel et al, 2008; Suzuki et al, 2008). Por sus similitudes estructurales los inhibidores de metaloproteinasas de matriz podrían neutralizar los efectos de las metaloproteinasas de venenos tal y como se ha visto en otros casos (Rucavado et al., 2000, Escalante et al., 2000)

Las tetraciclinas son antibióticos con actividad contra gran variedad de bacterias gram positivas y negativas, aerobias y anaerobias, la clortetraciclina es el prototipo de esta clase y se introdujo en 1948. Dentro de los tipos de tetraciclinas se tienen además la oxitetraciclina, la demeclociclina, la metaciclina la doxiciclina y la minociclina. Las últimas dos son los fármacos más lipofílicos, y por peso suelen ser los más activos. (Brunton et al., 2007).

La doxiciclina por otra parte, es un inhibidor no específico de las metaloproteinasas de matriz (MMP), esta es capaz de inhibir la secreción de MMP-2 de un cultivo de células epiteliales y células de músculo liso, sin embargo el mecanismo de esta inhibición no es bien entendido, (Liu, 2003). Se ha visto que la doxiciclina administrada en dosis bajas disminuye significativamente la actividad de las MMPs por múltiples mecanismos en enfermedades inflamatorias sin observarse efectos antimicrobianos (Golub et al., 1998).

Los bisfosfonatos son análogos del pirofosfato, forman una estructura tridimensional capaz de quelar cationes divalentes como el calcio, razón por la cual los bisfosfonatos tienen mayor afinidad por el hueso, especialmente si se encuentra en remodelado constante. Existen tres generaciones de bisfosfonatos, dentro de las cuales, el clodronato se encuentra en la primera. La utilidad de estos fármacos, residen en que inhiben directamente la resorción ósea (Brunton, 2007). Esta propiedad ha sido explotada al utilizarse como complemento en el tratamiento de osteoporosis, en pacientes con cáncer de seno con metástasis a médula ósea, así como para la prevención de osteoporosis en esta misma enfermedad (Saarto et al., 2008; Diel et al., 2008; Suzuki et al., 2008). Por esta capacidad de quelar cationes es que presentan un amplio espectro inhibitorio sobre la MMPs. El clodronato, es capaz de inhibir la actividad de MM1-MMP, reduciendo la capacidad invasiva y metastásica de las células del osteosarcoma MG-63 (Heikkila et al., 2003).

Además los estudios terapéuticos utilizando este tipo de inhibidor han sido realizados en pacientes que presentan cáncer en estado avanzado, y las experiencias hechas con modelos animales han mostrado claramente la inhibición de las metaloproteasas (Arvelo y Cotte, 2006)

Varias proteinasas incluyendo las metaloproteinasas son inhibidas por concentraciones de zinc y otros metales divalentes. En varios estudios se ha visto que la incorporación de iones metálicos en diversas proteínas, las cuales tienen dominios catalíticos dependientes de zinc al igual que las MMPs, resulta en una gran inhibición al compararse con su forma inalterada, además se ha observado que altas concentraciones de este ión son capaces de inhibir de manera significativa las MMP-2 y MMP-9 (Souza, 2001; Underwood et al., 2003).

Estos datos sugieren que diversas concentraciones de los iones divalentes, como es el caso del Zn^{2+} serían capaces de inhibir la actividad de las metaloproteinasas a pesar de que estas sean dependientes de este catión.

IV. Justificación

El accidente ofídico en Costa Rica, si bien desde la intervención de los sueros antiofídicos presenta una disminución en el número de casos fatales, es un problema cotidiano. Además de la gran biodiversidad de la que disfrutamos somos un país eminentemente agrícola, por lo que por diversas actividades nos encontramos expuestos a un posible accidente ofídico. Dentro de las serpientes que con mayor frecuencia causan mordeduras en Centroamérica y en nuestro país se encuentra la especie *Bothrops asper*. Esta frecuencia puede deberse a que es una especie que se ha adaptado a vivir en diferentes nichos ecológicos, por lo que puede adaptarse al creciente desarrollo urbano, aumentando así la posibilidad de accidentes

Dada la importancia clínica que tienen los efectos locales, tales como hemorragia y edema en la fisiopatología de la mordedura de serpientes de la especie *B. asper*, así como la limitada contribución que tienen los antivenenos para reducir estos efectos locales causados por el veneno, se pretende con este trabajo evaluar la eficacia que tienen los inhibidores doxiciclina, cloruro de zinc y clodronato, de participar como complemento del suero antiofídico en el tratamiento del paciente accidentado, al aplicarse de manera independiente luego de la exposición al veneno. Los ensayos con inyección independiente pretenden reproducir el envenenamiento como ocurriría en condiciones naturales.

Las metaloproteinasas presentes en el veneno de la especie *B. asper*, son de gran importancia en los efectos locales mencionados. Los inhibidores que se pretenden estudiar, han demostrado un efecto inhibitor sobre metaloproteinasas de matriz, por lo que podrían ser de utilidad para la inhibición de las metaloproteinasas del veneno de la serpiente *B. asper*, además la administración in situ de dichos inhibidores podrían resultar en una ayuda terapéutica para disminuir de manera significativa el daño local inducido por estas proteasas.

V. Materiales y Métodos

5.1 Veneno e inhibidores.

Se utilizó un pool de veneno obtenido de más de 40 especímenes adultos de la región del Pacífico de Costa Rica y que se encuentran en cautiverio en el Instituto Clodomiro Picado. Este veneno fue liofilizado y mantenido a -70°C hasta su uso. Las soluciones de los inhibidores doxiciclina ($\text{C}_{22}\text{H}_{24}\text{H}_2\text{O}_8 \cdot \text{HCl}$) $_2 \cdot \text{C}_2\text{H}_6\text{O} \cdot \text{H}_2\text{O}$ (Doxycycline hyclate D 9891 Sigma-Aldrich, MO, USA) y Cloruro de Zinc (Zinc Chloride L: 4322-01 JT. Baker) fueron preparadas en PBS pH 7.2 la primera, y en agua destilada la segunda. Fue necesario utilizar HCl en algunas ocasiones para lograr la solubilidad de la doxiciclina en PBS. Se prepararon también disoluciones del inhibidor clodronato ($\text{CH}_2\text{O}_6\text{Cl}_2\text{Na}_2\text{P}_2$ (Dichloromethylenediphosphonic acid disodium salt D4434 Sigma-Aldrich, MO, USA)) en PBS pH 7.2

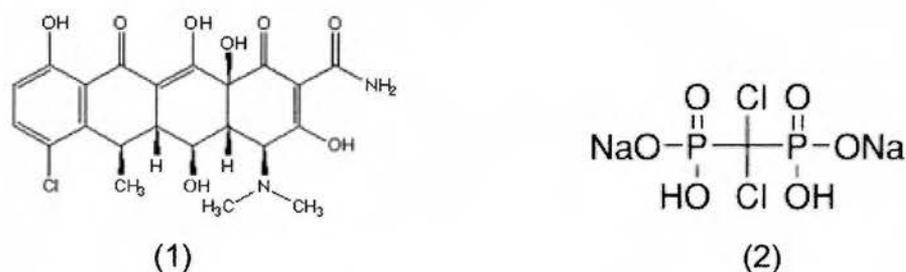


Fig 1. Estructura química de los inhibidores doxiciclina (1), Clodronato (2)

Patrón de hemoglobina.

Se utilizó un patrón de hemoglobina de 18 g/dl proporcionado por el CIHATA, el cual se diluyó en PBS para obtener concentraciones requeridas para cada experimento.

5.2 Toxicidad i.v. de la doxiciclina.

Para estudiar la toxicidad del inhibidor doxiciclina, se inocularon soluciones de 200mM y 100mM del inhibidor por vía intravenosa a grupos de 2 ratones y 50mM en grupos de 3 ratones de 16-18 g, se observó el efecto inmediato de dichos tratamientos. Dicho ensayo de toxicidad se realizó con el objetivo de determinar si el inhibidor presentaba toxicidad sistémica, ya que esta no había sido reportada en trabajos anteriores.

