

AÑO

2021



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL NORDESTE
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES
Y AGRIMENSURA
LICENCIATURA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

TRABAJO FINAL DE GRADUACIÓN

POTENCIA NECROTIZANTE DEL VENENO DE EJEMPLARES
JUVENILES DE *Bothrops alternatus* (SERPENTES:
VIPERIDAE: CROTALINE) EVALUADA EN MÚSCULO DE
RATÓN

AUTORA: GONZÁLEZ, KAREN YAMILA
DIRECTORA: GARCIA DENEGRI, MARÍA EMILIA
CODIRECTORA: TEIBLER, GLADYS PAMELA

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS	2
1. RESUMEN.....	3
2. INTRODUCCIÓN.....	4
2.1. Taxonomía	4
2.2. Dentición	4
2.3. Serpientes en Argentina	5
2.4. Intoxicación ofídica	5
2.5. Enzimas del veneno.....	6
2.6. <i>Bothrops alternatus</i>	7
2.7. Variabilidad ontogénica.....	8
3. OBJETIVOS GENERALES Y PARTICULARES	9
4. HIPÓTESIS	9
5. MÉTODOS, TÉCNICAS Y ACTIVIDADES.....	9
5.1. Ensayos <i>In Vivo</i>	10
5.1.1. Determinación de la Dosis Letal Media (LD_{50} i.m.) intramuscular:.....	10
5.1.2. Análisis Histológico	11
5.2. Ensayos <i>In Vitro</i>	12
5.2.1. Citotoxicidad sobre cultivo de líneas celulares	12
5.2.2. Hemólisis radial indirecta	12
5.2.3. DETERMINACIÓN DEL TIEMPO PROTROMBINA SOBRE PLASMA.....	13
5.2.4. Método de inmunodifusión de Oucherlony	13
5.2.5. Análisis Estadístico	13
6. RESULTADOS	14
6.1. Ensayos in vivo	14
6.1.1. Determinación de la Dosis Letal Media (LD_{50} i.m.) intramuscular.....	14
6.1.2. Actividad Miotóxica. Análisis Histológico	15
6.2. Ensayos <i>In Vitro</i>	18
6.2.1. Citotoxicidad sobre cultivo de línea celular C2C12.....	18
6.2.2. Hemólisis radial indirecta	19
6.2.3. Determinación del tiempo de protrombina en plasma	19
6.2.4. Método de Inmunodifusión de Ouchterlony	20
7. DISCUSIÓN.....	21
8. CONCLUSIÓN.....	24
9. BIBLIOGRAFIA.....	25
EXPOSICIÓN SINTÉTICA DE LA LABOR REALIZADA	30
Obstáculos y dificultades en el desarrollo del plan de trabajo	31
EVALUACIÓN ACADÉMICA DEL DIRECTOR Y CODIRECTOR.....	32

AGRADECIMIENTOS

A la Facultad de Ciencias Exactas, Naturales y Agrimensura de la Universidad Nacional del Nordeste, que me aceptó y permitió formarme durante el transcurso de la carrera, y a todos los docentes que formaron parte, brindándome sus conocimientos viéndose reflejados en la culminación de mi paso por la Universidad.

A mis directoras las doctoras María Emilia y Pamela, por haberme dado la oportunidad de realizar mi trabajo final de graduación junto a ellas, transmitiéndome sus conocimientos y dedicándome su tiempo para enseñarme todo lo que desconocía, con toda la paciencia que esto requiere para el desarrollo de este trabajo. También a Matías, bioquímico parte del equipo, gran profesional y excelente persona. Y finalmente a la médica veterinaria Luly gran compañera de la que aprendo día a día. No me alcanzan las palabras por todo lo que hicieron y hacen por mí.

Al Tribunal Examinador por el tiempo que se tomaron al redactar sus correcciones y aportes, logrando que éste trabajo mejore.

A la cátedra de Farmacología y Toxicología de la Facultad de Ciencias Veterinarias junto a su personal, por haberme abierto sus puertas y permitido ser parte del equipo, brindándome todas las herramientas necesarias para poder llevar a cabo mi trabajo final. Asimismo, a la directora Dra. Laura Leiva e investigadores del LabInPro (FaCENA) y a la Dra. Soledad Bustillo (Dir. Laboratorio de Cultivos Celulares) por ayudarme en la realización de los ensayos *in vitro* y guiarme en su interpretación.

A CISVA (Centro Interactivo de Serpientes Venenosas de Argentina) este hermoso grupo, en donde pude aprender más sobre estos hermosos animales y el respeto que los mismos merecen.

A quienes recorrieron la carrera junto a mí, mis compañeros de estudio y amigos, siempre me dieron las fuerzas necesarias para seguir adelante. A Anto con quien compartí desde los primeros días de cursada, ella mi mayor crítica. A Manu el ñoño que mejor enseña, A compañeros increíbles que poco a poco se hicieron amigos, que tuvieron que sufrir mis ejemplos explicativos con pizzas Guille, Rodri, Debora, Florqui, Pau, y Juli. A ellos que siempre estuvieron para correcciones Flor, María, Cristian. A vos Patito, Fede, Nico que siempre están ahí para contenerme. A mi niño desde el primer día Josesito. A mis amigos que hoy ya están lejos. A vos Magui por tolerar mis momentos de estrés. Todos ellos día a día sacan lo mejor de mí, apoyándome o tirándome de la oreja.

A mi familia, quienes me inculcaron desde siempre a ser una profesional.

Karen Yamila González

1. RESUMEN

En este Trabajo Final de Grado se evaluó bioquímica y biológicamente el veneno de serpientes juveniles de la especie *Bothrops alternatus* del nordeste argentino. Para ello se realizaron ensayos *in vivo* e *in vitro* al veneno de ejemplares con longitud rostro-cloaca o SVL^(*) de ~30 cm.

El veneno entero fue evaluado en su potencia letal por la vía intramuscular. Se calculó, con base en la metodología descrita por Randhawa (2009), la LD₅₀ (i.m.) que arrojó un valor de 6.9 µg/g. Además, la acción miotóxica local fue estudiada y analizada bajo MO a fin de observar las lesiones deletéreas sobre las fibras musculares de gastrocnemio de ratón. Se corroboró mionecrosis en el sitio de la inoculación más manifiesta luego de 3 h, observándose además zonas de desorganización fibrilar, edema e intensa hemorragia. Esta capacidad miotóxica fue corroborada *in vitro* cuando se utilizó la línea muscular C2C12, específica para visualizar la acción de familias de proteínas de fosfolipasas A₂ y metaloproteasas típicas de la intoxicación botrópica.

Además, el veneno de individuos juveniles exhibió actividad hemolítica indirecta sobre glóbulos rojos y acción coagulante, efectos principales involucrados en la fisiopatología del envenenamiento por *Bothrops*.

Los antivenenos de uso comercial antibotrópico y bivalente, producidos en caballos a partir de dosis subletales de veneno completo de ejemplares adultos en todos los casos, presentaron una sola banda de precipitación frente al veneno de juveniles. Sin embargo, se observaron dos bandas nítidas de precipitación cuando se los enfrentó al veneno de serpientes adultas. Esta respuesta diferencial podría ser como consecuencia de la expresión de isoformas o variantes de las proteínas expresadas en las juveniles, que luego se modificarán en la composición venómica de las serpientes adultas. En este sentido, es natural que algunas características del envenenamiento botrópico puedan desaparecer o reducirse a lo largo del desarrollo del animal.

Todos estos hallazgos ponen en evidencia que la diversidad ontogenética de los venenos botrópicos puede verse reflejada en su actividad biológica en la presa y en el envenenamiento animal y/o humano.

Por ello, resulta de interés ampliar la caracterización de veneno de serpientes juveniles del género *Bothrops* dado que la variación intraespecífica es particularmente notoria en las especies que poseen una distribución geográfica muy amplia y ocurren cambios importantes en la composición de sus venenos durante la transición desde su etapa neonatal a la juvenil y adulto.

2. INTRODUCCIÓN

2.1. TAXONOMÍA

Las serpientes, también llamadas ofidios, conforman el suborden Serpentes, pertenecientes al orden Squamata, al superorden Lepidosauria (lagartos con escamas), a la subclase Diápsida y a la clase Saurópsida (Gomez 2018).

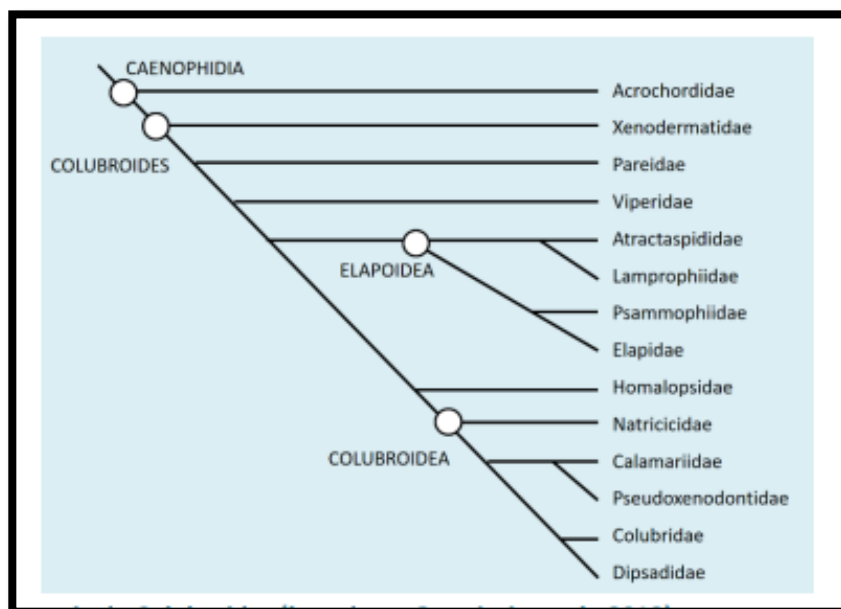


Figura 1: Filogenia de Colubroídes (basada en Graziotin et al., 2012). Extraído de: (Montero & Autino 2018)

Serpentes comprende a dos grandes grupos, Scolecophidia y Alethinophidia. Dentro de Alethinophidia también se reconoce como grupo monofilético a Caenophidia, formado por Colubroides y Acrochordidae (Lawson *et al.* 2005; Zaher *et al.* 2009). Dentro de los grupos actualmente reconocidos como Colubroides, se encuentran otros grupos que tienen una distribución mucho más amplia: Viperidae, Elapidae, también agrupa a Colubroidea en donde podemos encontrar cinco familias entre ellas: Colubridae (*sensu stricto*) y Dipsadidae, que es un grupo exclusivo de América, en contraste con otros grupos de distribución restringida principalmente en sudeste de Asia, África y Medio oriente.

2.2. DENTICIÓN

La dentición de Colubroides es muy variada. El aparato típico de la familia Viperidae es de tipo solenoglifo el cual presenta un colmillo con un conducto cerrado para la inoculación del veneno y tienen un sistema complejo para girar el maxilar plegando el colmillo hacia atrás. Es importante aclarar que las glándulas de veneno de Viperidae (y Elapidae) son homólogas a las glándulas de Duvernoy aunque anatómicamente y funcionalmente distintas. Las glándulas de Duvernoy se diferencian de las salivales tanto por sus características histológicas como por su origen embriológico (Montero y Autino 2018). La familia Viperidae consta de 4 subfamilias, entre ellas, la más representativa de nuestro país es Crotalinae.

