



Universidad Nacional del Nordeste
Facultad de Ciencias Veterinaria
Corrientes – Argentina

TRABAJO FINAL DE GRADUACIÓN
-MÓDULO DE INTENSIFICACIÓN PRÁCTICA-

OPCIÓN: CLÍNICA DE PEQUEÑOS ANIMALES.

TEMA: “USO DE LA FISIOTERAPIA PARA LA REGENERACION DE LESIONES MUSCULARES EN UN CONEJO INOCULADO CON VENENO DE *Bothrops alternatus*”

TUTOR EXTERNO: MV FIDANZA, Mirka Julia.

TUTOR INTERNO: MV LÓPEZ RAMOS, Mayra Luz (FCV-UNNE).

RESIDENTE: Lemos Alexis Adolfo Alejandro

E-MAIL: alexislemos8@gmail.com

-AÑO 2023

INDICE:

Dedicatoria:	3
Resumen:	4
Introduccion:	5
Objetivos:	6
Materiales y Métodos:	7
Resultados: y Discusión:	16
Conclusión:	23
Bibliografía:	25

Dedicatoria:

A Dios: fortaleza de mis momentos difíciles y por darme inteligencia y Perseverancia para alcanzar mis metas deseadas.

A mis padres: Susana y Adolfo, quienes con sus esfuerzos me han sabido guiar en los buenos y difíciles momentos para seguir adelante y llegar hasta aquí.

A mis hermanos: Belén, Daniela y Elio, ellos han tenido que soportar sacrificios aún más grandes que los míos y me dieron la fuerza para poder estar hoy aquí en este momento crucial de mi vida.

A mi esposa: Marian quien me acompaño en toda mi carrera.

A mis sobrinos: Ian, Valentino y Renato por ser parte de este gran logro.

A mis abuelos: en especial abuela Mirta quien me alentó siempre a seguir adelante y cumplir con todas las cosas que a mí me gustan.

A mis tutores: La MV FIDANZA, MIRKA JULIA y MV LÓPEZ RAMOS, MAYRA LUZ, y en especial a la DRA TEIBLER PAMELA quiénes con el aporte de su sabiduría y flamante trayectoria fueron pilares para el éxito de esta investigación, guiándome, ayudándome, dejando su tiempo para poder cumplir con mi trabajo final de graduación.

¡¡¡SIMPLEMENTE GRACIAS!!!

Resumen:

El presente trabajo fue realizado en el Hospital Escuela de la Facultad de Ciencias Veterinarias -UNNE. Con el propósito de evaluar la eficacia del tratamiento con fisioterapia convencional (Estimulación Lumínica con Laser de Arseniuro de Galio (ELLAG) y Estimulación Eléctrica con Magnetoterapia (EEM)) en la regeneración muscular luego de la inoculación con veneno de *Bothrops alternatus* en musculo Bíceps Femoral de conejo. Se trabajó con 2 conejos machos de la raza neozelandés blanco, los cuales fueron evaluados semiológicamente, previo al tratamiento, resultando clínicamente sanos. Ambos animales recibieron, 40 µg/0,1 ml de solución salina, del veneno y posteriormente, a las dos horas, se les administro suero antiofídico. En un conejo, a las veinticuatro horas post inoculación, se inició el tratamiento con fisioterapia convencional cada 24 horas y por un periodo de 28 días, y el otro animal no recibió tratamiento, siendo este la unidad control del ensayo. La fisioterapia se realizó cada 24 hs, por el período de 28 días. Posteriormente, día 29, se procedió al control ecográfico, extracción de sangre para determinar los valores séricos de la enzima creatinfosfoquinasa (CPK) y se realizó la toma de muestra muscular (biopsia) para evaluar el grado de regeneración muscular a través de análisis histopatológico. Como resultado se pudo observar que tanto las imágenes ecográficas e histopatología revelaron que el conejo control presentaba lesión muscular coincidente con el aumento sérico de la enzima CPK. En tanto que en el conejo tratado con FLM, si bien se evidencio daño muscular, este fue notablemente menor, como así también disminuyo el valor enzimático de la enzima creatinfosfoquinasa. Esto indica que no todas las fibras se regeneraron, lo que puede verse como una secuela funcional del músculo lesionado.