5.3 Neutralización de la actividad hemorrágica en piel con inyección independiente

Se utilizó el método de inyección independiente que consiste en la inyección de veneno en una concentración de 15 μ g (equivalente a 10 DHM) diluido en PBS y la inyección inmediatamente posterior del inhibidor, ambos por vía intradérmica en la región abdominal de grupos de 4 ratones de 18-20 g. Se inyectaron grupos de ratones con el inhibidor en la máxima concentración y veneno solo como controles. En el caso de la doxiciclina, los ratones fueron inyectados con 50 μ l de veneno y 50 μ l de diferentes concentraciones de inhibidor (12.5 mM, 25 mM, 50mM y 100 mM). Luego de 1h los ratones fueron sacrificados por dislocación cervical y el área hemorrágica fue estimada en la sección interna de la piel (Gutiérrez et al., 1985). Tomando como punto de referencia (100%) el valor del diámetro de la lesión hemorrágica en los ratones inyectados con la

solución control de veneno sin inhibidor, se estimó, el porcentaje de reducción de la hemorragia para cada tratamiento de veneno más inhibidor.

Se realizó luego el mismo procedimiento de inyección independiente para probar la actividad inhibitoria del cloruro de zinc ($ZnCl_2$), utilizando soluciones de 25mM, 50mM y 100mM, con los mismos volúmenes mencionados anteriormente. Luego de 1 h los ratones se sacrificaron por dislocación cervical y el área hemorrágica fue estimada en la sección interna de la piel. Con el mismo protocolo se evaluó además el inhibidor clodronato, en este caso se utilizaron concentraciones de 50mM, 100mM y 200mM de inhibidor, utilizando la misma metodología. Luego de 1h los ratones fueron sacrificados y la hemorragia fue estimada de la misma manera que los dos inhibidores anteriores.

5.4 Neutralización de la actividad hemorrágica en músculo con inyección independiente.

Se realizaron experimentos de inhibición de la actividad hemorrágica con inyección independiente en músculo con el fin de evaluar la actividad de los inhibidores en condiciones más similares a lo que ocurre en un accidente ofídico, ya que la inyección de veneno al morder la serpiente ocurre frecuentemente por la vía intramuscular.

Se inyectaron grupos de 4 ratones de 18-20 g por la vía i.m. en el muslo de la pata derecha, con una concentración constante de 50 μ g/ 50 μ l de veneno y las siguientes concentraciones de cada inhibidor: (a) doxiciclina: 25mM, 50 mM, 100mM y 200 mM, (b) $ZnCl_2$: 25mM, 50 mM y 100 mM y (c) clodronato: 50mM, 100mM y 200mM. Se realizaron controles de veneno más PBS, inhibidor más PBS y PBS solo, esto para respetar los volúmenes que se alcanzan con la inyección independiente con la cual se alcanza un volumen final de inóculo de 100 μ l.

Una hora después de la inyección, el contenido de hemoglobina fue evaluado por el método de Owny et al. (1984). Brevemente, los animales se sacrificaron por dislocación cervical, los músculos inyectados se extrajeron, se pesaron y se colocaron en 1.5 ml de solución de Drabkin. Luego de una noche de incubación a 4°C se tomaron 1.2 ml de la solución, se centrifugaron a 10.000 rpm por 5 min, y se diluyó 1 ml del sobrenadante en 1ml de solución de Drabkin para obtener una dilución 1:2, a esta última se le midió la absorbancia a 540 nm usando la solución de Drabkin como blanco.

La concentración de hemoglobina fue estimada con una curva de calibración preparada a partir de un patrón de hemoglobina de 18 g/dl. Los datos obtenidos se convirtieron a mg de hemoglobina / gramo de tejido (a).

En otros experimentos se evaluaron diferentes concentraciones de doxiciclina contra una cantidad fija de veneno de 25 µg/50 µl o 30 µg / 50 µl. La concentración 25 µg / 50 µl se ensayó en el músculo gastrocnemio para buscar una mejor delimitación de la hemorragia dadas las variaciones observadas en muslo

$$(a) Cn \text{ g/ } 100 \text{ ml} \times 1,5 \text{ ml} \times 1000 = (\text{mg/g}) / 250^*$$

*corresponde a la dilución de la curva de hemoglobina para humanos

5.5 Inhibición de la actividad edematígena

Una cantidad constante de veneno fue incubada con varias concentraciones de los inhibidores, a saber 25, 50 100 mM, a 25°C por 30 min. Alícuotas de las mezclas conteniendo 5 µg de veneno en un volumen de 50 µl fueron inyectados vía subcutánea en la almohadilla de la pata derecha de grupos de 5 ratones (16-18g), se incluyeron controles de 100 mM de doxiciclina, cloruro de zinc y clodronato, y de veneno solo, además de una medición basal. El edema fue

evaluado a varios intervalos de tiempo (1, 3, 5, 9 y 27 horas), midiéndose el aumento en el grosor de la almohadilla plantar con un Caliper Spring de baja presión (Lomonte et al., 1993). Seguidamente se estimó la magnitud del edema como porcentaje de aumento de grosor de la pata ($[(\text{Grosor pata derecha}/\text{Grosor basal}) * 100] - 100$), y se graficó en relación a los tiempos de observación.

5.6 Estadística

Para determinar la significancia estadística de las diferencias entre promedios, se utilizó la prueba estadística ANOVA cuando se compararon varios grupos experimentales, seguido por una prueba Tukey, utilizando en programa InStat.

VI.Resultados

6.1 Toxicidad i.v. de la doxiciclina.

En los grupos de ratones analizados, para la concentración de 200mM y 100mM de doxiciclina se observó un 100% de mortalidad. El tercer grupo de ratones, a los cuales se les inoculó la concentración de 50mM, presentaron una mortalidad de 0% (cuadro 1).

Cuadro 1. Determinación de la toxicidad intravenosa de la Doxiciclina

Inóculo (i.v.)	Ratones vivos	Ratones muertos
200mM	0	2
100mM	0	2
50mM Doxiciclina	3	0

6.2 Efecto sobre actividad hemorrágica en piel con el método de inyección independiente.

Efecto de la doxiciclina sobre la actividad hemorrágica del veneno de *Bothrops asper* con el método de inyección independiente en piel.

Se probó la actividad inhibitoria de distintas concentraciones del inhibidor doxiciclina sobre la actividad hemorrágica de 15 $\mu\text{g}/100\mu\text{l}$, el equivalente a 10 DHM del veneno de *B. asper*. Se inocularon ratones con la dosis máxima de doxiciclina de 100mM como controles, y grupos de 4 ratones para la inyección independiente de veneno e inhibidor. Se incluyó además una concentración adicional de doxiciclina, para buscar un mínimo de inhibición con una concentración de 12,5 mM. En los controles de concentración máxima de

doxiciclina se presentó una lesión de color amarillento, hiperemia e inflamación pero sin hemorragia. Todos los controles de veneno presentaron hemorragia. En la concentración de 12.5 mM la inhibición es mínima, y no es significativa en relación al veneno solo. En este ensayo si se logró observar una disminución significativa en relación a las concentraciones de 25mM, 50mM y 100 mM al comparar con el veneno solo (Figura 2). En base a los datos anteriores se puede estimar el porcentaje de reducción de hemorragia, en 42%, 34% y 81 % respectivamente.