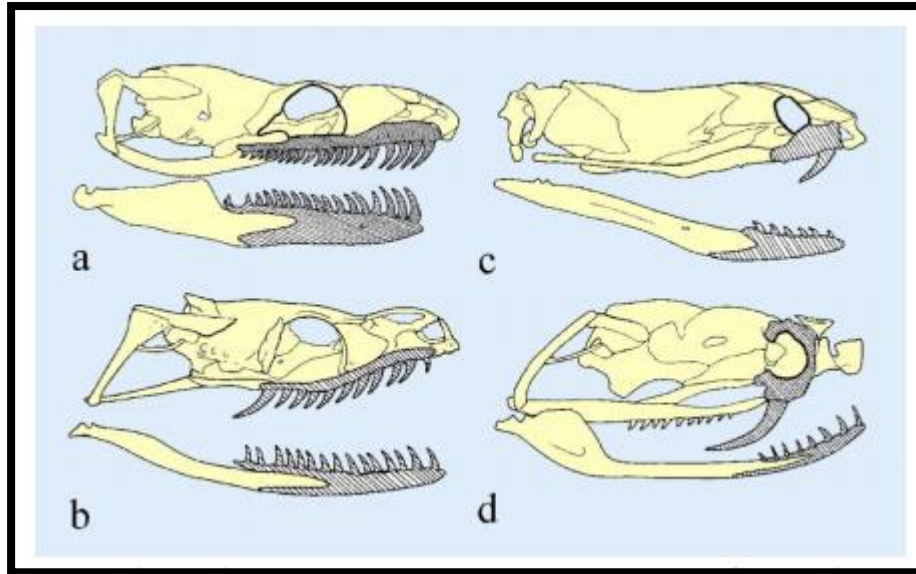


Figura 2: Dentición en ofidios; sombreados el maxilar y el dentario a) Dentición homodonta y aglifa: *Epicrates alvarezii*. Dentición glifodontas: b) Dentición opistoglifa: *Philodryas baroni*, c) Dentición proteroglifa: *Micrurus pyrrhocryptus*, d) Dentición solenoglifa: *Bothrops diporus*. Extraído de:(Montero & Autino 2018)

2.3. SERPIENTES EN ARGENTINA

Nuestro país, ubicado en la porción austral de América del Sur, está habitado por 136 especies de serpientes, la mayoría de las cuales no son venenosas o carecen de aparatos de inoculación (Giraudó *et al.* 2012; Orduna *et al.* 2007). Las familias que se pueden encontrar son: Typhlopidae, Leptotyphlopidae, Anomalepididae, Boidae, Colubridae, Viperidae y Elapidae (Williams *et al.* 2021) siendo estas dos últimas las principales responsables de los accidentes ofídicos con predominio de tres géneros, *Bothrops*, *Crotalus* y *Micrurus* (de Titto *et al.* 2017) . Del total de serpientes encontradas en Argentina, sólo dieciocho de ellas son venenosas (*Bothrops*: 10 especies; *Crotalus*: 1 especie; *Micrurus*: 7 especies) (Giraudó 2014).

En su mayoría están distribuidas sólo marginalmente en pequeñas porciones del norte, mientras que cinco especies lo hacen más ampliamente como *Bothrops alternatus*, *Bothrops ammodytoides*, *Bothrops diporus*, *Crotalus durissus terrificus* y *Micrurus pyrrhocryptus*. Estas cinco especies causan casi el 99% de las intoxicaciones ofídicas que ocurren en nuestro país (alrededor de 1.500 casos reportados en los últimos 3 años) y son, por lo tanto, consideradas de relevancia médica-sanitaria (Nori *et al.* 2014).

2.4. INTOXICACIÓN OFÍDICA

Las mordeduras por estos animales venenosos constituyen los accidentes ofídicos o envenenamientos, responsables de una de las causas de morbimortalidad a nivel mundial (Quesada Aguilera 2012). El género *Bothrops* se caracteriza por producir dolor, necrosis muscular, edema, alteraciones

hemostáticas y de la cascada de la coagulación, alteraciones cardiovasculares (Ávila *et al.* 2018; Fan y Cardoso 2008; Gutiérrez *et al.* 1995a; Ortiz Prado *et al.* 2015; Otero *et al.* 1992) e hipotensión (Ruiz de Torrent *et al.* 2000), pero sus tres acciones principales son la actividad proteolítica o inflamatoria aguda, hemorrágica y coagulante (Orduna *et al.* 2007)

Esta sintomatología y, por lo tanto, la toxicidad del veneno de *B. alternatus* está asociada a la presencia de proteínas y péptidos que pertenecen a unas pocas familias de enzimas, como metaloproteinasas, serinoproteinasas, L-aminoácido oxidasas, fosfolipasas A₂ y enzimas tipo trombina, entre otras (Ávila *et al.* 2018).

2.5. ENZIMAS DEL VENENO

Algunas de las proteínas y péptidos enzimáticos constituyentes del peso seco de los venenos de serpientes, poseen una gran variedad de actividades biológicas y que son de gran interés para la ciencia debido a que pueden presentar actividades farmacológicas interesantes (Munawar *et al.* 2018). Entre los componentes tóxicos comúnmente asociados al envenenamiento por el género *Bothrops* se incluyen enzimas tales como:

Fosfolipasa A₂ (PLA₂). Es uno de los componentes más frecuentes en los venenos de serpiente (Zambelli *et al.* 2017). Representando un 7,8% del veneno total en *B. alternatus* (Öhler *et al.* 2010). Tiene actividad hidrolítica sobre los fosfolípidos, participando en muchos procesos fisiopatológicos, como la inflamación y el dolor. Además, produce neurotoxicidad pre- o post- sináptica, miotoxicidad, cardiotoxicidad, inhibición de la agregación plaquetaria, edema, anticoagulación, convulsiones e hipotensión. Posee también acción bactericida (Zambelli *et al.* 2017).

L-amino ácido oxidasa (LAAO). Constituye el 6,9 % de la composición total del veneno de *B. alternatus* (Olher *et al.*, 2010). La presencia de las LAAO sugiere efectos apoptóticos del veneno. De hecho, el reordenamiento del citoesqueleto y la muerte celular causados por el veneno de *B. alternatus* se encuentran medidados por el peróxido de hidrógeno lo que indicaría la participación de las LAAOs.

Enzimas proteolíticas. Pueden dividirse principalmente en dos grupos: metaloproteinasas y serinoproteasas (Zaqueo *et al.* 2014):

-Metaloproteinasas de veneno de serpiente (SVMP). Son componentes principales en la mayoría de los venenos de Crotalidae y Viperidae, (Markland y Swenson 2013). En *B. alternatus* son las toxinas más abundantes (43,1 % del veneno total) (Öhler *et al.*, 2010) lo que otorga un rol clave en el envenenamiento (Van de Velde 2018). Más aún, en esta especie, estas proteasas están representadas exclusivamente por aquellas de la clase P-III las cuales exhiben una gran variedad de actividades, incluyendo hemorragia, apoptosis, clivaje del factor de von Willebrand, inhibición de la agregación plaquetaria, activación de protrombina y del factor X de la cascada de la coagulación (Gay 2010).

-Serinoproteasa (SP). Son abundantes en los venenos de las serpientes de la familia Viperidae, y pueden constituir hasta el 20% de las proteínas totales de los venenos. Al igual que las metaloproteinasas, afectan al sistema hemostático a través de diferentes mecanismos (Zaqueo *et al.* 2014).

2.6. BOTHROPS ALTERNATUS

Este TFG se centra en el estudio del veneno de juveniles de la especie *Bothrops alternatus* del NEA. Es una de las especies de serpientes de distribución amplia no sólo en la provincia de Corrientes sino más específicamente en toda la región chaqueña, tanto oriental como occidental como algunas poblaciones marginales en la región paranaense o del espinal (Alvarez *et al.* 2002) y, por lo tanto, es la principal responsable de la mayoría de los accidentes ofídicos en animales y personas (Posada Arias 2015). Debido a su gran tamaño, la cantidad de veneno que puede producir e inocular es capaz de provocar accidentes de considerada gravedad (Rocco *et al.* 2013).

Esta serpiente puede presentar en estado adulto una longitud de 1,20m, pudiendo llegar a medir aproximadamente 2,00m; un peso aproximado de 3.2kg (Giraud *et al.* 2008) y un cuerpo robusto con una coloración de fondo marrón claro y una cabeza subtriangular prominente. En los flancos presenta una serie de 24-47 manchas redondeadas de color canela oscuro similares a la letra "C" (Meneghel, 1997). Generalmente, dentro de las manchas hay una cruz de tamaño variable. Gracias a este patrón recibe el nombre local de "víbora de la cruz" (Leynaud *et al.* 2006).

Al igual que todos los vipéridos de la subfamilia Crotalinae, presenta una característica exclusiva que es la de poseer fosetas termorreceptoras o loreal, situada entre los ojos y las narinas con funciones de termorregulación y orientación. (Navarrete Zamora *et al.* 2010). El nombre del género *Bothrops*, deriva de *bothros* que significa «fosa o foseta» y *ops* «rostro» y significa a grosso modo «con una fosa en el rostro» en referencia a la foseta termorreceptora. (Stazzonelli Sadir *et al.* 2018).



Figura 3: *Bothrops alternatus* A. individuo juvenil y B. individuo adulto.

2.7. VARIABILIDAD ONTOGÉNICA

Si bien el veneno de esta especie descansa sobre una amplia caracterización sobre su composición y acciones farmacológicas/biológicas (Gay *et al.* 2005; Öhler *et al.* 2010; Rocco *et al.* 2013; Van De Velde 2018), la variabilidad en la composición de los venenos de las serpientes del género *Bothrops* está relacionada a la filogenia, edad, sexo, distribución geográfica y dieta (García Denegri *et al.* 2019; Sousa *et al.* 2013; Williams *et al.* 2021).

Sin embargo, esa variabilidad está mayoritariamente relacionada con el nivel de expresión de cada grupo de toxina más que con la presencia o ausencia de las principales familias de proteínas del veneno. Incluso, dentro de una misma familia de toxinas puede también ocurrir variabilidad en su toxicidad por presencia de distintos motivos funcionales, incrementando así la diversidad de blancos que pueden ser afectados (Moura-da-Silva *et al.* 1996).

Esta variación intraespecífica es una característica permanente y probablemente inherente de la proteosíntesis altamente específica e influenciada por diversos factores ecológicos y evolutivos antes citados como el género, la edad, el sexo del animal, la estacionalidad, la distribución de presas, así como también por cambios ontogenéticos y evolutivos en genes que codifican toxinas y factores posgenómicos que afectan su expresión (Machado Braga *et al.* 2020). Entonces, la relevancia de la variabilidad en la composición del veneno debería también ser reflejada en su reactividad hacia el antiveneno y su eficacia (Machado Braga *et al.* 2020).

