

**ACTIVIDAD BIOLÓGICA DEL VENENO DE DOS ESPECIES DE  
SERPIENTES OPISTOGLIFAS DEL DEPARTAMENTO DEL TOLIMA**

**KRISTIAN ALBERTO TORRES BONILLA**

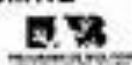
**Trabajo de grado presentado como requisito parcial para optar al título  
de Biólogo**

**Director**

**MANUEL HERNANDO BERNAL BAUTISTA. MSc. PhD.**

**UNIVERSIDAD DEL TOLIMA  
FACULTAD DE CIENCIAS  
PROGRAMA DE BIOLOGÍA  
IBAGUÉ – TOLIMA**

**2016**



FACULTAD DE CIENCIAS  
PROGRAMA DE BIOLOGÍA

ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TRABAJO DE GRADO

TÍTULO: Actividad Biológica Del Veneno De dos  
especies de serpientes epistegias del departamento  
del Tolima

AUTORES: Kristian Alberto Torres Bonilla

DIRECTOR: Márcel H. Bernal. B.

JURADOS: Walter Murolo  
Liliana Francis

CALIFICACIÓN: 6.0

APROBADO

REPROBADO

OBSERVACIONES:

---

---

---

FIRMAS

Trma  
JURADO 1.

[Signature]  
JURADO 2.

[Signature]  
Director del trabajo

[Signature]  
Director del programa

Ciudad y fecha: Ibague 15-Junio-2016.

*“A mis padres por todas las enseñanzas y apoyo que me brindaron y a mi novia por su cariño y compañía durante todo el proceso”.*

## AGRADECIMIENTOS

El autor de esta investigación desea expresar sus más sinceros agradecimientos a las siguientes personas:

Al profesor **Manuel Hernando Bernal B.**, de la Universidad del Tolima, por su dirección y asesoría durante el proceso investigativo.

Al estudiante tesista **James Herrán Medina** por su ayuda y asistencia técnica durante la investigación.

Al **Laboratorio de Ultra-estructura celular, acción de venenos en sistemas biológicos** de la Universidad Estadual de Campinas, por su apoyo en el desarrollo de este trabajo.

Al **Departamento de Farmacología** de la Universidad Estadual de Campinas, por su apoyo en el desarrollo de este trabajo.

Al **Grupo de Investigación en Herpetología, Eco-Fisiología & Etología** de la Universidad del Tolima, por su apoyo en el desarrollo de este trabajo.

A la **Oficina de Investigaciones y Desarrollo Científico** de la Universidad del Tolima, por la financiación de esta investigación, mediante el proyecto: 1230213.

A la **Corporación Autónoma Regional del Tolima “CORTOLIMA”**, por expedir el permiso de investigación científica en diversidad biológica (Resolución N° 2886 de 2011) necesario para el desarrollo de este trabajo.

## CONTENIDO

	<b>Pág.</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	14
<b>1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA</b> .....	15
<b>2.OBJETIVOS</b> .....	16
2.1OBJETIVO GENERAL.....	16
2.2OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	16
<b>3.ESTADO DEL ARTE</b> .....	17
3.1FAMILIA COLUBRIDAE.....	17
3.2GLÁNDULA DE DUVERNOY.....	17
3.3 VENENO Y TOXINAS.....	20
3.3.1 Neurotoxicidad .....	21
3.3.2 Miotoxicidad .....	22
3.3.3 Actividad enzimática.....	22
3.4 SINAPSIS NEUROMUSCULAR.....	23
3.4.1 Potencial de membrana en reposo.....	25
<b>4. METODOLOGÍA</b> .....	26
4.1 ESPECIES DE ESTUDIO.....	26
4.1.1 <i>Leptodeira annulata</i> .....	26
4.1.2 <i>Erythrolamprus bizona</i> .....	26
4.2 ZONA DE COLECTA.....	27
4.2.1 Centro Universitario Regional del Norte (CURDN).....	27
4.3 MÉTODOS DE EXTRACCIÓN DEL VENENO.....	28
4.3.1 Extracción con microcapilares.....	28

4.4 DETERMINACIÓN DE LA TOXICIDAD DEL VENENO.....	29
4.4.1 Dosis letal media (DL <sub>50</sub> ) de los venenos en ratones.....	29
4.5 ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS.....	29
4.5.1 Actividad Esterásica.....	29
4.5.2 Actividad Proteolítica.....	30
4.5.3 Actividad Fosfolipasa A <sub>2</sub> .....	30
4.6 ACTIVIDAD NEUROMUSCULAR.....	30
4.6.1 Efectos neuromusculares en Biventer cervicis de pollo.....	30
4.6.2 Efectos neuromusculares en hemidiafragma de ratón.....	31
4.7 ANÁLISIS MORFOLÓGICOS.....	34
4.7.1 Histología de músculo esquelético de pollo y ratón.....	34
4.8 ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	35
<b>5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>36</b>
5.1 MÉTODOS DE EXTRACCIÓN.....	36
5.1.1 Extracción con microcapilares.....	36
5.2 TOXICIDAD DE LOS VENENOS.....	37
5.2.1 Dosis letal media (DL <sub>50</sub> ) en ratones.....	37
5.3 ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS.....	38
5.3.1 Actividad Esterásica.....	38
5.3.2 Actividad Proteolítica.....	38
5.3.3 Actividad Fosfolipasa A <sub>2</sub> .....	38
5.4 ACTIVIDAD NEUROMUSCULAR.....	39
5.4.1 Efectos neuromusculares en Biventer cervicis de pollo.....	39
5.4.2 Efectos neuromusculares en hemidiafragma de ratón.....	42
5.5 ANÁLISIS MORFOLÓGICOS.....	44
5.5.1 Histología de músculo esquelético de pollo y ratón.....	44
<b>6. CONCLUSIONES.....</b>	<b>49</b>