En conclusión, el tratamiento con FLM fue eficaz para reducir los efectos locales inducidos por el veneno de *B. alternatus* y podría ser una herramienta útil como tratamiento adyuvante para el envenenamiento botrópico.

Introducción:

El envenenamiento por serpientes venenosas es una urgencia médica. A nivel mundial se estima que cada año 5,4 millones de personas en todo el mundo sufren mordeduras de serpientes y que los casos de envenenamiento se sitúan entre los 1,8 millones y los 2,7 millones (OMS).

Esta intoxicación, afecta fundamentalmente a personas y animales que habitan regiones rurales. Debido al descuido por parte de los organismos de la salud, la Organización Mundial de la Salud (OMS), en el año 2009, incluyó al ofidismo entre las enfermedades tropicales desatendidas.

Las serpientes son vertebrados cuyas glándulas salivales generan una secreción especializada para la digestión de alimentos. Esta secreción está compuesta por enzimas y toxinas, y es inyectada ya sea en sus presas, al momento de alimentarse, o bien para defenderse cuando se sienten en peligro por un sistema de inoculación denominado aparato venenoso. Este aparato se encuentra constituido por las glándulas, que sintetizan y almacenan una secreción (veneno), los colmillos inyectores, los músculos y tendones que rodean la glándula y que actúan conjuntamente y coordinados para permitir que la secreción tóxica llegue a penetrar en la presa/víctima cuando el animal caza o se defiende. La glándula venenosa es una glándula salival modificada (Patiño *et al*, 2002).

El envenenamiento en mamíferos, causado por serpientes del género *Bothrops* se caracteriza, entre otras cosas, por un prominente efecto local (edema, hemorragia y necrosis de tejido muscular) y sistémico (Acosta de Pérez *et al*, 1996a, 1996b). Entre los componentes de estos venenos las miotoxinas afectan a las fibras musculares (Gutiérrez *et al*, 1995 a, b; Gay *et al*, 2005, 2009; Denegri *et al*, 2010). Las hemorraginas lesionan la microvasculatura local y sistémica (Gay CC *et al*, 2005, Teibler *et al*, 2017), y otras sustancias como los eicosanoides inducen a edema incrementando la presión tisular local (Acosta de Pérez *et al*, 1998; De Faria *et al*, 2001). Además, participan mediadores endógenos, liberados por tejidos tales como histaminas, prostaglandinas, kininas, C3a y C5a (Inoue 2015, Rodrigues 2016). El daño de las fibras musculares es secundario a la actividad miotóxica que poseen ciertos componentes de los venenos de ofidios (Denegri *et al*, 2010). La PLA₂ aislada del veneno de serpiente *Bothrops alternatus* fue caracterizada como una proteína ácida que no posee acción citotóxica, demostrada en trabajos *in vitro* (Bustillo *et al*, 2012). También se aisló del veneno de *Bothrops asper* de Costa Rica una PLA₂ miotóxica básica, que, inoculada en músculo de ratón, produce la

muerte de la célula muscular por lesiones degenerativas y posterior necrosis (Gutiérrez y Lomonte 1995c). A la microscopía se observan masas de miofilamentos que pierden la estructura sarcomérica normal, las células adquieren un aspecto hialino, con un aumento rápido en los niveles plasmáticos de creatinfosfoquinasa (CPK) (Francis *et al*, 1991). Dichas observaciones sugieren que las miotoxinas producen lesiones en la membrana plasmática con actividad fosfolipolítica, originando la salida de la enzima anteriormente mencionada con un influxo de calcio intracelular (Denegri *et al*, 2010). El daño tisular local se desarrolla muy rápidamente después de la mordedura y como consecuencia, puede ocurrir importante pérdida de tejido incluso disfunciones secundarias cuando el tratamiento se retrasa, como frecuentemente ocurre en la patogénesis de mionecrosis (Acosta de Pérez *et al*, 1996a, 1996b, 1997b), hemorragia (Acosta de Pérez *et al*, 1997a), y edema (Acosta de Pérez *et al*, 1998), comunes con varios venenos del género *Bothrops* como *B. alternatus*, *B. neuwiedii* (Koscinczuk *et al*, 2001), *B. moojeni* (Ruiz, *et al*, 1999). Además, trabajos previos realizados con veneno entero de *B. jararacussu* demostraron necrosis muscular y posterior regeneración (Teibler *et al*, 2001).