Es por ello que el interés sobre los venenos y/o enzimas de ofidios ha ido aumentando progresivamente ya que no solo se extraen, purifican y estudian sino, incluso, se comercializan estas biotoxinas como agentes activos (Waqar y Batool 2015) por sus posibles beneficios terapéuticos para la industria farmacéutica de uso humano y animal.

En este sentido, como objetivo para este plan de TFG se propuso estudiar el veneno de ejemplares juveniles menores a seis meses de edad de la especie *Bothrops alternatus*. Es relevante conocer el comportamiento del veneno de especímenes juveniles que permiten vislumbrar la composición proteica y por añadidura la valoración sobre posibles aplicaciones terapéuticas al evaluar las actividades biológicas *in vitro* e *in vivo* aquí ensayadas.

Los resultados obtenidos serán comparados con aquellos reportados para sus congéneres en estado adulto. Consideramos aquí juveniles (Fig. 3 A) a aquellos individuos en un estado pre-reproductivo, que implica que han alcanzado el plan corporal adulto (Fig. 3B) (Heyland *et al.* 2005) aunque con tamaño sustancialmente menor al que se ha señalado como máximo en una especie y que la mayoría de los sistemas son funcionales, especialmente la alimentación y locomoción (McEdward y Janies 1993).

3. OBJETIVOS GENERALES Y PARTICULARES

Objetivo General

- Evaluar el daño local en el músculo gastrocnemio de ratón desencadenado por el veneno entero de serpientes juveniles de *Bothrops alternatus*.

Objetivos específicos

- Caracterizar el veneno de *B. alternatus* juvenil mediante pruebas bioquímicas *in vitro*
- Caracterizar el veneno de *B. alternatus* juvenil mediante ensayos biológicos *in vivo*
- Evaluar la capacidad de los antivenenos bivalente y polivalente para reconocer el veneno de *B. alternatus* juvenil mediante inmunodifusión radial, tomando en cuenta que este veneno nose incluye en la mezcla antigénica utilizada en la inmunización de caballos

4. HIPÓTESIS

Los venenos de serpientes juveniles de *Bothrops alternatus* muestran un comportamiento diferencial en la expresión de las actividades biológicas respecto de ejemplares adultos de la misma especie.

5. MÉTODOS, TÉCNICAS Y ACTIVIDADES

Veneno y Antivenenos

Se consideró para este trabajo, serpientes juveniles de *B. alternatus(j)* a aquellos individuos en un estado pre-reproductivo, que implica que han alcanzado el plan corporal adulto (Heyland *et al.* 2005) aunque con tamaño sustancialmente menor (SVL de ~40 a 50 centímetros (Entiauspe-Neto *et al.* 2019; Martins *et al.* 2003) $35,2 \pm 3,5$ (Hatakeyama *et al.* 2021) al que se ha señalado como máximo en una especie (Fabrezi *et al.* 2017) y que la mayoría de los sistemas son funcionales, especialmente la alimentación y locomoción (McEdward y Janies 1993). En este trabajo los ejemplares contaban con un SVL de 32 ± 2 cm. (Fig. 4)

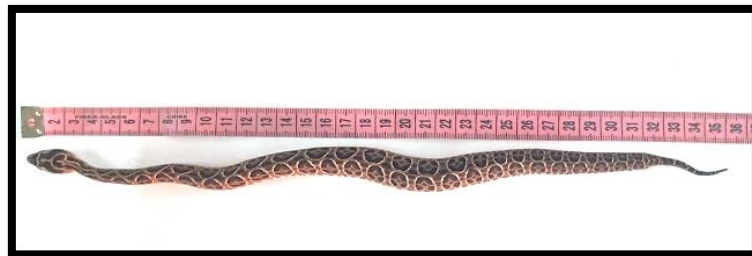


Figura 4: *Bothrops alternatus* juvenil siendo medida con un SVL de 32 ± 2 cm

Se utilizó un pool de veneno obtenido de manera manual y simultáneamente en todos los ejemplares de serpientes juveniles machos de *B. alternatus(j)* mantenidas en cautiverio en el Centro Interactivo de Serpientes Venenosas de Argentina (CISVA), Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional del Nordeste (Corrientes, Argentina), y de aquellas serpientes provenientes de los Departamentos de San Luis del Palmar, San Cosme, Empedrado y Capital. Por otro lado, también se trabajó con mezclas de venenos desecados de especímenes adultos de la misma especie mantenidos en cautiverio en CEPESAN (Centro Productor de Suero Antiofídico) de la ciudad de Corrientes. Ambos pools de venenos fueron desecados, homogeneizados y conservados a -20 C° . Al momento de utilizarlos fueron disueltos en buffer fosfato salino pH 7.2 (PBS). El material insoluble se separó por centrifugación, obteniéndose un sobrenadante límpido que se destinó a los ensayos.

Para evaluar la respuesta de los antiseros comerciales producidos a partir de la inmunización con veneno de serpientes adultas, los primeros fueron enfrentados a los inmunógenos del veneno de especies juveniles en un ensayo de doble inmunodifusión en gel para observar si hubiera reconocimiento parcial o total entre éstos. Se utilizó el Suero Antiofídico Polivalente "Bio" capaz de neutralizar los venenos de las víboras de cascabel (*Crotalus durissus terrificus*), yarará de la cruz (*B. alternatus*) y yarará ñata (*B. ammodytoides*) y yarará chica (*B. diporus*) y el Antiveneno Botrópico Bivalente destinado a neutralizar veneno ofídico de las especies *B. alternatus* y *B. diporus* (yarará chica). Este último es producido por el Laboratorio Central de Salud Pública (La Plata, Arg.) y establece que cada frasco-ampolla de 10 ml neutraliza 4,4mg de veneno de *B. alternatus* y 3,6 mg de *B. diporus* por cada mililitro del suero.

Animales

Se utilizaron ratones albinos machos de la cepa CF-1 (18-20 g) suministrados por el bioterio de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional del Nordeste (Corrientes, Argentina). Los animales se mantuvieron a temperatura de $23 \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$, a humedad relativa de 35 y 65% e iluminación con 12 horas con luz y 12 horas sin luz. Doce a catorce horas previas a la realización de cada uno de los experimentos se les retiró el alimento, dejando libre el acceso al agua.

Los ensayos se llevaron a cabo con el aval del Comité de Ética y Bioseguridad de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la UNNE bajo el número de Protocolo N° 070.

5.1. ENSAYOS *IN VIVO*

5.1.1. DETERMINACIÓN DE LA DOSIS LETAL MEDIA (LD_{50} i.m.) INTRAMUSCULAR:

La inoculación se realizó por vía intramuscular (i.m.), teniendo en cuenta que la mayoría de los accidentes ofídicos ocurren en cercanía a las extremidades (Carrasco 2013). De esta manera, se evaluó la potencia letal i.m. del veneno de *B. alternatus(j)* en músculo gastrocnemio de ratones de 18-20 g de peso ($n = 9$) para 3 dosis de veneno (4, 8, 12 $\mu\text{g/g}$), diluidos en un volumen final de 0.5 mL. Los ratones controles, recibieron 0.1 mL de solución salina (pH 7.2). Luego de 24 horas de la administración del veneno, se registró la supervivencia de ratones para cada dosis, siguiendo la metodología descrita por (Randhawa 2009).

La DL₅₀ se definió como la dosis de veneno que produjo la muerte del 50 % de los ratones del ensayo dentro de un período de 24h. El valor de dosis letal se calculó mediante análisis probit con 95% de confianza, para ello, se estimó el porcentaje de animales muertos mediante la tabla propuesta por Randhawa (2009). Los porcentajes de mortalidad para 100% y 0% debieron ser ajustados antes de asignar los valores de probits, de acuerdo al número de animales usados en el experimento (n = 3):

- Para 100% de muertes:

$$100 \times (1 - 0,25/N) / 100 \times (1 - 0,25/N)$$

- Para 0% de muertes:

$$100 \times (0,25/N) / 100 \times (0,25/N)$$

Tabla 1: Transformación de cálculo del porcentaje de mortalidad de ratones inoculados con el pool de veneno de *Bothrops alternatus(j)* a través del análisis de probit propuesto por Randhawa (2009).

%	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
0	-	2.67	2.95	3.12	3.25	3.36	3.45	3.52	3.59	3.66
10	3.72	3.77	3.82	3.87	3.92	3.96	4.01	4.05	4.08	4.12
20	4.16	4.19	4.23	4.26	4.29	4.33	4.36	4.39	4.42	4.45
30	4.48	4.50	4.53	4.56	4.59	4.61	4.64	4.67	4.69	4.72
40	4.75	4.77	4.80	4.82	4.85	4.87	4.90	4.92	4.95	4.97
50	5.00	5.03	5.05	5.08	5.10	5.13	5.15	5.18	5.20	5.23
60	5.25	5.28	5.31	5.33	5.36	5.39	5.41	5.44	5.47	5.50
70	5.52	5.55	5.58	5.61	5.64	5.67	5.71	5.74	5.77	5.81
80	5.84	5.88	5.92	5.95	5.99	6.04	6.08	6.13	6.18	6.23
90	6.28	6.34	6.41	6.48	6.55	6.64	6.75	6.88	7.05	7.33

5.1.2. ANÁLISIS HISTOLÓGICO

Con la finalidad de tener una valoración histológica del daño muscular inducido por el veneno entero, se inocularon grupos de ratones por vía intramuscular (n= 3) con una dosis subletal de veneno de *B. alternatus(j)* de 3.45 µg/g, equivalente a la mitad de la LD₅₀ i.m. obtenida en el ensayo anterior. En el grupo control (n= 5), se respetó los mismos tiempos que los animales tratados, recibiendo solución salina (pH = 7.2)

libre de veneno. Ambos grupos fueron sacrificados por dislocación cervical a las 1, 3, 6, 12 y 24 horas y se tomaron muestras del músculo gastrocnemio inyectado, las cuales se fijaron en formol tamponado y posteriormente procesados mediante técnica clásica de histopatología. Finalmente, se realizaron cortes histológicos de secciones de 5 µm de espesor, los cuales fueron teñidos con Hematoxilina- Eosina para su observación al microscopio óptico. Los músculos controles fueron procesados de idéntica manera.

Para el análisis histológico se tuvieron en cuenta como parámetros de miotoxicidad la presencia de fibras musculares necróticas, hemorragias miolíticas, coagulativas y mixtas según la clasificación en el método de (Homma & Tu 1971).

5.2. ENSAYOS *IN VITRO*

5.2.1. CITOTOXICIDAD SOBRE CULTIVO DE LÍNEAS CELULARES

Para los ensayos de citotoxicidad se utilizaron mioblastos indiferenciados obtenidos de monocapas subconfluentes. Las células resuspendidas se sembraron en placas de 96 pocillos, $1.5-2.5 \times 10^4$ células por pocillo, en el mismo medio de crecimiento DMEM-SFB (Medio Esencial Mínimo de Dulbecco - Suero Fetal Bovino) al 5%. Al alcanzar la monocapa un 80% de confluencia, diferentes concentraciones del veneno de *B.alternatus* juvenil y adulto (2.5, 5, 10 y 25 µg/mL) diluidos en el medio de cultivo suplementado con 5% de suero fetal bovino (SFB) fueron adicionados a las células en cultivo (200 µl/pocillo). Luego de tres horas de incubación a 37° C y 5 % de CO₂ en atmósfera húmeda, la viabilidad celular fue cuantificada por tinción con el colorante Cristal Violeta. Las células fueron observadas bajo Microscopio trinocular invertido Nikon Eclipse TS100.