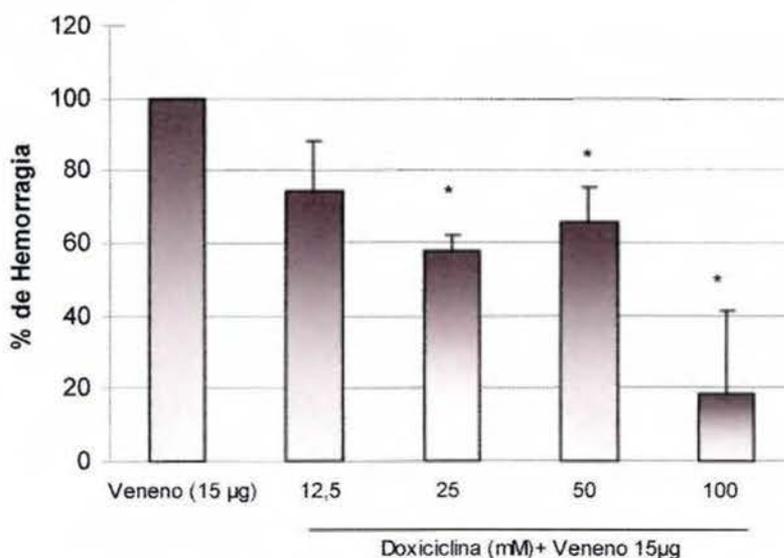


Figura 2. Inhibición de la actividad hemorrágica del veneno de *B asper* (15µg) por el inhibidor doxiciclina con inyección independiente vía i.d. en piel (* diferencia significativa con $p < 0,05$ al comparar con veneno solo)

Efecto del $ZnCl_2$ sobre la actividad hemorrágica del veneno de *Bothrops asper* en piel con el método de inyección independiente.

Se probó la actividad inhibitoria de distintas concentraciones de cloruro de zinc sobre la actividad hemorrágica de una concentración constante de veneno de 15µg, inoculando en el mismo sitio el veneno y luego concentraciones de 100mM, 50mM y 25mM del inhibidor, no se probaron concentraciones menores a estas por

ejemplo de 10mM ya que no se observa una disminución significativa de la hemorragia en experimentos con preincubación (Henríquez, 2006). En todas las concentraciones probadas se observó cierto grado de inhibición ya que el área iba disminuyendo al aumentar la concentración de inhibidor. La reducción fue significativa entre la hemorragia ocasionada por lo 15 μ g de veneno, y la causada por la mezcla in situ de las concentraciones de 50mM y 100mM, no así con la de 25 mM. Se puede estimar el porcentaje de reducción para las concentraciones significativas en 28% y 49% respectivamente (Figura 3).

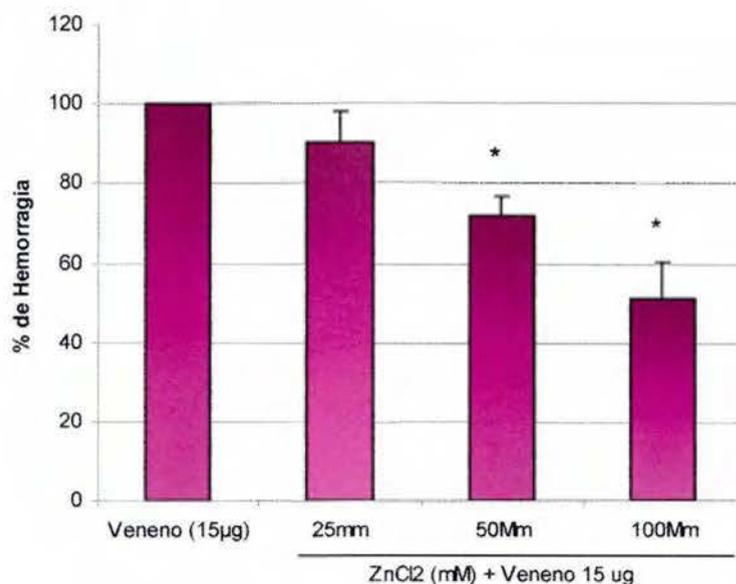


Fig 3. Inhibición de la actividad hemorrágica del veneno de *B. asper* (15 μ g) por el inhibidor cloruro de zinc con inyección independiente via i.d. en piel. (* diferencia significativa con $p < 0,05$ al comparar con veneno solo)

Efecto del inhibidor clodronato sobre la actividad hemorrágica del veneno de *B. asper* en piel con el método de inyección independiente.

Se probó la actividad inhibitoria de distintas concentraciones de clodronato sobre la actividad hemorrágica de una concentración constante de veneno de 15 μ g, inoculando en el mismo sitio el veneno y luego concentraciones de 50mM, 100mM y 200mM del inhibidor; no se probaron concentraciones menores a estas ya que no se vio inhibición significativa en la hemorragia con concentraciones de

25mM en experimentos con preincubación (Henríquez, 2006). En todas las concentraciones probadas se observó cierto grado de inhibición ya que el área iba disminuyendo al aumentar la concentración de inhibidor. La reducción fue significativa entre la hemorragia ocasionada por lo 15 µg de veneno, y la causada por la mezcla in situ de las concentraciones de 50mM, 100mM y 200mM, siempre en relación con el aumento de concentración de inhibidor. Para dichos tratamientos el porcentaje de reducción de la hemorragia fue de 19%, 35% y 46% respectivamente.

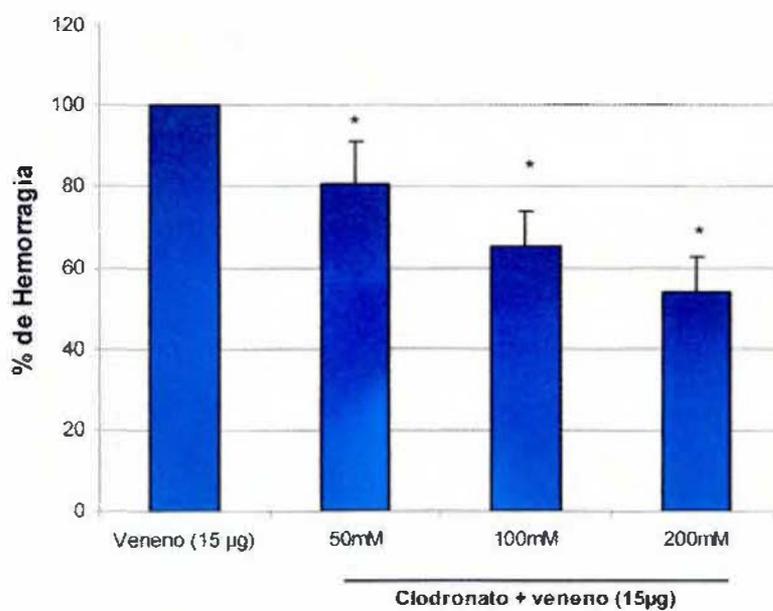


Figura 4. Inhibición de la actividad hemorrágica inducida por el veneno de *B. asper* (15µg) por el inhibidor clodronato, con inyección independiente via i.d. en piel (* diferencia significativa con $p < 0.05$ al comparar con veneno solo)

6.3 Efecto sobre actividad hemorrágica en músculo con el método de inyección independiente.

Efecto de la doxiciclina sobre la actividad hemorrágica del veneno de *Bothrops asper* en músculo por el método de inyección independiente.

Se determinó la capacidad inhibitoria de la doxiciclina sobre la actividad hemorrágica producida por el veneno de *Bothrops asper* en concentraciones de 50µg/50µl, 30 µg/50ul y 25µg/50µl, en muslo de la pata derecha y gastrocnemio. De estas concentraciones, la de 30 µg y la de 25 µg en gastrocnemio no indujeron una hemorragia significativa para determinar la capacidad inhibitoria de los compuestos ensayados. Se utilizó entonces la concentración de 50µg/50µl, luego de realizar las lecturas de hemoglobina y al graficar el porcentaje de inhibición se pudo observar una reducción significativa únicamente para las concentraciones de 100mM y 200mM de doxiciclina en relación a la hemorragia inducida por el veneno, obteniéndose un porcentaje de reducción de un 44% y 35% respectivamente. En las otras concentraciones la de 25mM no presenta inhibición, dándose un porcentaje de hemorragia igual al control de veneno y en 50mM a pesar de haber una reducción debido a la variabilidad inherente al método, esta no fue significativa.