Algunas de las secuelas más significativas del envenenamiento por mordedura de *Bothrops* es la pérdida de tejido, fibrosis y dificultades motoras debido a la mionecrosis (Denegri *et al*, 2010). La regeneración muscular puede desarrollarse en algunos casos con recuperación estructural y funcional, mientras que en otros casos es incompleta (Teibler *et al*, 2001). Para que el proceso de regeneración se desarrolle con éxito debe existir un flujo sanguíneo adecuado, presencia de innervación en células regenerativas y permanencia de la lámina basal alrededor de las fibras musculares necróticas. Al faltar alguno de estos requisitos básicos la regeneración será deficiente (Gutiérrez *et al*, 1991, 1995a; Teibler *et al*, 2001).

OBJETIVO:

Objetivo general

El objetivo de este trabajo ha sido analizar la regeneración muscular, luego de la inoculación del veneno de *Bothrops alternatus* en el musculo bíceps femoral derecho del conejo, tratado con fisioterapia convencional, por un periodo de 28 días.

Objetivos particulares

-Determinar el grado de lesión muscular a los 29 días post inoculación del veneno de serpiente del género *Bothrops alternatus* en músculo Bíceps Femoral de conejos, a través del análisis ecográfico, histopatológico y dosaje de CPK.

-Evaluación, a través de técnicas ecográficas, histopatológicas y dosaje de CPK, el grado de regeneración del músculo Bíceps Femoral de conejo sometido a terapia convencional (Estimulación Lumínica con Laser de Arseniuro de Galio (ELLAG) y Estimulación Eléctrica con Magnetoterapia (EEM) a los 29 días post inoculación de veneno.

MATERIALES Y MÉTODOS:

La presente investigación se llevó a cabo en el Hospital Escuela de la Facultad de Ciencias Veterinarias del Nordeste, ubicado en la ciudad de Corrientes, calle Juan Bautista Cabral 2139.

En este estudio se determinó el grado de lesión muscular, inducido por la inoculación de veneno de serpiente del género *Bothrops alternatus* en músculo Bíceps Femoral de conejo y la regeneración muscular luego de ser sometido a fisioterapia convencional (Estimulación Lumínica con Laser de Arseniuro de Galio (ELLAG) y Estimulación Eléctrica con Magnetoterapia (EEM) durante 28 días; evaluados a través de técnicas ecográficas, histopatología y dosaje de los valores séricos de la enzima creatinfosfoquinasa (CPK).

Protocolo de ensayo:

Se trabajó con 2 conejos (*cuniculi sp.*) de 2 Kg de peso vivo, sexo macho, provenientes de la Escuela Regional de Agricultura, Ganadería e Industrias afines (ERAGIA-UNNE).

Previo a la inoculación del veneno se les realizó extracción de sangre de la vena yugular para la determinación de hemograma y bioquímica sanguínea, y control ecográfico del músculo bíceps femoral derecho para corroborar la integridad muscular. Se les inoculó 40µg del veneno en estudio en 0,1 ml de solución salina amortiguada a pH 7,2 en el músculo citado anteriormente, la inoculación fue guiada ecográficamente.

Posterior a las 2 horas de la inoculación con el veneno se le administró, vía endovenosa, 0,2ml de suero antiofídico bivalente (Laboratorio Rio de Janeiro), diluido con solución fisiológica.

A las 24 horas de la inoculación con el veneno, uno de los conejos recibió fisioterapia (láser y magnetoterapia) (FLM) por un período de 28 días, mientras que el otro animal no recibió tratamiento, constituyendo este animal la unidad control del ensayo.

Al finalizar el estudio, a ambos conejos se les realizó nuevamente extracción de sangre, ecografía muscular y biopsia (Figura 1).