La citotoxicidad se evaluó por comparación de las absorbancias resultantes de los pocillos con veneno de juvenil y adulto de *B. alternatus*, con la absorbancia promedio de los pocillos utilizados como control (sin veneno, considerados como 100% de viabilidad) y fueron expresados como porcentaje de viabilidad celular. Estos valores se graficaron versus las concentraciones de veneno ensayadas. Los experimentos se realizaron por triplicado.

5.2.2. HEMÓLISIS RADIAL INDIRECTA (Y DIRECTA)

Los venenos de serpientes presentan actividad fosfolipasa A₂ (PLA₂) que se puede detectar al actuar sobre la fosfatidilcolina, liberando lisofosfatidilcolina y un ácido graso; la lisofosfatidilcolina o lisolecitina tiene acción detergente, induciendo a lisis de glóbulos rojos. En la técnica se utilizó eritrocitos y fosfatidilcolina (yema de huevo) al que se agrega gel de agarosa. Se realizaron pocillos en el gel para colocar veneno de *B. alternatus*(j), de manera que se produce una difusión radial con lisis de los eritrocitos.

La capacidad de lisar glóbulos rojos por parte de las PLA₂ presentes en el veneno de modo indirecto, fue realizada en placas plásticas (135 x 80 mm) según método descrito por (Gutiérrez *et al.* 1988).

Para comprobar si el veneno de juveniles de la especie *B. alternatus* “yará grande” tiene acción hemolítica indirecta, se depositaron en las placas 25 mL de agar al 1 % en PBS (previamente fundido y enfriado a 50° C), 0.3 mL de PBS, 0.3 mL de glóbulos rojos lavados, 0.25 mL de CaCl₂ 0.01 M y 5 µg de azida sódica. Se dejó solidificar y se confeccionaron orificios de 3 mm de diámetro con sacabocados, aplicándose posteriormente 15 µL de solución de veneno de especímenes juveniles y adultos, a diferentes concentraciones

(0.0625, 0.125, 0,25, 0,5, 1 y 2mg/mL).

Uno de los orificios se utilizó como control negativo sembrándose 15 µl de PBS. Las placas se incubaron en cámara húmeda durante 20 h a 37° C, midiéndose (mm) luego los diámetros de los halos de hemólisis y registrando los mismos en una tabla. De idéntica manera, aunque en ausencia de la solución de yema, se ensayó la hemólisis radial directa.

5.2.3. DETERMINACIÓN DEL TIEMPO PROTROMBINA SOBRE PLASMA

Cincuenta µL del veneno de juvenil a diferentes concentraciones (0.0625, 0.125, 0.25, 0.5, 1 y 2mg/mL) y adulto (1mg/mL) de *B. alternatus* se agregaron a 100 µL de plasma humano citratado, registrándose los tiempos de coagulación a 37 °C en coagulómetro Fibrintimer (Wiener Lab). Valores superiores a 600 s, se consideran incoagulables.

5.2.4. MÉTODO DE INMUNODIFUSIÓN DE OUCHERLONY

Los venenos crudos de *B. alternatus* adultas y juveniles se analizaron por inmunodifusión en gel contra dos sueros, el antiofídico polivalente "Biol" y el antiveneno bothrópico bivalente del Laboratorio Central de Salud Pública (La Plata, Arg.) (frasco-ampolla de 10 ml donde cada mililitro neutraliza 4.4 mg de veneno de *B. alternatus*, 3.6 mg de *B. diporus*). La prueba de inmunodifusión se llevó a cabo sobre geles de agarosa al 1% en buffer fosfato 0.15M pH 7.0. Para ello, la agarosa fue disuelta en este buffer por calentamiento a 100 °C por 5 minutos y 3 ml de esta solución se extendieron en láminas portaobjetos dejándose enfriar durante 10 minutos. Luego se hicieron cuatro pocillos equidistantes de 5mm con una distancia de 1 cm entre sí.

En los distintos orificios enfrentados se sembraron 50 µl de suero antibotrópico bivalente, en otro de los pocillos laterales 50 µl de suero antibotrópico polivalente, mientras que en el extremo superior se colocó 50 µl de veneno crudo de *B. alternatus* juvenil (2mg/ml), en el otro extremo 50 µl del veneno *B. alternatus* adulto (2mg/ml). Las placas se mantuvieron en cámara húmeda a 4 °C y las lecturas de los resultados se efectuaron a las 24 - 72 h (Margni 1996).

5.2.5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Todos los experimentos fueron repetidos al menos 3 veces. La Dosis Letal Media intramuscular fue realizada siguiendo la metodología descrita por Randhawa (2009). La significancia de las diferencias entre las medias fue evaluada mediante ANOVA siguiendo el test de Dunnet para comparaciones múltiples entre grupos. Los valores de P menores a 0.05 fueron considerados significativos estadísticamente.

6. RESULTADOS

6.1. ENSAYOS IN VIVO

6.1.1. DETERMINACIÓN DE LA DOSIS LETAL MEDIA (LD₅₀ i.m.) INTRAMUSCULAR

Para valorar la letalidad del veneno de *B. alternatus* juvenil fueron inyectados vía i.m. ratones con diferentes dosis, desde 80 a 240 µg. Dosis tan altas como 80 µg del veneno total no fueron letales después de las 24 horas. Los datos del porcentaje de muertes luego de 24 h de la inoculación del veneno se muestran en la siguiente tabla:

Tabla 2: Valores de probits asignados en función del porcentaje de muertes de ratones CF1 para las distintas dosis de veneno de *B. alternatus(j)*. El porcentaje de mortalidad corregido se obtuvo aplicando las fórmulas anteriormente mencionadas.

Dosis(µg/g)	Log Dosis	Vivos	Muertos	% Mortalidad	Mortalidad corregido	Probit
4	0,60	3	0	0	8,33	3,61
8	0,90	1	2	66,67	66,70	5,43
12	1,08	0	3	100	91,67	6,39

Los valores obtenidos fueron representados en un gráfico de Probits vs Log Dosis a partir del cual se obtuvo el valor de la dosis para un probit de 5, equivalente a la LD50 (Fig.5). Del análisis de la ecuación de la recta se obtuvo un valor de LD50 de 6,9 µg/g ± 2,2 µg/g, con un coeficiente de correlación mayor a 0,99.

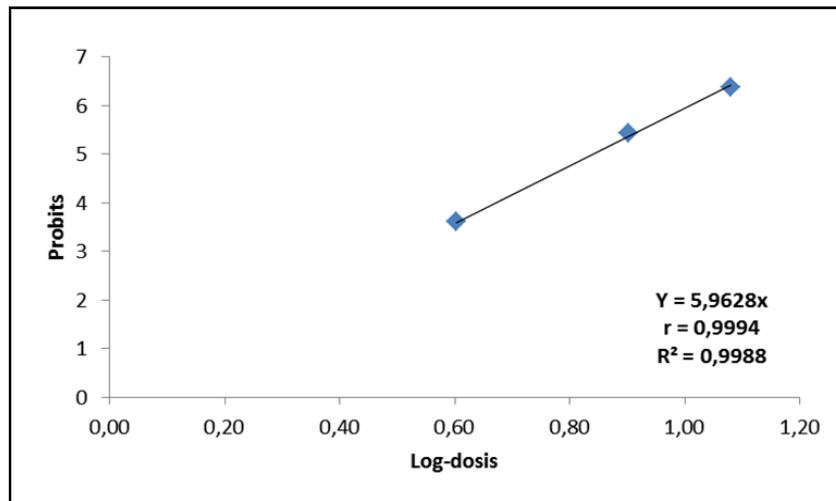


Figura 5: Representación gráfica de probits en función de Log Dosis. Se muestra el coeficiente de correlación (r) y determinación (R2) para los valores hallados.

6.1.2. ACTIVIDAD MIOTÓXICA. ANÁLISIS HISTOLÓGICO

OBSERVACIÓN MACROSCÓPICA

El análisis macroscópico de los músculos gastrocnemios de ratones inoculados con veneno mostró notoria diferencia de coloración y consistencia entre el músculo inoculado (miembro posterior derecho) y su contralateral, en los tiempos pos-inoculación de 1, 3, 6, 12 y 24 h. En los ratones controles, inoculados con solución fisiológica, no se observó alteración alguna (Fig. 6).



Figura 6: Observación macroscópica de los músculos inoculados y su contralateral a distintos tiempos de exposición del veneno de *B. alternatus(j)*.

ANÁLISIS MICROSCÓPICO

El tejido muscular de los grupos controles, observado microscópicamente, presentaron estructura normal conservada (Fig. 7A), en tanto las observaciones histológicas de muestras de músculos gastrocnemio obtenidas 1, 3, 6, 12 y 24 h post-inoculación con veneno de serpientes juveniles de *Bothrops alternatus* (Fig. 7B, C, D y E), a una dosis subletal correspondiente a la mitad de la LD₅₀ (i.m.) determinada en este trabajo, en solución de PBS mostró daño de las fibras musculares con actividad inflamatoria.

En los tejidos musculares correspondientes a 1 h post-inoculación del veneno, predominó la hemorragia interfascicular e interfibrilar, observándose algunas fibras musculares con necrosis. Tres horas post-inoculación, la mionecrosis fue aún más manifiesta, observándose además zonas de desorganización del material fibrilar, acompañado de edema, moderado infiltrado inflamatorio polimorfonuclear e intensa hemorragia. Luego de 6 h de la intoxicación, el cuadro inflamatorio aumentó como así también la necrosis muscular y hemorragia. Con respecto al tiempo de exposición de 12 h se observó desorganización en la disposición de las fibras musculares, infiltrado inflamatorio polimorfonuclear y disminución de los focos microhemorrágicos. Finalmente, a las 24 h la mionecrosis fue intensa al igual que el proceso inflamatorio, edema y hemorragia.