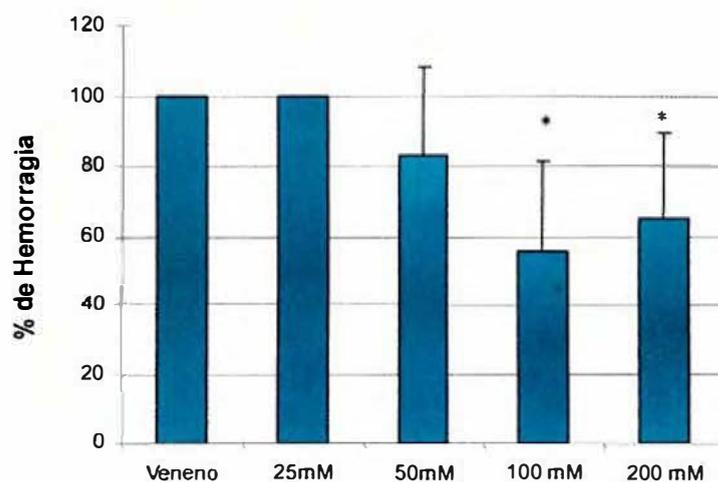


Figura 5. Inhibición de la actividad hemorrágica del veneno de *B. asper* (50 µg/50µl) por el inhibidor doxiciclina en muslo con el método de inyección independiente (*diferencia significativa con $p < 0,05$).

Efecto del $ZnCl_2$ sobre la actividad hemorrágica del veneno de *Bothrops asper* en músculo por el método de inyección independiente.

Al igual que para la doxiciclina se determinó la capacidad inhibitoria del Cloruro de Zinc sobre la actividad hemorrágica del veneno de *Bothrops asper* en muslo por el método de inyección independiente frente a una concentración de veneno de $50\mu g/50\mu l$. Se probaron concentraciones de 25mM, 50mM y 100mM de cloruro de Zinc. Se logró una inhibición significativa de la actividad hemorrágica del veneno para la concentración de 100mM al comparar con el veneno solo. Para esta concentración el porcentaje de reducción obtenido fue de 58% en relación a la hemorragia inducida por el control de veneno. Para las concentraciones de 25 mM y 50 mM no se observó una disminución significativa de la hemorragia causada por el veneno (Figura 6).

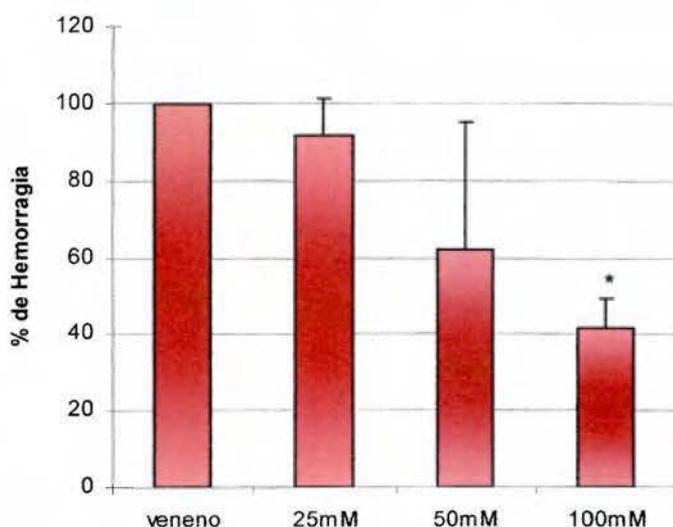


Figura 6. Inhibición de la actividad hemorrágica del veneno de *B. asper* ($50\mu g/50\mu l$) por el inhibidor cloruro de zinc en muslo con el método de inyección independiente (* diferencia significativa con $p < 0,05$)

Efecto del clodronato sobre la actividad hemorrágica del veneno de *Bothrops asper* en músculo con el método de inyección independiente.

Se determinó la capacidad del Clodronato de inhibir la actividad hemorrágica de 50µg/50µl de veneno de *Bothrops asper* en músculo. De los resultados obtenidos se observó una reducción significativa entre la hemorragia observada en el control de veneno y la mezcla in situ de veneno y 200mM del inhibidor clodronato en el muslo de la pata derecha de los ratones analizados. Para esta concentración el porcentaje de reducción al comparar con veneno solo fue de 32 %. Para las concentraciones de 50mM y 100mM no se observó una disminución significativa de la hemorragia inducida por el veneno.

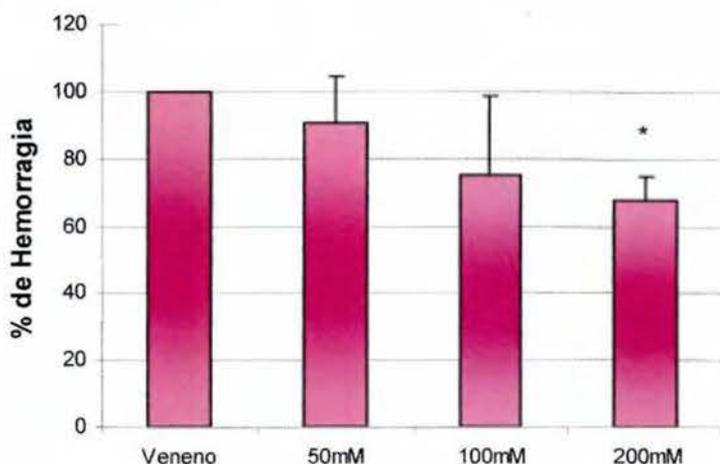


Figura 7 .Inhibición de la actividad hemorrágica del veneno de *B. asper* (50ug/50ul) por inhibidor clodronato en muslo con el método de inyección independiente (* $p < 0,05$ al comparar con veneno solo)

6.4 Efecto sobre la capacidad edematígena del veneno de *Bothrops asper* en la almohadilla de la pata de ratones con el método de pre-incubación.

Efecto del inhibidor doxiciclina sobre el efecto edematígeno del veneno de *Bothrops asper* en la almohadilla plantar de ratones con el método de pre-incubación.

Se determinó la capacidad del inhibidor doxiciclina de disminuir la formación de edema luego de la inyección de alícuotas de diferentes concentraciones de inhibidor y una concentración constante de 5µg de veneno de *Bothrops asper*, en la región subcutánea de la almohadilla de la pata derecha de los ratones.

Luego de observarse por un intervalo total de 27hs se concluyó que no hay una disminución en la formación de edema para ninguna de los tratamientos ensayados, y que inclusive las concentraciones de 100mM y 50mM más el veneno inducían mayor edema que el veneno solo. A las 3 horas de observación existe una diferencia significativa con $p < 0.05$ entre el edema inducido por el control de 100mM de doxiciclina y el control de veneno aumentando el edema.

A partir de las 5 horas de observación hay diferencia significativa para las concentraciones de 100mM y 50mM en la misma forma que la mencionada anteriormente. El valor del porcentaje de incremento del grosor entre la concentración de 25mM y el control de veneno corren casi paralelo desde el inicio como se puede observar en la figura 8. Todos los tratamientos de inhibidor y veneno potencian el edema, pero este disminuye al bajar la concentración del inhibidor en la mezcla de tratamiento.