**RECOMENDACIONES.....50**

**REFERENCIAS.....51**

## LISTA DE TABLAS

**Tabla 1.** Actividades enzimáticas del veneno de *Leptodeira annulata* y *Erythrolamprus bizona*.....46

**Tabla 2.** Registro del potencial de membrana en reposo en preparaciones de músculo de ratón expuestas al veneno de *L. annulata* (30 µg/ml).....54



## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Anatomía de la glándula de Duvernoy. Tomado y modificado de Kardong, (2002).....23
- Figura 2.** (A) Glándula de Duvernoy (basada en *B. irregularis*), localizada en la región temporal, desemboca en una serie de tejidos que rodean los dientes maxilares. (B) Ampliación de la posición del conducto principal (Md) Desembocando dentro de la cavidad del epitelio oral (Pk) Alrededor de la base de los dientes maxilares posteriores (F); epidermis (Ep) y canal de secreción (G). Tomado y modificado de Kardong, (2002).....24
- Figura 3.** Especies de estudio. **A)** *Leptodeira annulata*; **B)** *Erythrolamprus bizona*.....34
- Figura 4.** Ubicación del Centro Universitario Regional del Norte (CURDN). Sitio de colecta de los ejemplares de *L. annulata* y *E. bizona*. Tomado de [https://es.wikipedia.org/wiki/Armero\\_Guayabal](https://es.wikipedia.org/wiki/Armero_Guayabal).....35
- Figura 5.** Extracción del veneno con microcapilares.....36
- Figura 6.** Disección del músculo Biventer cervicis de pollo.....39
- Figura 7.** Disección del nervio frénico y hemidiafragma de ratón.....40
- Figura 8.** Monitoreo y registro de las contracciones musculares.....41
- Figura 9.** Proceso de obtención del potencial de membrana en reposo de músculo de ratón.....41

**Figura 10.** Inclusión en parafina de los músculos para análisis histológicos.....42

**Figura 11.** Realización de los cortes en micrótopo para histología.....43

**Figura 12.** Microscopio óptico para observación de los cortes histológicos.....43

**Figura 13.** Actividad neuromuscular del veneno de *L. annulata* en Biventer cervicis de pollo. A. Bloqueo neuromuscular inducido por el veneno en diferentes concentraciones; no fue observado un bloqueo total después de 120 min de incubación. B. Contracturas musculares a ACh y KCl exógeno después de 120 min de incubación expresadas como el porcentaje de la respuesta observada en las preparaciones control. C. Registro representativo mostrando el bloqueo causado por el veneno de *L. annulata* bajo estimulación indirecta a 37 °C. Nótese que las respuestas en la contractura a ACh (110 µM, ▲) y KCl (40 mM, ■) exógeno fueron alteradas por el veneno. Los puntos en A y columnas en B son la media ± error (n=4); \*p<0.05 comparadas al control.....50

**Figura 14.** Actividad neuromuscular del veneno de *E. bizona* en Biventer cervicis de pollo. A. Bloqueo neuromuscular inducido por el veneno en diferentes concentraciones; no fue observado un bloqueo total después de 120 min de incubación. B. Contracturas musculares a ACh y KCl exógeno después de 120 min de incubación expresadas como el porcentaje de la respuesta observada en las preparaciones control. Los puntos en A y columnas en B son la media ± error (n=4); \*p<0.05 comparadas al control.....51

**Figura 15.** Potencial de membrana en reposo y actividad neuromuscular del veneno de *L. annulata* en preparaciones de nervio frénico-hemidiafragma de ratón. A. Medición del potencial de membrana en reposo en preparaciones

expuestas al veneno de *L. annulata* (30 µg/ml). B. Bloqueo neuromuscular inducido por el veneno (30 µg/ml). Los puntos en A y B en las figuras representan la media ± error (n=4); \*p<0.05 comparada a los valores basales (en A) y el control (en B); (#) en A indica que la despolarización inducida por Carbacol (Cch, 68.5 mM) fue estadísticamente diferente a t<sub>120</sub> min; (w) – post-lavado.....53

**Figura 16.** Alteraciones histológicas del músculo inducidas por el veneno de *L. annulata* en preparaciones de Biventer cervicis de pollo. E- fibras con edema, V- fibras vacuolizadas, N- fibras con necrosis, D- lesiones delta. Tinción con Hematoxilina-Eosina, (400x).....56

**Figura 17.** Alteraciones histológicas del músculo inducidas por el veneno de *E. bizona* en preparaciones de Biventer cervicis de pollo. E- fibras con edema, N- fibras con necrosis, D- lesiones delta. Tinción con Hematoxilina-Eosina, (400x).....57

**Figura 18.** Morfología del músculo (hemidiafragma de ratón) incubado con el veneno de *Leptodeira annulata* (30 µg/ml) durante 120 min. E- fibras con edema, N- fibras necróticas, D- lesiones delta. Tinción con Hematoxilina-Eosina. (400x).....58