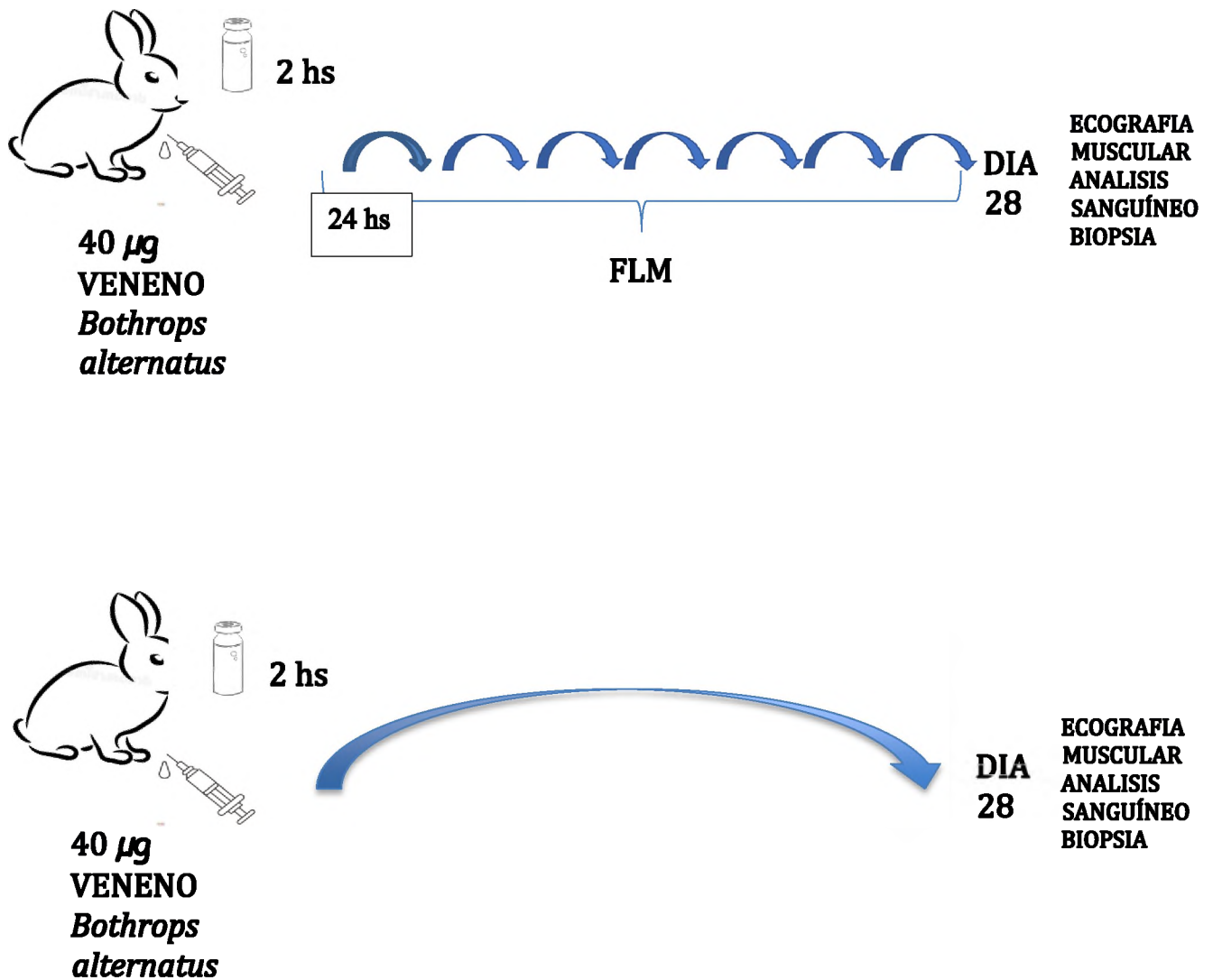


Figura 1: Protocolo del ensayo

Unidad experimental

-Conejos

Se trabajó con 2 conejos (*cuniculi sp.*) neozelandés blanco, provenientes de la Escuela Regional de Agropecuaria, Ganadería e Industrias Afines ERAGIA - UNNE) de 2 Kg de peso vivo, sexo macho (Figura 2).



Figura 2: conejo neozelandés blanco

-Veneno

Se trabajó con un pool de veneno de serpientes adultas, *Bothrops alternatus*, homogeneizado, desecado y conservado a -20°C hasta el momento de ser utilizados. La procedencia del veneno fue del Centro Interactivo de Serpientes Venenosas de Argentina dependiente de la Catedra de Farmacología y Toxicología-UNNE.