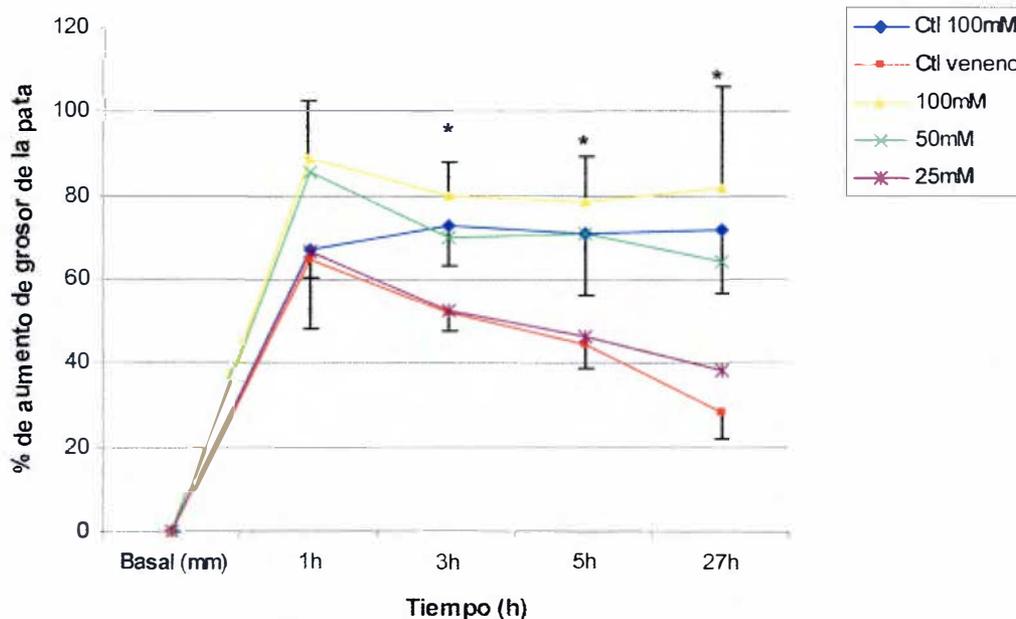


Figura 8. Inhibición de la formación de edema del veneno de *B. asper* por el inhibidor doxiciclina con inyección s.c. intraplantar (* diferencias significativas con $P < 0,05$ con respecto al veneno)

Efecto del inhibidor $ZnCl_2$ sobre la capacidad edematígena del veneno de *Bothrops asper* en la almohadilla plantar de ratones con el método de pre-incubación.

Se determinó la capacidad del inhibidor cloruro de zinc de disminuir la formación de edema luego de la inyección de alícuotas de diferentes concentraciones de inhibidor y una concentración constante de $5\mu g$ de veneno de *Bothrops asper* contenidos en un volumen de $50\mu l$, en la región subcutánea de la almohadilla de la pata derecha de los ratones. Luego de observarse por un intervalo total de 27hs, se observó que el tratamiento y el control en todos los tiempos probados dan más edema que la concentración de $5\mu g/50\mu l$ de veneno ensayada. A las 27 h el edema inducido por el veneno disminuye hasta un 40% mientras que en todos los demás tratamientos se mantienen por encima del 60%. Las diferencias entre el edema causado por los distintos ensayos pueden observarse en la figura 9.

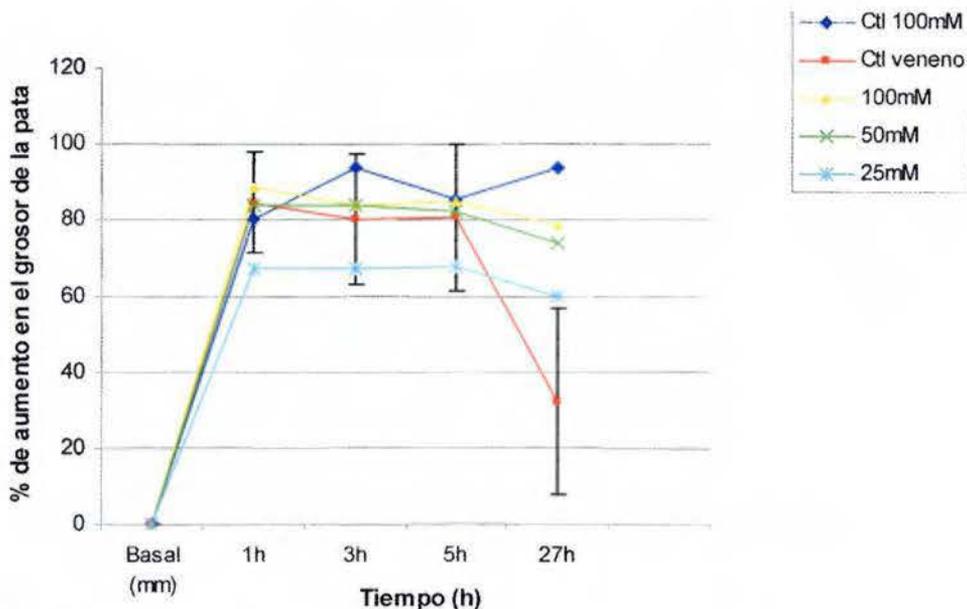


Figura 9. Inhibición de la formación de edema del veneno de *B. asper* por el inhibidor cloruro de zinc con inyección s.c. (No se observan diferencias significativas entre los tratamientos y el veneno).

Efecto del inhibidor clodronato sobre la capacidad edematígena del veneno de *Bothrops asper* en la almohadilla plantar de ratones con el método de pre-incubación.

Al igual que los dos inhibidores anteriores se ensayó la capacidad del inhibidor clodronato de disminuir la formación de edema luego de la inyección de alícuotas de diferentes concentraciones de inhibidor y una concentración constante de $5\mu\text{g}$ de veneno de *Bothrops asper* contenidos en un volumen de $50\mu\text{l}$, en la región subcutánea de la almohadilla de la pata derecha de los ratones. Para este inhibidor se observó una diferencia importante en relación a los dos anteriores, ya que este no produce un edema mayor que el causado por la concentración de veneno ensayada. A la hora de observación los tratamientos de 100 y 50mM logran disminuir significativamente el edema. A las 3hs de observación las concentraciones de 25 mM y 50mM son capaces de inhibir el edema causado por el veneno con $p < 0.05$ (figura 10).

A las 5hs de observación se observa una disminución pero con una diferencia apenas significativa con el tratamiento de 50mM, no así con los de 100mM y 25mM.

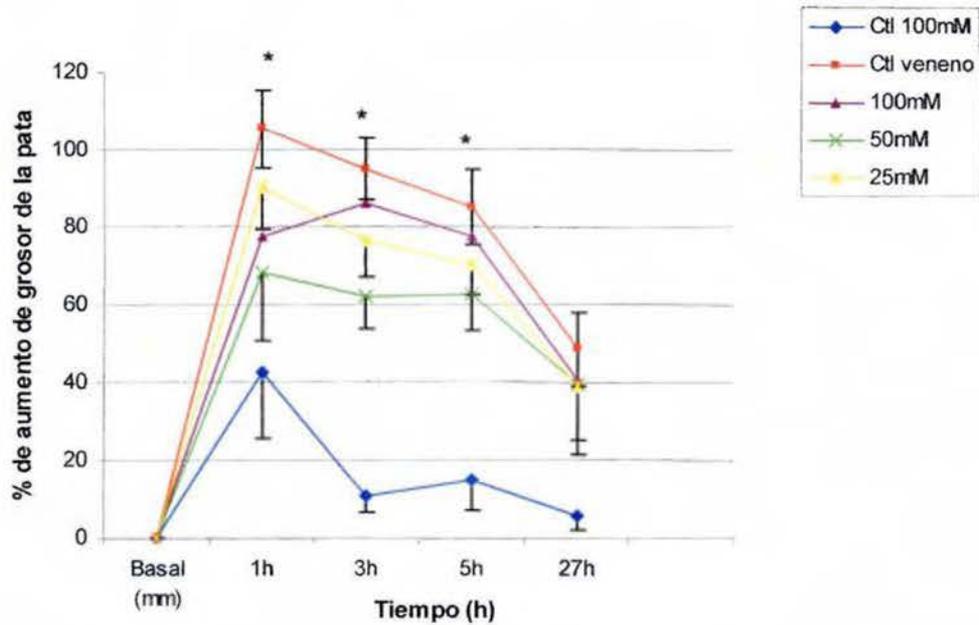


Figura 10. Inhibición de la formación de edema del veneno de *B. asper* por el inhibidor clodronato con inyección s.c. intraplantar (* diferencias significativas con $P < 0,05$ con respecto al veneno)

VII. Discusión

La enorme mayoría de los envenenamientos ofídicos en América Latina son causados por especies de la familia Viperidae. El cuadro clínico que se desarrolla en estos casos se asocia con daños locales rápidos y prominentes (edema, dolor, sangrado, necrosis), seguidos de alteraciones sistémicas (sangrado, coagulopatías, choque cardiovascular, insuficiencia renal aguda) (Otero et al., 1992; Gutiérrez, 1995). La mayoría de los efectos locales son debidos en su mayoría a la actividad de fosfolipasas A2 y metaloproteinasas dependientes de zinc presentes en el veneno.