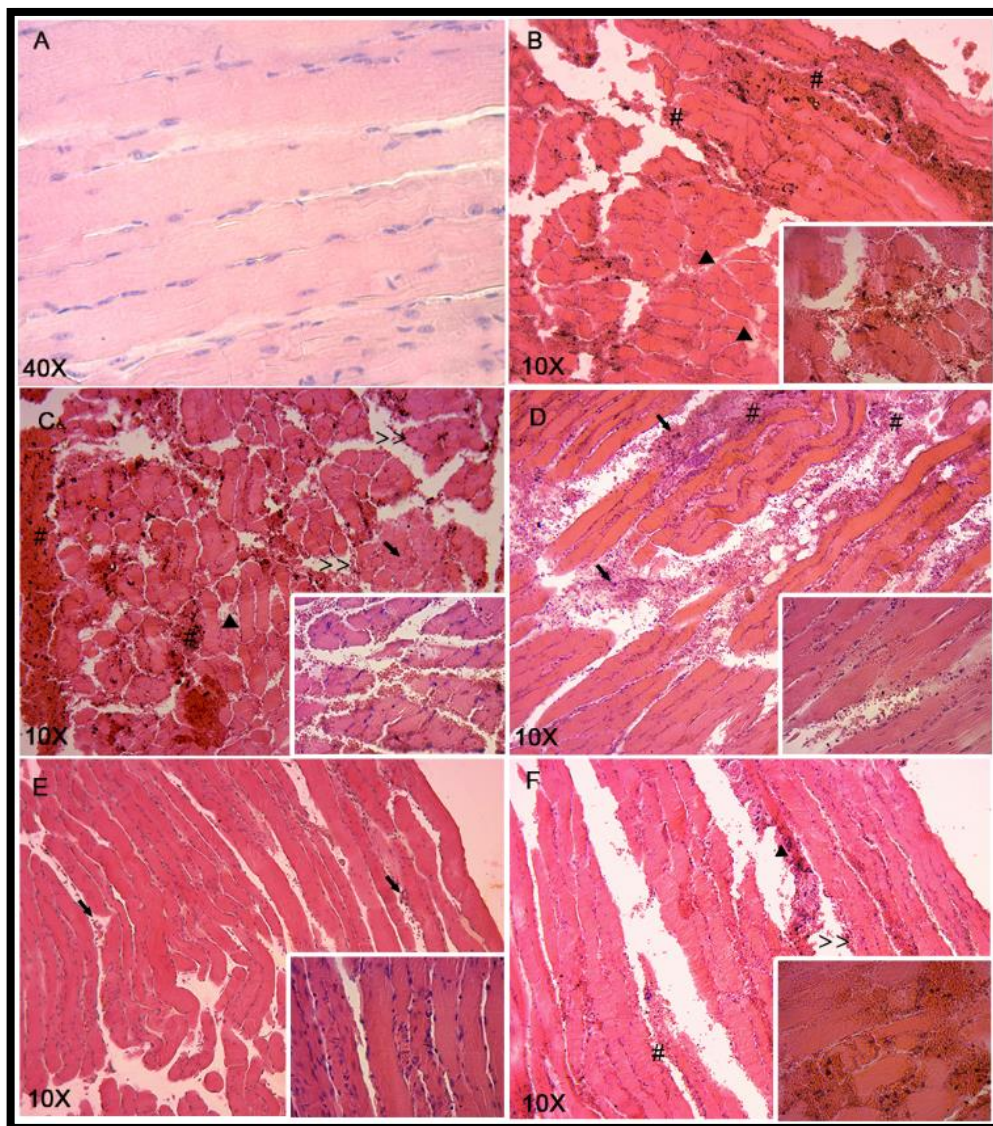


Figura 7: Cortes histológicos en sección longitudinal de músculo gastrocnemio de ratón A) control, se observa estructura normal conservada. B), C), D), E) y F) músculos gastrocnemio inoculados con veneno de serpiente juvenil de *Bothrops alternatus*. Se observa en B) tiempo de exposición 1 h, intensa hemorragia (#). C) 3 h, leve infiltrado inflamatorio polimorfonuclear (▲), edema (>>),

desorganización del ordenamiento fibrilar y necrosis (▲). D) 6 h, intenso infiltrado inflamatorio (↑) y necrosis (▲). E) 12 h, infiltrado inflamatorio (↑), desorganización de las fibras musculares y ausencia de hemorragia y F) 24 h, hemorragia (#), edema (>>) y necrosis (▲).

6.2. ENSAYOS *IN VITRO*

6.2.1. CITOTOXICIDAD SOBRE CULTIVO DE LÍNEA CELULAR C2C12

El veneno de *B. alternatus* juvenil presentó actividad mitotóxica *in vitro* dosis dependiente y evidenciable a partir de concentraciones de 5 µg/mL (Fig. 8 y 9) que resultó en una disminución de la viabilidad celular del ~45%. Por otro lado, el veneno de los ejemplares adultos exhibió un comportamiento similar, aunque con menor potencia tóxica sobre los mioblastos murinos en comparación con los especímenes juveniles. En ambos casos, la menor concentración ensayada (2.5 µg/mL) no mostró actividad citotóxica sobre la línea celular evaluada.

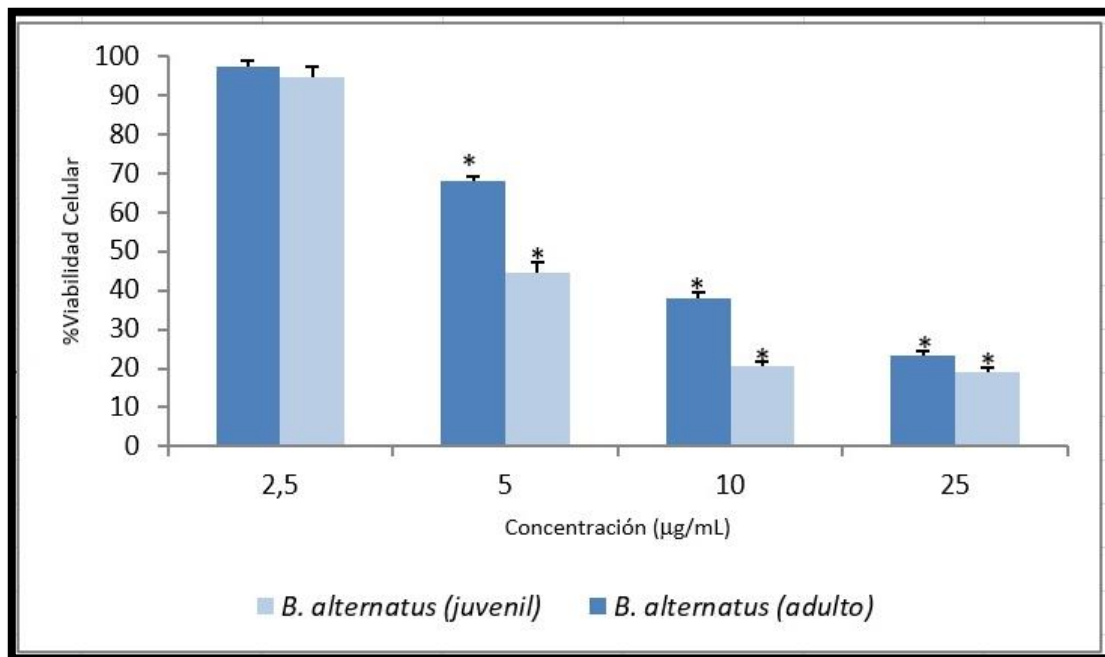


Figura 8. Valoración del daño citotóxico de los venenos de *B. alternatus* juvenil y adulto. Las barras representan el promedio de 3 ensayos \pm DS. * $p < 0.05$ diferencia entre veneno de juveniles y adultos.

En la Figura 9A se observa la confluencia de los mioblastos murinos que alcanzaron una confluencia de aproximadamente 80%, previo a la incubación del veneno de juveniles y adultos. Luego de 3 h de sembrado el veneno se observó un efecto citotóxico mayor del veneno de juveniles (Fig. 8C) donde se aprecian áreas extensas desprovistas de células.

Por su parte, el veneno de adultos a la misma dosis ensayada también afecta la viabilidad celular, aunque con una efectividad menor (Fig. 9B).

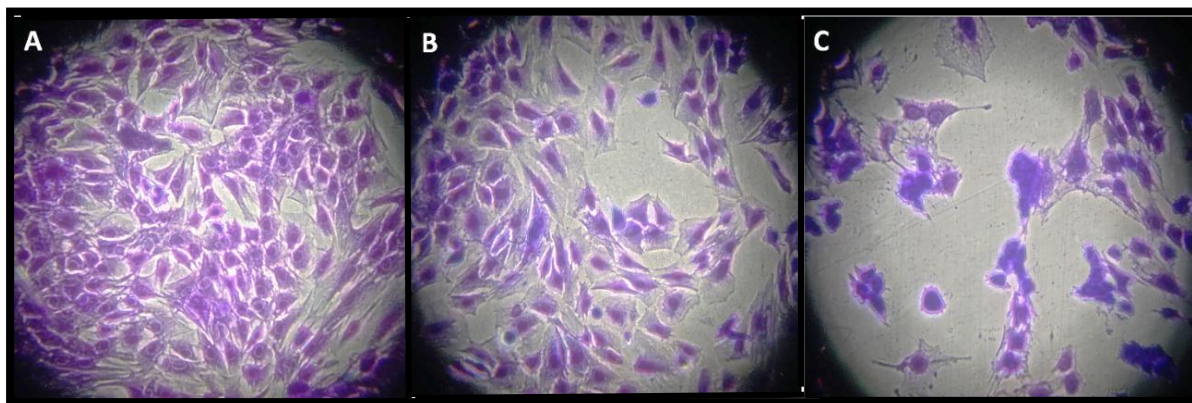


Figura 8. Comparación del efecto del veneno de *B. alternatus* entre individuos de edad ontogénica diferente con medio DMEM sobre mioblastos murinos C2C12 luego de 3 h de exposición. A). Control, B). *B. alternatus* adulto (5 ug/mL), C). *B. alternatus* juvenil (5 ug/mL). Note la marcada disminución de la viabilidad celular del veneno de especímenes juveniles (C) en comparación con la acción mitotóxica *in vitro* de aquellos ejemplares en estado adulto (B).

6.2.2. HEMÓLISIS RADIAL INDIRECTA Y DIRECTA

En el sistema de hemólisis indirecta en placas, los halos fueron medidos luego de 18 h de incubación del veneno de *B. alternatus* (juvenil y adulto) en el gel de agarosa y el tamaño de los mismos fue proporcional a la cantidad de veneno sembrado.

El factor responsable (factor lítico indirecto) ha sido asociado a la presencia de la enzima fosfolipasa A₂ (EC.3.1.1.4) en el veneno, la que actúa sobre una fuente exógena de lecitina y genera lisofosfátidos con acción lítica sobre los eritrocitos (Bonilla y Zavaleta, 1997) de manera tal que alteran la integridad de la membrana eritrocitaria conduciendo a hemólisis de un modo indirecto. El veneno de *B. alternatus*(j) mostró mayor grado de hemólisis en comparación con el veneno de ejemplares adultos que exhibieron halos hemolíticos de menor diámetro a idénticas dosis ensayadas (Tabla 3). Vale decir que el efecto hemolítico (indirecto) de los venenos revela la presencia de fosfolipasas A₂ presentes en la composición de ambos venenos. Por otro lado, la actividad hemolítica directa fue nula.

Tabla 3. En la tabla se presentan los datos de la lectura del diámetro de los halos expresados en mm.

	2mg/ml	1mg/mL	0.5mg/mL	0.25mg/mL	0.125mg/mL	0.0625mg/mL
<i>B. alternatus</i> (j)	24	23	21	19	17	15
<i>B. alternatus</i> (a)	22	20	19	17	15	12

6.2.3. DETERMINACIÓN DEL TIEMPO DE PROTROMBINA EN PLASMA

Se comprobó la habilidad de veneno de *B. alternatus* juvenil para modificar los parámetros de la coagulación sanguínea. El tiempo de coagulación (expresado en segundos) mostró ser dependiente con la cantidad de veneno. Se observó que la muestra de veneno de la especie en estado juvenil, a la

concentración de 1 mg/mL, el tiempo de coagulación fue menor (12.4 s) (Tabla 4) en comparación con los datos obtenidos para los individuos adultos (16.6 s). Por lo tanto, se evidencia un alargamiento del tiempo de coagulación del plasma en presencia del veneno de *B.alternatus* juvenil en diferentes concentraciones (2 a 0.0625 mg/mL).