Para este ensayo se utilizó 40 μg del veneno en 0,1 ml de solución salina amortiguada a pH 7,2.

-Suero antiofídico

Se utilizó el suero antiofídico InmunoVet Antibothrópico Bivalente (Laboratorio Rio de Janeiro).

Fórmula: Globulinas equinas purificadas. Cada mililitro neutraliza 2,5 mg de veneno de *B. alternatus* y 1,5 mg de *B. neuwiedii*. Contenido neto: 10 ml, (Figura 3).

Se administró suero antiofídico por vía EV (endovenosa) en la vena cefálica antibraquial con solución salina (velocidad de administración de 0,5ml/kg/h).



Figura 3: Suero antiofídico InmunoVet Antiofídico Bivalente

- **Fisioterapia convencional (Estimulación Lumínica con Laser de Arseniuro de Galio (ELLAG) y Estimulación Eléctrica con Magnetoterapia (EEM) (FLM).**

- **Magnetoterapia**

Para la terapia con Magneto se utilizó un equipo de marca “Electromedicina Morales” de 200 Gauss de potencia, modelo MG mini 200 (Figura 4).

El equipo presenta varios programas preestablecidos para distintas patologías óseas, nerviosas y algicas. Se optó por el uso del programa preestablecido de dolor muscular que se realizó en 40 minutos totales de exposición sobre el músculo bíceps femoral.

El protocolo a seguir fue: 10 minutos a 5 hertz, 10 minutos a 10 hertz, 10 minutos a 5 hertz y 10 minutos a 10 hertz, manteniendo en todo momento 80 Gauss de potencia con emisión continua. Se colocó en el túnel magnético el tren posterior del conejo.



Figura 4: Equipo de Magnetoterapia de 200 Gauss de potencia, modelo MG mini 200

- **Laserterapia**

Para la terapia con Laser se utilizó un equipo infrarrojo para fisioterapia modelo CMV que generará una emisión de 904nm, marca Seakit, de fabricación nacional (Figura 5).

El equipo se configuro para trabajar a una dosis de 4 Jouls/cm² a 300 hertz durante 4 minutos según la tabla de uso del equipo.

La técnica de aplicación fue directa sobre el músculo lesionado en forma de pincelado deslizando el cabezal lentamente por toda la zona a tratar siempre en contacto con la piel.



Figura 5: Equipo infrarrojo Seakit modelo CMV emisión de 904 nm.

El protocolo de administración del tratamiento con fisioterapia se inició a las 24 hs post inoculación del veneno (Figura 6).



Figura 6: Se observa una sesión del tratamiento con FLM en el conejo tratado.

-Procedimiento anestésico:

Las drogas utilizadas para realizar la anestesia fueron ketamina (dosis de $20\text{mg/kg} = 0.8\text{ml}$), Midazolam (dosis de $0.3\text{ mg/kg} = 0.1\text{ml}$), vía intramuscular con aguja N°25/8 y jeringa de 1 ml. Se realizó el pesaje de los conejos, pesando ($1.600/2000\text{ kg}$) para el cálculo de las dosis

Luego se rasuro con una maquina marca Oster con cuchilla N°40 la región del antebrazo y se cateterizo con un abocath N°24 la vena cefálica anti braquial usando solución fisiológica al 0.9 % para tener una vía permeable, (Figura 7).

Previo a la inoculación del veneno se les realizo extracción de sangre de la vena yugular para la determinación de hemograma y bioquímica sanguínea

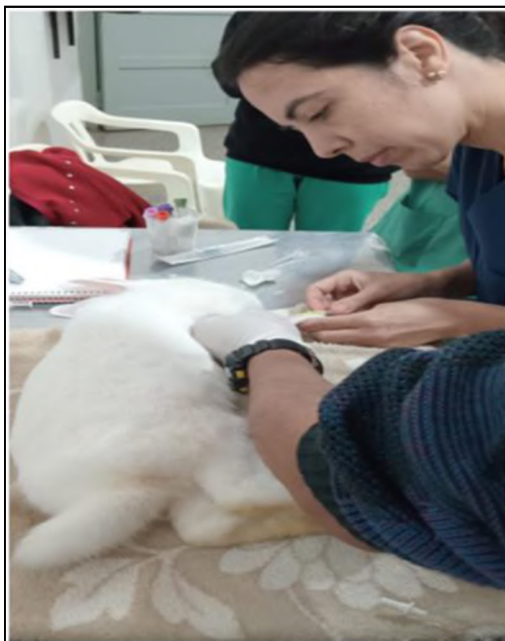


Figura 7: Cateterización de la vena cefálica anti braquial

-Procedimiento de la inoculación del veneno:

Se utilizó una peladora marca Oster cuchilla N° 40 para rasurar la zona correspondiente al musculo Bíceps Femoral del miembro posterior derecho, se procedió

a la antisepsia de la zona con alcohol al 96 % y con ayuda de un ecógrafo se inoculo el veneno vía intramuscular con aguja 25/8 y jeringa de 1 ml a una dosis de 40 µg en 0.1 ml de solución fisiológica, (Figura 8).

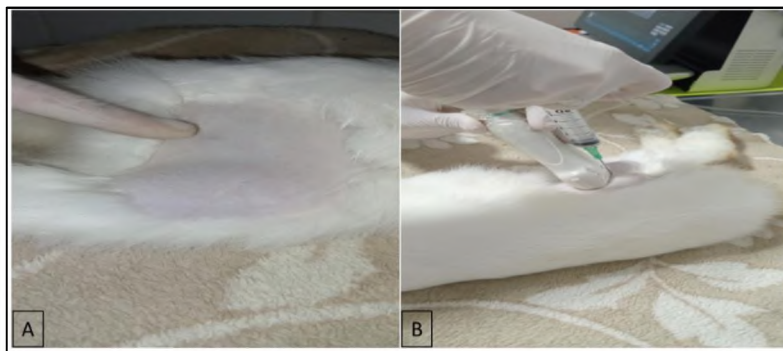


Figura 8: En A, se indica el musculo Bíceps Femoral del miembro posterior derecho. En B, inoculación del veneno ecoguiada.

A las 2 horas post inoculación con el veneno se administró suero antiofídico bivalente. Al finalizar el procedimiento se administró un analgésico (Tramadol a dosis de 2 mg/kg = 0.05 ml.).

-Evaluación del dolor en conejos

Se realizó una evaluación mediante la “Escala de muecas o expresiones faciales del conejo” (NC3Rs, 2022) (Figura 9). Esta escala mide cinco unidades de acción (ajuste orbital, aplanamiento de mejillas, forma de la fosa nasal, forma y posición de los bigotes y forma y posición de las orejas) (Keating *et al*, 2012) que aumentan en intensidad acorde al nivel de dolor percibido). El uso de esta escala concede la oportunidad de identificar los diferentes niveles de dolor que experimenta el conejo, con lo cual se podrían tomar las medidas pertinentes que ofrezcan un mejor bienestar a estos animales.

Puntuación: Cada unidad de acción facial que compone la escala se puntúa en distintas intensidades teniendo en cuenta si la expresión del dolor está ausente, moderadamente presente y obviamente presente. (Tabla 1).

Tabla 1: Clave de codificación de la acción facial. Escala: No presente 0, Moderadamente presente 1, Obviamente presente 2, Fuente: NC3Rs, 2022.

Clave de codificación de la acción facial Escala	
No presente	0
Moderadamente presente	1
Obviamente presente	2

NC3Rs

National Centre for the Replacement, Refinement & Reduction of Animals in Research



The Rabbit Grimace Scale

Research has demonstrated that changes in facial expression provide a means of assessing pain in rabbits.

The specific facial action units shown below comprise the Rabbit Grimace Scale. These action units increase in intensity in response to post-procedural pain and can form part of a clinical assessment alongside other validated indices of pain.

The action units should only be used in awake animals. Each animal should be observed for a short period of time to avoid scoring brief changes in facial expression that are unrelated to the animal's welfare.