Los métodos de primeros auxilios conocidos tradicionalmente contra el accidente ofídico han demostrado ser poco efectivos. Dentro de estos podemos encontrar el uso de torniquetes, incisiones locales, succión, crioterapias, shock eléctrico, e inoculación de químicos y materiales derivados de hierbas entre otros. (Theakston et al., 2003). Este tipo de carencias de terapia complementaria del suero atiofídico, es la que nos lleva a la búsqueda de alternativas de tratamiento que la complemente.

En Costa Rica anualmente se atienden cerca de 504 casos de envenenamientos ofídicos en humanos, con una incidencia de 15.6 casos por 100.000 habitantes (Villalobos, 2008). Este número de casos hace evidente que el accidente ofídico es un problema de salud pública importante en el país, por lo que la búsqueda de terapias que ayuden a minimizar dicha carga es de suma importancia. Algunos tratamientos complementarios sería la utilización de antibióticos para evitar infecciones secundarias o la administración del toxoide tetánico (Luna-Bauza, 2007) sin embargo esta terapias no ayudarían a minimizar el daño local que podría resultar del envenenamiento.

El tratamiento básico para mordeduras de serpiente es la administración parenteral de antivenenos heterólogos preparados en caballos u ovejas, que han

sido inmunizados con el veneno, estos antivenenos son eficaces en el control de la mayoría de las manifestaciones sistémicas, pero se comportan parcialmente inefectivos en la neutralización de las toxinas responsables de los efectos patológicos locales inducidos por los venenos de vipéridos y algunos elápidos (Warrell, 1992; Gutiérrez et al., 1998), dada la dificultad que presentan estos anticuerpos para llegar en suficiente cantidad al sitio de inyección del veneno dejando como resultado el desarrollo de severos daños locales en los tejidos que podría llevar a discapacidad o pérdida de función.

Muchos estudios realizados han demostrado que los efectos locales inducidos por el veneno de *B asper* se presentan pocos minutos después de la mordedura, desarrollando un cuadro clínico complejo que incluye dentro de otras manifestaciones hemorragia y edema. El edema es un efecto complejo provocado tanto por la acción directa de componentes del veneno, sobre la microvasculatura por parte de fosfolipasas y metaloproteinasas hemorrágicas, como por la liberación de mediadores endógenos, como la bradiquinina, eicosanoides e histamina (Texeira et al., 2003; Gutiérrez y Lomonte, 2003, Gutiérrez et al., 2007), mientras que el efecto hemorrágico local del veneno es debido a las metaloproteinasas del veneno (SVMPs), las cuales actúan por un mecanismo de dos pasos, en el cual el primero afecta principalmente la membrana basal de las células endoteliales que rodean los capilares, esto lleva a un debilitamiento de la estabilidad mecánica de la matriz extracelular, y como consecuencia de este primer paso las fuerzas biofísicas que operan normalmente en la microvasculatura promueven la distensión de la pared capilar, con un aumento subsecuente de la tensión de la pared, que lleva al eventual rompimiento de las células endoteliales (Gutiérrez et al., 2005).

Con la intención de buscar alternativas de terapia para estos dos efectos se trabajó con los inhibidores $ZnCl_2$, doxiciclina y clodronato como alternativas terapéuticas para neutralizar los efectos de hemorragia y edema. La toxicidad intravenosa para los inhibidores clodronato y $ZnCl_2$ han sido analizadas con

anterioridad en otros trabajos, en los cuales se observó que concentraciones de clodronato de 100mM y 200mM causaban la muerte de los ratones, concentraciones de 50mM eran seguras pero no inhibían el efecto letal del veneno, por otra parte el $ZnCl_2$ en concentraciones de 10mM es seguro pero tampoco inhibe el efecto letal (Henríquez, 2006). En nuestro caso al analizar el inhibidor doxiciclina, concentraciones de 200mM y 100mM del inhibidor causaron el 100% de mortalidad en los ratones, no así la concentración de 50mM, por lo que se considera una dosis segura. En otra serie de experimentos (datos no mostrados) realizados paralelo a los mostrados en este trabajo, se encontró sin embargo que esta concentración a pesar de ser segura, no es protectora frente al efecto letal del veneno de *B. asper*.

La inyección local de inhibidores directamente en el sitio de inyección del veneno rápidamente luego del envenenamiento es capaz de minimizar la hemorragia y dermonecrosis inducida por el veneno de *B. asper* (Rucavado A, *et al*, 2000). Basándose en esta evidencia de trabajos anteriores se evaluó la capacidad de los inhibidores mencionados, para inhibir la hemorragia del veneno de *B. asper* por el método de inyección independiente en el mismo sitio, vía i.d. e i.m. Para el inhibidor doxiciclina, de las concentraciones ensayadas vía i.d., las concentraciones de 25mM, 50mM y 100mM fueron capaces de inhibir de manera significativa la hemorragia en relación a un control de veneno de 15 μ g/100 μ l equivalente a 10DHM de veneno. Para la máxima concentración de inhibidor se obtuvo el mayor porcentaje de reducción de 81%, sin embargo en los controles de solo doxiciclina de 100mM se pudo observar un tipo de lesión amarillenta, por lo que dicha concentración a pesar de ser efectiva no podría ser utilizada, al menos para el modelo ensayado. Efectos similares de toxicidad para la doxiciclina se han observado en casos de esofaguitis asociado al uso de este antibiótico vía oral al estar en contacto con mucosas (Tahan *et al.*, 2008).

Para el inhibidor cloruro de zinc, en todas las concentraciones ensayadas se observó algún grado de inhibición, sin embargo esta fue solo significativa por la

mezcla in situ de veneno más concentraciones de 50mM y 100mM de inhibidor. A pesar de que la inhibición fue significativa, lográndose la mayor reducción con la concentración de 100mM, el efecto inhibidor se alcanza a dosis en las que hay toxicidad vía i.v., por lo que su uso estaría restringido.

Para el clodronato, fue posible observar inhibición significativa en todas las concentraciones ensayadas, estimándose un porcentaje de reducción 46% para la concentración máxima de inhibidor ensayada. Sin embargo esta reducción se alcanza a una concentración mayor a la obtenida para la doxiciclina, por lo que a pesar de lograr inhibir la hemorragia, de nuevo no sería aplicable, dado que esta se alcanza a muy altas concentraciones, donde se presenta toxicidad i.v. (Henriquez, 2006). Aun así en los ensayos realizados no se observó toxicidad i.d, en los controles que se montaron del inhibidor.

Con la intención de asemejar más una situación real de accidente ofídico se buscó ensayar la inhibición de la hemorragia, ahora en músculo, además con la intención de poder cuantificar, en base a una medición de concentración de hemoglobina, el grado de hemorragia y no solo en el cálculo de un área observada. Para este método se obtuvieron porcentajes de reducción para el inhibidor doxiciclina a muy altas concentraciones de inhibidor, de 100mM y 200mM, con porcentajes de 35% y 44% respectivamente. Al igual que para la doxiciclina, los porcentajes de reducción estadísticamente significativos para los otros dos inhibidores se alcanzan en concentraciones muy altas, las cuales ya se asocian a toxicidad.