Tabla 4. En la tabla se presentan los datos obtenidos de la determinación del tiempo de protrombina expresado en segundos (s).

	2mg/ml	1mg/mL	0.5mg/mL	0.25mg/mL	0.125mg/mL	0.0625mg/mL
<i>B. alternatus(j)</i>	11.6	12.4	15.7	19.8	24.5	31.4

6.2.4. MÉTODO DE INMUNODIFUSIÓN DE OUCHTERLONY

La inmunodifusión evidenció el mismo patrón de formación de líneas de precipitado en el caso del veneno de *B. alternatus* adulto revelando dos bandas cuando éste fue enfrentado al suero antibotrópico bivalente y suero polivalente. Por su parte, el veneno de *B. alternatus* juvenil respondió de diferente manera al del veneno de adulto presentando una única banda difusa frente a ambos tipos de antivenenos (Fig. 10). Sin embargo, estos estudios deben ser complementados con métodos de mayor sensibilidad como Western Blot (o estudios de antivenómica) a fin de identificar las familias de proteínas reconocidas por los antivenenos comerciales.

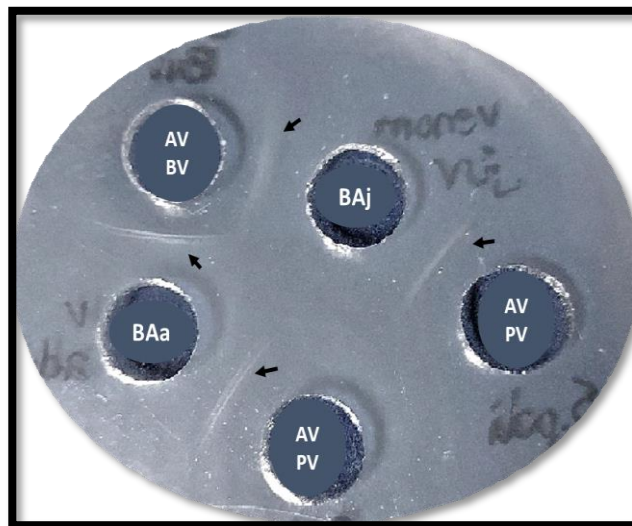


Figura 9. Test de Ouchterlony. Se observa un comportamiento diferencial entre el veneno de juveniles y adultos de *B. alternatus* frente a sueros hiperinmunes. Las flechas indican la banda de precipitación.

7. DISCUSIÓN

Los cambios en el perfil de proteínas de los venenos de serpientes pueden comenzar en individuos recién nacidos y sufrir modificaciones constantes a lo largo de la vida. En este sentido, es natural que algunas características del envenenamiento botrópico puedan desaparecer o reducirse a lo largo del desarrollo del animal (Wray *et al.* 2015). La diversidad ontogenética de los venenos botrópicos puede reflejar su actividad biológica en la presa y en el envenenamiento humano.

Tal como se mencionó previamente, varios factores pueden influir en la composición y actividades fisiopatológicas de los venenos de serpientes y por lo tanto mostrar cierta heterogeneidad. La variabilidad individual intraespecie de la composición enzimática de los venenos de serpiente es una característica permanente y probablemente inherente de la proteosíntesis altamente específica.

Los venenos de serpientes varían en su composición bioquímica y perfil farmacológico, no solo entre diferentes especies, sino también dentro de una misma especie y en serpientes de diferentes edades (Saldarriaga *etal.* 2003), tal como se evidencia en los resultados de este trabajo. En el caso de la letalidad, ésta puede variar según la edad de la serpiente aún en especies con dietas especializadas como *B. alternatus*, que podría alimentarse únicamente de mamíferos a lo largo de su vida (Andrade y Abe 1999; Martins *et al.* 2003; Nunes 2006) o que incluiría en su alimentación aves y anuros según sugieren otros autores (Scrocchi *et al.* 2006; Cacciali y Mercolli 2009)

La potencia letal (LD50) intramuscular de los venenos de ejemplares juveniles evaluada en ratones fue mayor (6,9 $\mu\text{g/g}$) en comparación con aquella obtenida para los individuos adultos (5 $\mu\text{g/g}$), dato coincide con lo reportado previamente por otros autores (Garcia Denegri *et al.* 2016).

Esto implica que una serpiente en estado juvenil necesitaría inocular mayores cantidades de veneno que un adulto para producir el mismo efecto letal en las mismas presas. Tales efectos refuerzan la idea del cambio ontogénico en el patrón de alimentación entre serpientes jóvenes (lagarto) y adultas (roedores) (Lira-da-Silva *et al.* 2009; Martins *et al.* 2003). Contrariamente, los resultados de Zelanis y colaboradores. (2008) no mostraron variabilidad ontogenética cuando se evaluó la letalidad del veneno de *B. jararaca* también en ratones.

La miotoxicidad que se define como la habilidad de las toxinas para inducir necrosis en la musculatura esquelética fue evaluada tanto *in vivo* como *in vitro*. En este último caso se realizó mediante la incubación de veneno de juveniles y adultos en cultivo de células esqueléticas indiferenciadas C2C12. Los ensayos de miotoxicidad sobre C2C12 mostraron un comportamiento diferencial en las concentraciones intermedias (5 $\mu\text{g/mL}$) donde el veneno de *B. alternatus* adulto establece una viabilidad celular mayor (70%) que el correspondiente a los individuos juveniles (40%). Estos valores difieren con aquellos reportados por Otto y colaboradores (2019) que reportan un comportamiento diferencial del veneno de ejemplares juveniles y adultos de *Bothrops diporus* de Argentina.

En el caso de los venenos botrópicos, los principales componentes responsables de la acción miotóxica son las SVMPs cuya acción es secundaria a la isquemia resultante de su acción sobre la microvasculatura (Gutiérrez *et al.*, 1995b), es decir, que las metaloproteasas hemorrágicas producen la destrucción de los vasos sanguíneos, disminuyendo los niveles de oxígeno y causando

indirectamente la mionecrosis. A nivel tisular, el análisis histopatológico de la actividad miotóxica de veneno de ejemplares adultos revela destrucción de las células musculares, edema y hemorragia interfibrilar junto con la presencia de infiltrado inflamatorio, que persisten significativamente durante las primeras 24 horas (García Denegri *et al.* 2016).

En nuestras evaluaciones histológicas con venenos de ejemplares juveniles, la acción miotóxica fue similar a lo observado por García Denegri (2006), constatándose hemorragia interfibrilar, edema, infiltrado inflamatorio y mionecrosis dentro de las 24 horas. Si bien estos análisis sugieren que el veneno de los juveniles es similar al de adultos en cuanto a su miotoxicidad, notamos que la hemorragia interfibrilar fue cualitativamente más intensa, indicando que existiría una proporción diferente de los componentes responsables de la actividad hemorrágica.

Por otro lado, de la observación macroscópica realizada en este trabajo surge que los músculos gastrocnemios inoculados, en ambos casos, mostraron una hemorragia masiva en todo el miembro sugiriendo que los venenos de juveniles y adultos de *B. alternatus* tienen actividades hemorrágicas similares, con compromiso evidente en la funcionalidad del miembro afectado a las horas evaluadas.

Con respecto a la actividad fosfolipásica, la cual podría estar involucrada en la hidrólisis de fosfolípidos de membrana que alterarían su estabilidad (Pestronk *et al.* 1982) medida a través de la hemólisis radial indirecta, el veneno de *B. alternatus* juvenil exhibió mayor capacidad hidrolítica, cuando se lo comparó con el veneno de individuos adultos.

Por otra parte, los venenos de serpientes del género *Bothrops* pueden ejercer efectos variados sobre la coagulación de la sangre. En este sentido los venenos botrópicos presentan serinoproteasas “tipo trombina” de fuerte acción coagulante *in vitro*, consumen el fibrinógeno *in vivo*, induciendo defibrinación y alteraciones en las pruebas de coagulación (Gutiérrez 2002). Otras serinoproteinasas presentes en la familia Viperidae son los activadores de factor X y V, activadores de protrombina y activadores de plaquetas (de Lima *et al.*, 2005).

Por su parte, las metaloproteinasas de veneno de serpiente activan zimógenos específicos, como ser el precursor del factor VII, el factor X, el factor V y la protrombina (McCleary y Kini 2013). Por lo tanto, las SVMPs comprenden a proteínas claves en la coagulación sanguínea que dá como resultado una interferencia en la coagulación. Otra familia de proteínas relacionadas a esta actividad son las PLA2s, sin importar si son miotóxicas o no, son capaces de evitar la formación de coágulo. Esto debido a que en la cascada de coagulación participan algunos fosfolípidos, por ejemplo, los que forman el factor tisular, y estos llegarían a ser degradadas debido a la actividad enzimática de la fosfolipasa (Proleón 2020).

En este trabajo, el veneno de juveniles demostró mayor potencia coagulante, en iguales concentraciones de veneno, en comparación con ejemplares adultos.

En resumen, se constató una clara diferencia en el comportamiento de ambos venenos (*B. alternatus* juvenil y *B. alternatus* adulto) observando respuestas diferentes según el estadio ontogénico de la serpiente, como es el caso de la actividad de las proteasas (alteración de la coagulación y mayor potencia hemorrágica) y fosfolipasas A₂ (miotoxicidad *in vivo* e *in vitro*).

Por último, las pruebas de inmunoprecipitación *in vitro* demostraron que las proteínas del veneno de juveniles, en general, fueron reconocidas por el suero comercial bivalente (neutraliza veneno de *B. alternatus* y *B. diporus*) como por el polivalente (además de neutralizar ambas especies de *Bothrops*, también lo hace al veneno de *Crotalus* sp.) aunque no de manera idéntica a las bandas de precipitación reveladas en el caso del veneno de *B. alternatus* adulto.

Esto posiblemente ocurra como consecuencia de la expresión de isoformas o variantes de las proteínas en las juveniles, que luego estarán presentes en la composición venómica de las serpientes adultas.

La variación ontogenética observada en este trabajo junto con muchos otros estudios de diferentes autores (Andrade y Abe 1999; Bernal *et al.* 2020; Coutinho Neto 2013; Machado Braga *et al.* 2020; Santoro *et al.* 2015; Zelanis *et al.* 2010) resaltan la importancia de estudiar los efectos de la variabilidad intraespecífica para las características ecológicas, evolutivas y de relevancia médica como podría ser en la producción de sueros antibotrópicos.