	Action units		
	Not present "0"	Moderately present "1"	Obviously present "2"
Orbital tightening - Closing of the eyelids (narrowing of orbital area) - A wrinkle may be visible around the eye			
Cheek flattening - Flattening of the cheeks. When obviously present, cheeks have a sunken look. - The face becomes more angular and less rounded			
Nostril shape - Nostrils (nares) are drawn vertically forming a "V" rather than "U" shape - Nose tip is moved down towards the chin			
Whisker shape and position - Whiskers are pushed away from the face to "stand on end" - Whiskers stiffen and lose their natural downward curve - Whiskers increasingly point in the same direction. When obviously present, whiskers move downwards			
Ear shape and position - Ears become more tightly forked / curled (more cylindrical in shape) - Ears rotate from facing forwards the source of sound to facing towards the hindquarters - Ears may be held closer to the back or sides of the body			

Read the original paper: Keeling SCL, Thomas AA, Pritchard PN, Leach MC (2017) Evaluation of DMLA as a means for assessing pain during laboratory of rabbits. Changes in physiological, behavioural and facial expression responses. PLoS ONE 12(12): e144437. doi:10.1371/journal.pone.0144437

To request copies of this poster please email: enquiries@nc3rs.org.uk

The NC3Rs provides a range of 3Rs resources at www.3Rs.org.uk/resources

Images kindly provided by Dr Matthew Leach, Newcastle University

The Rabbit Grimace Scale would not have been developed without the continuing work of the Pain and Animal Welfare Sciences Group (PAWS) at Newcastle University

For guidance on using the Rabbit Grimace Scale, additional images of each action unit, research papers that compare the techniques, and for grimace scales in other species, visit: www.nc3rs.org.uk/grimacescales

Figura 9: Pósteres de escala de mueca (NC3Rs, 2022): <https://www.nc3rs.org.uk/3rs-resources/grimace-scales/>.

-Análisis ecográfico

Se utilizó el ecógrafo del Servicio de Imagen del Hospital Escuela Veterinario de la FCV-UNNE, Marca Mindray Zvet50 y transductor fue el microconvexo, (Figura 10).

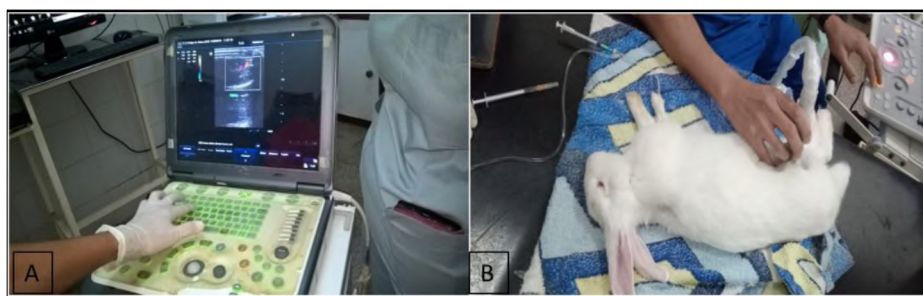


Figura 10: En A, ecógrafo Mindray Zvet50. En B, transductor microconvexo

-Análisis histopatológico

Concluido el tiempo del protocolo (28 días), se procedió a la toma de biopsia del musculo inoculado. Posteriormente se efectuó la fijación en formaldehído bufferado al 10% por el término de 24 hs. El procesamiento por las técnicas clásicas de histopatología, inclusión en parafina y coloración con Hematoxilina - Eosina y Tricrómica de Masson, se realizaron en el Servicio de Diagnóstico Histopatológico y Citológico del Hospital Escuela Veterinario de la FCV - UNNE. Las observaciones y tomas fotográficas se realizaron con microscopio Olympus.

Resultados y Discusión:

La intoxicación ofídica producida por mordedura de serpientes del género *Bothrops* es de baja letalidad (Esteso, 1985) y está ampliamente distribuida en Argentina (Ce, 1993).