Dada la rapidez con la que se presentan los efectos locales en el envenenamiento, la inyección local de inhibidores sería beneficioso para inhibir las metaloproteinasas responsables del daño en el depósito formado por la necrosis local y el rompimiento de los vasos sanguíneos (Rucavado et al., 2000), a pesar de esta afirmación, de los inhibidores ensayados por este método, ninguno alcanzó un grado de inhibición esperado, las dosis máximas presentes en los

controles sin embargo no producían más hemorragia que la mezcla veneno inhibidor.

Se ha sugerido que una combinación de varios inhibidores sería una evolución lógica a partir de todos los ensayos que se han realizado estudiando sus efectos inhibidores, ya que los venenos de serpientes contienen un gran número de SVMPs (proteinasas del veneno de serpiente), y una combinación de inhibidores, podría asegurar que exista una acción sobre cada SVMP (Howes et al., 2006).

Los efectos patológicos de la toxinas presentes en el veneno tales como necrosis y hemorragia promueven una reacción inflamatoria compleja asociada a la síntesis y liberación de mediadores inflamatorios, algunos de estos mediadores se encuentran involucrado en el aumento de la permeabilidad vascular y el edema, este último es causado en parte por la habilidad de los venenos de estimular la liberación de eicosanoides (Chávez et al., 1995; Farsky et al., 2005; Gutiérrez, 2007)

En los ensayos realizados para la evaluación de la inhibición del edema se observó que en concentraciones de clodronato de 50mM se lograba una disminución del edema producido por el veneno solo. Este hallazgo positivo es diferente a lo reportado usualmente en la literatura en relación a este inhibidor. Se ha encontrado que este bifosfonato al ser usado como terapia produce reacciones inflamatorias locales y sistémicas, dentro de las cuales destacan fiebre y aumento de proteínas de fase aguda. (Yamaguchi, et al., 2000; Hewitt et al., 2005; Tanvetyanon y Stiff ,2006). A pesar de estos reportes se podría pensar entonces en un mecanismo distinto para el efecto inhibitorio que presenta el clodronato en este ensayo, y podría atribuírsele a la propiedad de secuestrar iones divalentes y afectar así proteínas presentes en el veneno, que en este caso estén contribuyendo al edema como las metaloproteinasas hemorrágicas.

Dado que los venenos de serpiente están constituidos por una mezcla compleja de sustancias, sus efectos en el organismo son de origen multifactorial, por lo que un simple inhibidor, o droga, no es suficiente para contrarrestarlos. (Córdoba y Guadamuz, 1999).

La búsqueda de inhibidores que permitan disminuir el daño local provocado por la hemorragia y el edema, no solo contribuiría a la ayuda ya indispensable del suero antiofídico si no a disminuir la carga de daños colaterales que los efectos locales dejan en las víctimas de mordeduras de serpiente.

VIII. Conclusiones.

- + La toxicidad sistémica observada para el inhibidor doxiciclina al igual que para otros quelantes es a altas concentraciones de 100 mM y 200mM. Así mismo se puede considerar como segura la concentración de 50mM.
- + La doxiciclina, el cloruro de zinc y el clodronato son capaces de disminuir en altas concentraciones la hemorragia intradérmica causada por una dosis reto de veneno de 10DHM, sin embargo, esta inhibición se alcanza a dosis a las cuales se ha demostrado toxicidad sistémica.
- + Por el método de inyección independiente en músculo, solo el cloruro de zinc logró inhibir la hemorragia causada por el veneno de *B. asper* en un 58%. La doxiciclina y el clodronato no lograron una inhibición por encima de este porcentaje.
- + La mezcla de inhibidores doxiciclina o cloruro de zinc y veneno, producen mayor edema que el observado para el control de solo veneno (5µg/50µl), por lo que estos no pueden ser utilizados con el objetivo de disminuir este efecto local producido por el veneno de *B. asper*.
- + El clodronato es capaz de disminuir el edema inducido por el veneno una hora después de la inyección de una mezcla de clodronato y veneno, siendo más efectiva la concentración de 50mM. Además esta mezcla no induce edema.
- + La administración in situ de inhibidores luego del accidente ofídico, puede servir de complemento para la terapia con antivenenos, dando un nuevo enfoque a la terapia del envenenamiento por veneno de Vipéridos.

IX. Bibliografía

- Arvelo, F. y Cotte, C. (2006) **Metaloproteasas en la progresión tumoral.** Revisión. Invest. clín v.47 n.2.
- Bjarnason, J.B., Fox, J. W. (1995). **Snake venoms metalloproteinases: reprotolysins.** Methods Enzymol. 248: 345-368
- Brunton, L., Lazo, J., Parker, K. (2007). **Goodman and Gilman: las bases farmacológicas de la terapéutica.** 11ª ed. Mc Graw Hil, pp1173-1178, 1666-1668.
- Campbell, J.A. y W, Lamar. (1989). **The venomous reptiles of Latin America.** Comstock, Ithaca.
- Chavez, F., (1992). **Cambios fisiopatológicos y bioquímicos inducidos en ratones inoculados con los venenos de serpientes recién nacidas y adultas de *Bothrops asper*.** Magíster Scientiae Thesis. Universidad de Costa Rica. San José Costa Rica.
- Chavez F., Barboza, M., Gutierrez, JM. (1995) **Pharmacological study of edema induced by venom of snake *B. asper* (Terciopelo).** Toxicol; 33:31-39.
- Chipaux, JP., (1998). **Snake bites: appraisal of the Global Situation.** Bulletin of the World Health Organization. 76 (5): 515-524.
- Córdoba, F., Guadamuz, L. (1999) **Evaluación de la inhibición del edema y de la hemorragia inducidos por el veneno de *Bothrops asper* utilizando extractos de plantas del género *Phenax*.** Tesis de Licenciatura en Farmacia. Universidad de Costa Rica. San José Costa Rica.
- Diel, J., Jaschke, A., Solomayer, E. F., Gollan, C., Bastert, G., Sohn, C., y Schuetz F. (2008) **Adjuvant oral clodronate improves the overall survival of primary breast cancer patients with micrometastases to the bone marrow—a long-term follow-up.** Annals of Oncology Oxford University Press. 19(7) doi:10.1093/annonc/mdn429.
- Doherty, G., y Way, L. (2006). **Chapter 8. Inflammation, Infection, & Antimicrobial Therapy.** Doherty GM, Way LW: CURRENT Surgical Diagnosis and Treatment 12th Edition.
- Escalante, T., Franceschi, A., Ruvocado, A., Gutierrez, JM. (2000). **Effectiveness of batimastat, a sintetic inhibitor of matriz metalloproteinases, in neutralizing local tissue damage induced by BaP1, a hemorragia metalloproteinase from the venom of snake *Bothrops asper*.** Biochem. Pharmacol. 267 (16) 5191-5197.

- Farsky, SHP., Antunes, E., Mello, SBV. (2005) **Pro and anti-inflammatory properties of toxins from animal venoms**. *Curr Drug Targ-Inflamm and Alleg*; 4:401-411.
- Fox, J., Serrano, S. (2005). **Structural considerations of snake venom metalloproteinases, key members of the M12 reprotolysin family of metalloproteinases**. *Toxicon* 45: 969-985.
- Franceschi, A., (1999). **Metaloproteinasas del Veneno de Serpiente Bothrops asper (Tercipelo): Aislamiento, Caracterización Bioquímica y Neutralización**. Magíster Scientiae Thesis. Universidad de Costa Rica. San José Costa Rica.
- Golub, LM., Lee, HM., Ryan, ME., Giannobile, WV., Payne, J., Sorsa, T. (1998). **Tetracyclines inhibit connective tissue breakdown by multiple non-antimicrobial mechanisms**. *Adv Dent Res* 1998, 12:12-26.
- 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* 23, 887-893.
- Gutiérrez, JM. (1995). **Clinical toxicology of snakebite in Central America**. In: Meier J, White J (Editors), *Handbook of clinical toxicology of animal venoms and poisons*. Boca Raton: CRC Press; 1995. p 645-665.
- Gutiérrez, JM., Leon, G., Rojas, G., Lomonte, B., Rucavado, A., Chavez, F. (1998) **Neutralization of local tissue damage induced by Bothrops asper (terciopelo) snake venom**. *Toxicon*, 36: 1529-1539.
- Gutiérrez, JM., Rucavado, A, (2000) **Snake venom metalloproteinases: Their role in the pathogenesis of local tissue damage**. *Biochemie* 82:841-850.
- Gutiérrez, JM. (2002). **Comprendiendo los venenos de serpientes : 50 años de investigaciones en America Latina**. *Rev. Biol. Trop.* 50 , 377-394.
- Gutiérrez, J.M., Lomonte, B.,(2003). **Efectos locales en el envenenamiento Ofídico en América Latina**. In: Cardoso, J.L.C., Franca, F.O.S., Wen, F.H., Malaque, C.M.S., Haddad, V. (Eds.), *Animais Peconhentos no Brasil. Biologia, Clinica e Terapeutica dos Acidentes*. Sarvier, Sao Paulo, pp. 310– 323.
- Gutierrez, JM., Rucavado, A., Escalante, T., Díaz, C.(2005) **Hemorrhage induced by snake venom metalloproteinases: biochemical and biophysical mechanism involved in microvessel damage**. *Toxicon*; 45:997-1011.