8. CONCLUSIONES

- ✓ El veneno de *Bothrops alternatus* juvenil presenta variabilidad intraespecie respecto de los ejemplares adultos en la composición enzimática que se infiere por los resultados expresados en las actividades que aquí se ensayaron.
- ✓ La potencia letal del veneno de juveniles fue menor en comparación con la de adultos cuando se ensayó en ratones por vía i.m. lo cual sugiere una variación en la composición proteica de los venenos entre las etapas de desarrollo.
- ✓ La miotoxicidad sobre C2C12 fue significativamente mayor en el caso de *B. alternatus* juvenil en las dosis ensayadas que demuestra la acción, por un lado, de las PLA₂ presentes en el veneno, las cuales inducen miotoxicidad por acción citotóxica directa sobre la célula muscular esquelética (C2C12) y por otro, la contribución de las metaloproteinasas que actúan sinérgicamente con las primeras produciendo una mayor citotoxicidad.
- ✓ Histológicamente, el cuadro de lesiones es similar en ambos estadios ontogénicos a las dosis y tiempos ensayados, aunque la hemorragia interfibrilar fue cualitativamente más intensa en juveniles.
- ✓ *B. alternatus* juvenil exhibió mayor capacidad hidrolítica (enzimática) cuando se evaluó la actividad fosfolipásica en comparación con el veneno de individuos adultos. Este ensayo detecta a las enzimas fosfolipasas A₂ que actúan sobre una fuente exógena de lecitina y genera lisofosfátidos con acción lítica sobre los eritrocitos.
- ✓ El veneno de juveniles también demostró mayor potencia coagulante sobre plasma en comparación con igual concentración de veneno de ejemplares adultos hecho que estaría ligado a la proporción y tipo de proteasas (serino y metalo) del veneno total.
- ✓ El veneno de *B. alternatus* juvenil exhibe una única banda de inmunoprecipitación frente a los sueros comerciales, y no dos bandas como en el caso de veneno de adultas. Posiblemente, esto ocurra como consecuencia de la expresión de isoformas o variantes de las proteínas en las juveniles, que luego estarán presentes en la composición venómica de las serpientes adultas. Vale resaltar el valor de la capacidad neutralizante de los sueros actualmente disponibles cuando se enfrentó el veneno del pool de juveniles frente al antiveneno bivalente botrópico.

9. BIBLIOGRAFÍA

- Alvarez, B., Aguirre, R. H., Céspedes, J. A., Hernando, A. B., Tedesco, M. E., & Orfeo, O. (2002). *Atlas de anfibios y reptiles de las provincias de Corrientes, Chaco y Formosa, Argentina.*, Universidad Nacional del Nordeste. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales y Agrimensura.
- Andrade, D. V., & Abe, A. S. (1999). Relationship of Venom Ontogeny and Diet in Bothrops. *Herpetologica*, **55**(2), 200–204.
- Andrade, D. V., Abe, A. S., & Santos, M. C. dos. (1996). Is the Venom Related to Diet and Tail Color during Bothrops moojeni Ontogeny? *Journal of Herpetology*, **30**(2), 285–288.
- Ávila, L., Pavan, C. H., Biscoglio, M. J., Dokmetjian, J. C., Cascone, O., & Fingerhann, M. (2018). Variabilidad de la composición proteica del veneno de Bothrops alternatus de Argentina y su posible relación con la actividad biológica. *Revista Farmacéutica*.
- Bernal, J. C. C., Bisneto, P. F., Pereira, J. P. T., ... Monteiro, W. M. (2020). “Bad things come in small packages”: predicting venom-induced coagulopathy in Bothrops atrox bites using snake ontogenetic parameters. *Clinical Toxicology*, **58**(5), 388–396.
- Coutinho Neto, A. (2013). *Estudo da variação ontogenética do veneno de Bothrops atrox por análise proteômica e peptidômica: Identificação de peptídeos potencializadores de bradiginina*, Fundação Universidade Federal de Rondônia (UNIR), Porto Velho.
- de Lima, D. C., Alvarez Abreu, P., de Freitas, C. C., Santos, D. O., Borges, R. O., Dos Santos, T. C., ... y Castro, H. C. (2005). Snake venom: any clue for antibiotics and CAM. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, **2**(1), 39-47
- de Titto, E., De Roodt, A., Lanari, L., ... Damin, C. (2017). Accidentes y muertes por animales venenosos en Argentina durante el período 2000- 2011. *Revista Ecuatoriana de Ciencia, Tecnología e Innovación En Salud Pública*, **1**(1), 1–24.
- Entiauspe-Neto, O., Pino, S., & Loebmann, D. (2019). BOTHROPS ALTERNATUS (Urutu). ARBOREAL HABITAT USE. *Herpetological Review*, **50**, 149–150.
- Fan, H. W., & Cardoso, J. L. (2008). Clinical Toxicology of Snake Bites in South America. In *Handbook of: Clinical Toxicology of Animal Venoms and Poisons*, CRC Press.
- García Denegri, M. E., Bustillo, S., Gay, C. C., ... Leiva, L. C. A. (2019). Venoms and Isolated Toxins from Snakes of Medical Impact in the North-east Argentina: State of the Art. Potential Pharmacological Applications. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, **19**(22), 1962–1980.
- García Denegri, M. E., Teibler, G. P., Maruñak, S. L., Hernández, D. R., Acosta, O. C., & Leiva, L. C. (2016). Efficient muscle regeneration after highly haemorrhagic Bothrops alternatus venom injection. *Toxicon*, **122**, 167–175.
- Gay, C. C., Leiva, L. C., Maruñak, S., Teibler, P., & Acosta de Pérez, O. (2005). Proteolytic, edematogenic and myotoxic activities of a hemorrhagic metalloproteinase isolated from Bothrops alternatus venom. *Toxicon*, **46**(5), 546–554.
- Giraudó, A. (2014). Diversidad e historia natural de serpientes de interés sanitario del nordeste argentino / Diversity and natural history of snakes with health interest from northeastern Argentina, Instituto Nacional de Medicina Tropical, pp. 9–68.

Giraud, A., Arzamendia, V., López, S., ... Urban, J. (2008). Serpientes Venenosas de Santa Fe, Argentina: Conocimientos sobre su Historia Natural Aplicados para la Prevención de Ofidismo. *FABICIB*, **12**.

Giraud, A. R., Arzamendia, V., Bellini, G., ... Williams, J. D. (2012). Categorización del estado de conservación de las serpientes de la República Argentina. *Cuadernos de Herpetología*, **26**, supl. 1.

Gomez, G. (2018). Características de las serpientes, clasificación, alimentación y hábitat. Retrieved June 29, 2021, extraído de: <https://reptiles.paradais-sphynx.com/informacion/caracteristicas-serpientes.htm>

Gutiérrez, J., Avila, C., Rojas, E., & Cerdas, L. (1988). An alternative in vitro method for testing the potency of the polyvalent antivenom produced in Costa Rica. *Toxicon*, **26**(4), 411–413.

Gutiérrez, J., Romero, M., Díaz, C., Borkow, G., & Ovadia, M. (1995a). Isolation and characterization of a metalloproteinase with weak hemorrhagic activity from the venom of the snake *Bothrops asper* (terciopelo). *Toxicon*, **33**(1), 19–29.

Gutiérrez, J.M., Romero, M., Nunez, J., Chaves, F., Borkow, G., Ovadia, M., 1995b. Skeletal muscle necrosis and regeneration after injection of BaH1, a hemorrhagic metalloproteinase isolated from the venom of the snake *Bothrops asper* (Terciopelo). *Exp Mol Pathol* **62**, 28-41.

Gutiérrez, J. M. (2002). Understanding snake venoms: 50 years of research in Latin America. *Revista de biología tropical*, **50**(2), 377-394.

Hatakeyama, D. M., Tasima, L. J., Galizio, N. da C., ... Tanaka-Azevedo, A. M. (2021). From birth to adulthood: An analysis of the Brazilian lancehead (*Bothrops moojeni*) venom at different life stages. *PLOS ONE*, **16**(6).

Heyland, A., Hodin, J., & Reitzel, A. M. (2005). Hormone signaling in evolution and development: a non-model system approach. *BioEssays*, **27**(1), 64–75.

Homma, M., & Tu, A. T. (1971). Morphology of Local Tissue Damage in Experimental Snake Envenomation. *British Journal of Experimental Pathology*, **52**(5), 538–542.

Izidoro, L. F. M., Sobrinho, J. C., Mendes, M. M., ... Soares, A. M. (2014). Snake Venom L-Amino Acid Oxidases: Trends in Pharmacology and Biochemistry. *BioMed Research International*, **2014**.

Lawson, R., Slowinski, J. B., Crother, B. I., & Burbrink, F. T. (2005). Phylogeny of the Colubroidea (Serpentes): New evidence from mitochondrial and nuclear genes. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **37**(2), 581–601.

Leynaud, G., Pelegrin, N., & Lescano, J. (2006). Anfibios y reptiles. In *Bañados del río Dulce y Laguna Mar Chiquita (Córdoba, Argentina)*, pp. 219–235.

Lira-da-Silva, R. M., Mise, Y. F., Casais-e-Silva, L. L., Ulloa, J., Hamdan, B., & Brazil, T. K. (2009). SERPENTES DE IMPORTÂNCIA MÉDICA DO NORDESTE DO BRASIL. *Gazeta Médica Da Bahia*, **79**(1).

Machado Braga, J. R., de Moraes-Zani, K., Pereira, D. dos S., ... Teixeira da Rocha, M. M. (2020). Sexual and ontogenetic variation of *Bothrops leucurus* venom. *Toxicon*, **184**, 127–135.

Margni, R. A. (1996). *Inmunología e Inmunoquímica Fundamentos.*, 5a edn, Medica Panamericana.

Markland, F. S., & Swenson, S. (2013). Snake venom metalloproteinases. *Toxicon*, **62**, 3–18.

Martins, M., Spina Avino, F., Monteiro, C., Sawaya, R., & Ariedi Junior, V. (2003). *Bothrops alternatus* (Urutu). Predation. *Herpetological Review*, **34**, 147–148.

McCleary, R. J., & Kini, R. M. (2013). Snake bites and hemostasis/thrombosis. *Thrombosis research*, **132**(6), 642-646.

McEdward, L. R., & Janies, D. A. (1993). Life Cycle Evolution in Asteroids: What is a Larva? *The Biological Bulletin*, **184**(3), 255–268.

Moga, M. A., Dimienescu, O. G., Arvătescu, C. A., Ifteni, P., & Pleș, L. (2018). Anticancer Activity of Toxins from Bee and Snake Venom—An Overview on Ovarian Cancer. *Molecules*, **23**(3), 692.

Montero, R., & Autino, A. (2018). *Sistemática y filogenia de los vertebrados, con énfasis en la fauna argentina. Tercera edición.*, 3a edn.

Moura-da-Silva, A. M., Laing, G. D., Paine, M. J. I., ... Theakston, R. D. G. (1996). Processing of pro-tumor necrosis factor- α by venom metalloproteinases: A hypothesis explaining local tissue damage following snake bite. *European Journal of Immunology*, **26**(9), 2000–2005.

Munawar, A., Ali, S. A., Akrem, A., & Betzel, C. (2018). Snake Venom Peptides: Tools of Biodiscovery. *Toxins*, **10**(11), 474.

Navarrete Zamora, M. B. N., Suárez, W. H. S., & Vargas Mas, E. A. (2010). Las serpientes venenosas de importancia en la salud pública del Perú. *Revista Electrónica de Veterinaria*, **11**, 1–17.

Nori, J., Carrasco, P. A., & Leynaud, G. C. (2014). Venomous snakes and climate change: ophidism as a dynamic problem. *Climatic Change*, **122**(1), 67–80.