- Gutierrez, JM., Theakston, RDG., Warrel, DA. (2006). **Confronting the Neglected Problem of Snake Bite Envenoming: The Need for a Global Partnership**. PLOS Medicine. Vol 3. 6:727-731.
- Gutierrez, JM., Lomonte, B., León, G., Rucavado, A., Chavez, F., Angulo, Y. (2007), **Trends in snakebite envenomation therapy: scientific, technological and public health considerations**. Current Pharmaceutical Design. 13:2935-2950.
- Heikkila, P., Teronen, O., Hirn, MY., Sorsa, T., Tervahartiala, T., Salo, T., Konttinen, YT., et al.(2003). **Inhibition of matrix metalloproteinase-14 in osteosarcoma cells by clodronate**. J Surg Res; 111: 45-52.
- Henriquez, M. (2006). **Papel de los inhibidores sintéticos Melagatran, Clodronato, Doxiciclina y Cloruro de Zinc en la neutralización de los efectos fisiopatológicos inducidos por el veneno de *Bothrops asper* (Terciopelo)**. Tesis de Licenciatura en Microbiología y Química Clínica. Universidad de Costa Rica. San José, Costa Rica.
- Hewitt R.E., Lissina A., Green A.E., et al (2005), **The bisphosphonate acute phase response: rapid and copious production of proinflammatory cytokines by peripheral blood $\gamma\delta$ T cells in response to aminobisphosphonates is inhibited by statins**. British Society for Immunology. *Clinical and Experimental Immunology*, 139:101–111
- Howes, J.M., Theakston, R.D.G., Laing, G.D., **Neutralization of haemorrhagic activities of viperine snake venoms and venom metalloproteinases using synthetic peptide inhibitors and chelators.**, *Toxicon*; doi: 10.1016/j.toxicon.2006.11.020.
- Liu, J., Xiong, W., Baca-Regen, L., et al (2003). **Mechanism of Inhibition of matrix metalloproteinase-2 expression by doxycycline in human aortic smooth muscle cells**. *Journal of vascular Surgery* . 38 (6). 1376-1383.
- Lomonte, B., Tarkowski, A., Hanson, LA., (1993). **Host response to *Bothrops asper* snake venom. Analysis of edema formation, inflammatory cells, and cytokine release in a mouse model**. *Inflammation* 17: 93–105.
- Lu, Q., Clemetson, JM., Clemetson, KJ. (2005). **Snake venoms and hemostasis**. *J Thromb Haemost* 3: 1791–9.
- Luna-Bauza M. (2007) **Bases para el tratamiento por intoxicación por veneno de serpiente** Rev Fac Med UNAM Vol.50 No.5 Septiembre-October, 199.
- Matsui, T., Fujimura, Y., Titán, K., (2000). **Snake venom proteases affecting hemostasis and thrombosis**. *Biochimica et Biophysica Acta* 1477: 146-156.

- Otero, R., Tobón, G.S., Gómez, L.F., Osorio R.G., et al (1992). **Accidente ofídico en Antioquia y Chocó. Aspectos clínicos y epidemiológicos (marzo de 1989-febrero de 1990).** Acta Méd. Colombiana 17: 229-249.
- Ownby, Cl., Colberg, T., Odell, G.V., (1984). **A new Method for quantiting hemorrhage induced by rattlesnake venoms: ability of polyvalent antivenom to neutralize hemorrhagic activity.** Toxicon 22: 227-233.
- Rucavado, A., Escalante, T., Franceschi, A., Chávez, F., et al (2000). **Inhibition of local hemorrhage and dermonecrosis induced by *Bothrops asper* snake venom: effectiveness of early in situ administrations of the peptidomimetic metalloproteinase inhibitor batimastat and the chelating agent CaNa₂EDTA.** Am J Trop Med Hyg. 63 (5-6) : 313-319.
- Saarto, T., Vehmanen, L., Blomqvist, C., Elomaa, I. (2008) **Ten-Year Follow-Up of 3 Years of Oral Adjuvant Clodronate Therapy Shows Significant Prevention of Osteoporosis in Early-Stage Breast Cancer.** Journal of Clinical Oncology. 26 (26) 4289-4295.
- Sassa, M., Vazquez, S. (2003) **Snakebite envenomation in Costa Rica: a revision of incidence in the decade 1990–2000.** Toxicon 41:19–22.
- Souza, A.P., Gerlach, R.F., Line, S.R.P., (2001). **Inhibition of human gelatinases by metals released from dental amalgam.** Biomaterials 22 2025-2030.
- Suzuki, A., Sahoko, S., Shogo, A., Mitsuyasu, I. (2008). **Pharmacological Topics of Bone Metabolism: Recent Advances in Pharmacological Management of Osteoporosis.** J Pharmacol Sci 106, 530 – 535.
- Tahan, V., Sayrak, H., Bayar, N., Burak, E., et al (2008). **Doxycycline-induced ulceration mimicking esophageal cancer.** Cases Journal, 1:144.
- Tanvetyanon T P., Stiff, J. (2006), **Management of the adverse effects associated with intravenous bisphosphonates.** Annals of Oncology 17: 897–907.
- Teixeira, CFP., Landucci, ECT., Antunes, E., et al. (2003). **Inflammatory effects of snake venom myotoxic phospholipases A₂.** Toxicon; 42:947-962.
- Theakston, RDG. Warrell, DA. Griffiths, E. (2003). **Report of a WHO workshop on the standardization and control of antivenoms.** Toxicon 41: 541–557.
- Underwood, C.K., Min, D., Lyons, J.G., Hambley, T.W. (2003). **The interaction of metal ions and Marimastat with matrix metalloproteinase 9.** Journal of Inorganic Biochemistry 95 (2003) 165–170.

- Villalobos, J. (2008). **El envenamiento ofídico en animales del continente Americano: serpientes, venenos, patología y tratamiento.** Menevilla S.A.- Centro de Intoxicaciones en Animales. Heredia. Costa Rica.
- Wagstaff, S., Favreau, P., Cheneval, O., et al, (2008). **Molecular characterisation of endogenous snake venom metalloproteinase inhibitors.** Biochemical and Biophysical Research Communications 365: 650–656.
- Warrell, D.A. (1992). In: Gopalakrishnakone P, Tan CK Eds. **Recent advances in toxinology Research.** Singapore, National University of Singapore, 121-153.
- Warrell, D.A. (1996). **Clinical features of envenoming from snake bites,** In C. Bon & M. Goyffon (eds.). Envenomings and Their Treatments. Fondation Marcel Mérieux, Lyon. p. 64-76.
- Yamaguchi K., Motegi. K., Iwakura, Y., (2000). **Involvement of interleukin-1 in the inflammatory actions of aminobisphosphonates in mice.** British Journal of Pharmacology 130, 1646-1654.