Öhler, M., Georgieva, D., Seifert, J., ... Betzel, C. (2010). The Venomics of *Bothrops alternatus* is a Pool of Acidic Proteins with Predominant Hemorrhagic and Coagulopathic Activities. *Journal of Proteome Research*, **9**(5), 2422–2437.

Orduna, T., Lloveras, S., de Roodt, A., ... Sagardoyburu, S. (2007). *GUÍA DE PREVENCIÓN, DIAGNÓSTICO, TRATAMIENTO Y VIGILANCIA EPIDEMIOLÓGICA DE LOS ENVENENAMIENTOS OFIDICOS*, Facultad de Medicina UBA.

Ortiz Prado, E., Molina, C., Ramírez, D., Espín, E., & Fierro, D. (2015). Perspectivas actuales sobre el uso terapéutico del veneno de serpientes. *VozAndes*, 47–52.

Otero, R., Tobón, G. S., Gómez, L. F., ... Arboleda, J. J. (1992). Accidente ofídico en Antioquia y Chocó. Aspectos clínicos y epidemiológicos (marzo de 1989 - febrero de 1990). *Acta méd. colomb*, 229–49.

Otto, B., Van de Vende, A., Ñunez, S., Gomez, G., & Garcia Denegri, M. E. (2019). Comportamiento diferencial del veneno de ejemplares juveniles y adultos de *Bothrops diporus*, Presented at the XXV Reunión de comunicaciones Científicas y Tecnológicas, Universidad Nacional del Nordeste.

Pestronk, A., Parhad, I. M., Drachman, D. B., & Price, D. L. (1982). Membrane myopathy: Morphological similarities to duchenne muscular dystrophy. *Muscle & Nerve*, **5**(3), 209–214.

Posada Arias, S. (2015). Aspectos epidemiológicos, clínicos y de tratamiento para el accidente ofídico en perros y gatos. *Revista de Medicina Veterinaria*, **1**(30), 151–167.

Proleón Torres, A. D. (2020). Caracterización funcional e inmunológica de una fosfolipasa A2 básica miotóxica del veneno de la serpiente peruana *Bothrops atrox*.

- Quesada Aguilera, J. A., & Quesada Aguilera, E. (2012). Prevención y manejo de mordeduras por serpientes. *Revista Archivo Médico de Camagüey*, **16**(3), 369–383.
- Randhawa, M. A. (2009). Calculation of LD50 values from the method of Miller and Tainter, 1944. *Journal of Ayub Medical College, Abbottabad*, **21**(3), 184–185.
- Rocco, R. D., Gustavo, R., Vanessa, C. de O., C, L. L., D, L. R., & R, de R. A. (2013). Caracterización tóxica del veneno de *Bothrops (Rhinocerocephis) alternatus* de diferentes regiones de la provincia de Córdoba (Argentina). *Rev. Fac. Cienc. Méd. (Córdoba)*, 7–13.
- Ruiz de Torrent, R., Leiva, L., & Acosta de Pérez, O. (2000). Neutralización de la actividad proteolítica de venenos de víboras del género *Bothrops* del Litoral Argentino. 2021, extraído de: <https://med.unne.edu.ar/revistas/revista114/ofidismo.htm>
- Saldarriaga, M. M., Otero, R., Núñez, V., Toro, M. F., Díaz, A., & Gutiérrez, J. M. (2003). Ontogenetic variability of *Bothrops atrox* and *Bothrops asper* snake venoms from Colombia. *Toxicon*, **42**(4), 405–411.
- Santoro, M. L., Carmo, T. do, Cunha, B. H. L., ... Fernandes, W. (2015). Ontogenetic Variation in Biological Activities of Venoms from Hybrids between *Bothrops erythromelas* and *Bothrops neuwiedi* Snakes. *PLOS ONE*, **10**(12).
- Sousa, L. F., Nicolau, C. A., Peixoto, P. S., ... Moura-da-Silva, A. M. (2013). Comparison of Phylogeny, Venom Composition and Neutralization by Antivenom in Diverse Species of *Bothrops* Complex. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, **7**(9).
- Stazzonelli Sadir, J. C., Cabrera, M. P., & Scrocchi Manfrini, G. J. (2018). *Bothrops diporus*: Yarará, Yarará chica. *Universo Tucumano*. Extraído de: <https://ri.conicet.gov.ar/handle/11336/86322>
- Van De Velde, C. (2018). *Rol de las metaloproteinasas hemorrágicas en las alteraciones hemostáticas inducidas por el veneno de Bothrops alternatus*, Universidad Nacional del Nordeste. Extraído de: <https://ri.conicet.gov.ar/handle/11336/96347>
- Waqar, M., & Batool, S. (2015). In silico analysis of binding of neurotoxic venom ligands with acetylcholinesterase for therapeutic use in treatment of Alzheimer's disease. *Journal of Theoretical Biology*, **372**, 107–117.
- Williams, J. D., Vera, D. G., & Pietro, D. O. D. (2021). Lista comentada de las serpientes de la Argentina, con referencias a su sistemática, distribución geográfica, dieta, reproducción, potencial peligrosidad y etimologías. *Revista del Museo de La Plata*, **6**(1), 26–124.
- Wray, K. P., Margres, M. J., Seavy, M., & Rokyta, D. R. (2015). Early significant ontogenetic changes in snake venoms. *Toxicon*, **96**, 74–81.
- Zaher, H., Grazziotin, F. G., Cadle, J. E., Murphy, R. W., Moura-Leite, J. C. de, & Bonatto, S. L. (2009). Molecular phylogeny of advanced snakes (Serpentes, Caenophidia) with an emphasis on South American Xenodontines: a revised classification and descriptions of new taxa. *Papéis Avulsos de Zoologia*, **49**, 115–153.
- Zambelli, V. O., Picolo, G., Fernandes, C. A. H., Fontes, M. R. M., & Cury, Y. (2017). Secreted Phospholipases A2 from Animal Venoms in Pain and Analgesia. *Toxins*, **9**(12), 406.
- Zaqueo, K., Kayano, A., Simões-Silva, R., ... Stabeli, R. (2014). Isolation and Biochemical Characterization of a New Thrombin-Like Serine Protease from *Bothrops pirajai* Snake Venom. *BioMed Research International*, **2014**.

Zelanis, A., Tashima, A. K., Rocha, M. M. T., ... Serrano, S. M. T. (2010). Analysis of the ontogenetic variation in the venom proteome/peptidome of *Bothrops jararaca* reveals different strategies to deal with prey. *Journal of Proteome Research*, 2278–2291.

Zelanis, A., Travaglia-Cardoso, S. R., & Furtado, M. D. F. D. (2008). Ontogenetic changes in the venom of *Bothrops insularis* (Serpentes: Viperidae) and its biological implication. *South American Journal of Herpetology*, 3(1), 43–50.

EXPOSICIÓN SINTÉTICA DE LA LABOR REALIZADA

El objetivo del presente trabajo fue evaluar bioquímica y biológicamente el veneno de juveniles de la especie *Bothrops alternatus* del nordeste argentino a través de actividades *in vivo* e *in vitro* a ejemplares con un SVL de ~30 cm. Luego se compararán los resultados obtenidos con aquellos reportados y estudiados para el veneno de *B. alternatus* adulto (*B.alternatus_a*). Se utilizó un pool de veneno de individuos en edad juvenil y a partir de éste se calculó dosis letal media (LD_{50}), se observó su efecto tóxico sobre las fibras musculares en ratones. En tanto, los ensayos *in vitro* sirvieron para observar toxicidad en línea celular C2C12, actividad fosfolipásica por hemólisis radial indirecta, determinación del tiempo de protrombina en plasma y método de inmunodifusión de Ouchterlony para determinar grado de reconocimiento antígeno/anticuerpo entre sueros comerciales disponibles para uso humano y el veneno de juveniles de *B. alternatus*.

Estos procedimientos se realizaron en el laboratorio y fueron descriptos a través de observaciones macroscópicas e histológicas. Los datos obtenidos fueron volcados en planillas para su posterior análisis estadístico.

El trabajo incluyó las siguientes actividades:

- Revisión de material bibliográfico: se analizó bibliografía clásica y actualizada sobre el tema.
- Manejo de animales de laboratorio (ratones cepa CF-1) para la extracción de muestras musculares y de sangre.
- Realización de técnicas de histología básica y observación microscópica.
- Análisis estadístico inferencial (regresión), elaboración de gráficos y tablas.
- Citotoxicidad sobre cultivo de línea celular C2C12.
- Hemólisis radial indirecta.
- Determinación del tiempo de coagulación en plasma.
- Método de Inmunodifusión de Ouchterlony.
- Redacción del manuscrito del trabajo final de graduación.

OBSTÁCULOS Y DIFICULTADES EN EL DESARROLLO DEL PLAN DE TRABAJO

El presente TFG presenta diferentes ensayos propios del estudio de veneno de serpientes tendientes a mostrar las principales acciones deletéreas que presenta el veneno de ejemplares juveniles de *Bothrops alternatus*, edad ontogénica poco estudiada hasta el presente.

La obtención de muestras de músculo gastrocnemio fue exitosa como la realización de los ensayos in vitro antes mencionados. Si bien se llevó a cabo la intoxicación experimental (i.m.) en ratones para evaluar daño muscular a través de la enzima actividad CK, este ensayo no pudo repetirse por costos de kit de reactivos y por la complicación que representó el ASPO a los fines de volver a planificar esta experiencia.

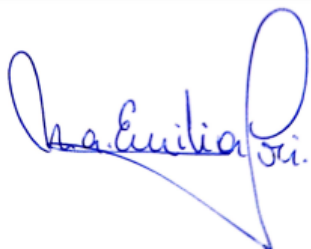
Con la pandemia por COVID-19, los tiempos previstos para la ejecución de este trabajo final también significó cambios inesperados que intentamos sortearlos. Finalmente, el acompañamiento para la redacción de esta tesina y las consultas con la directora y co-directora pudieron concretarse de manera completamente virtual por medio de videollamadas sincrónicas.

EVALUACIÓN ACADÉMICA DEL DIRECTOR Y CODIRECTOR

La alumna Karen Y. González cumplió satisfactoriamente con las actividades de laboratorio propuestas para lograr con los objetivos propuestos en este plan de tesina. Durante el desarrollo de su Trabajo Final de Graduación logró un acabado conocimiento sobre el manejo de animales en cautiverio y procesamiento de muestras histológicas para evaluar cualitativamente los efectos locales de la inoculación de veneno de serpientes. Su formación se completó con una exhaustiva revisión bibliográfica sobre publicaciones científicas pertinentes a la temática.

Participó en reuniones científicas en calidad de expositor y en un proyecto de investigación de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la UNNE (FCV- UNNE). Además, realizó tareas de docencia que consistieron en colaborar en el desarrollo de trabajos prácticos de la asignatura Farmacología y toxicología de la carrera de Veterinaria (FCV- UNNE), con responsabilidad y compromiso por la docencia universitaria.

A lo largo de estas actividades demostró interés y empatía, desarrollando las tareas con rigurosidad científica y por sobre todo expresó siempre una sincera disponibilidad al aprendizaje de las técnicas empleadas y en el proceso de escritura de su tesina.



Dra. María Emilia Garcia Denegri
Directora



Dra. Gladys Pamela Teibler
Codirectora