Estudios previos determinaron que el veneno *Bothropico* está constituido esencialmente por enzimas Fosfolipasas A₂ (Denegri, *et al*; 2010; Gutiérrez, *et al*; 1991) y metaloproteasas (Gay, *et al*; 2005; Gutiérrez, *et al*; 1995a; Bustillo, *et al*; 2012), grupos enzimáticos responsables del desarrollo de flictenas, dermonecrosis, edema y mionecrosis

(Acosta de Pérez, *et al*; 1996a; Acosta de Pérez, *et al*; 1998; Ruíz, *et al*; 1999). En este estudio se utilizó veneno de serpiente *Bothrops alternatus* (yará grande), el cual causó lesiones locales caracterizadas por edema, hemorragias y mionecrosis, coincidente con lo descrito por los autores citados anteriormente. Estas lesiones produjeron dolor local intenso evidenciado por la claudicación de los conejos post inoculación del veneno. Esta hiperalgia se observó, en cuadros de intoxicación, en otras especies como en los equinos (Teibler, *et al*; 2022), caninos (Báez, *et al*; 2005), humano (Fernández, *et al*; 2009), bovinos (Estrada, *et al*; 2015) ratones (Cabral, *et al*; 2022). Estas alteraciones están relacionados a la instauración de secuelas permanentes en las víctimas, como disfunción funcional o la pérdida de la región corporal afectada (Gutiérrez, *et al*; 2016; Lomonte, *et al*; 2011).

Si bien los animales recibieron analgésicos (Tramadol), el dolor local perduró más tiempo en el conejo control (animal que no recibió fisioterapia), permaneciendo más quieto en su recinto. Contrariamente al conejo tratado (animal que recibió fisioterapia), luego de la tercera sesión, a las 72 hs, no se observó cambios significativos en la postura, ni tampoco adoptó posiciones antiálgicas, ya que se desplazaba libremente. La marcha lo hacía normalmente con varios pasos cuando se movía lentamente, comparando con el control, el cual se rehusaba al movimiento. El dolor fue evaluado mediante la “Escala de muecas o expresiones faciales del conejo” (NC3Rs, 2022). Al finalizar el ensayo en el conejo tratado con fisioterapia la escala fue de 0 (no presente) y 2 (obviamente presente) en el conejo control, (Figura 11). Al ir avanzando con las sesiones de fisioterapia y luego de los 15 días se pudo observar cambios conductuales positivos del conejo tratado, como ser, mayor docilidad al momento de la manipulación en las terapias. Probablemente por el grado de recuperación/regeneración muscular.

DIAS	CONEJO TRATADO(FISIOTERAPIA)	CONEJO CONTROL (VENENO)
29	0 (no presenta dolor)	2 (Obviamente presente)
		
	A	B

Figura 11: Se observa en la imagen A, el conejo tratado con fisioterapia con Escala de muecas 0 (no presente), en la imagen B el conejo control con escala 2 (obviamente presente).

-Dosaje enzimático de CPK

El veneno de serpientes del género *Bothrops* se caracteriza por la necrosis de fibras musculares en el lugar de la inoculación acompañado por hemorragia, edema e infiltrado inflamatorio (Acosta, *et al*; 1996a). El dosaje de la enzima creatinfosfoquinasa (CPK) es un indicador del daño muscular. Estudios realizados en ratones por Duque-Zerpa, *et al* 2017, evidenciaron el incremento en la actividad de la enzima CPK, entre las 3 y 15 h post tratamiento, con un valor máximo de $4001 \pm 196,58$ U/L a las 6 h, a los 6 días se observó un segundo pico ($2831,40 \pm 102,67$ U/L), el cual no retornó a los valores basales a los 7 días. En este ensayo, al finalizar el protocolo de tratamiento (29 días), se obtuvieron valores de CPK de 690 U/I en el conejo tratado con FLM y en el conejo control el valor sérico fue mayor (1.422 U/I).

-El análisis ecográfico

A través del análisis ecográfico del músculo Bíceps Femoral del conejo tratado con FLM, en corte transversal, se observó múltiples focos ecogénicos que representan el tejido conectivo entre las fibras musculares. Mientras que en un corte longitudinal se evidencio una estructura relativamente hipoecogénica, con finas estrías que representan

el tejido conectivo entre las fascias musculares. El músculo esta delineado por finas líneas hiperecogénicas que representa a la fascia que los envuelve.

En el musculo del conejo que no recibió tratamiento de fisioterapia se visualizó la interrupción de las fibras musculares, zonas hipoeecogenicas y presencia de septos ecogénicos con una alteración de su estructura normal y substitución de la imagen estriada normal por fibras engrosadas hipoeecogenicas de aspecto desorganizado (Figura 12).

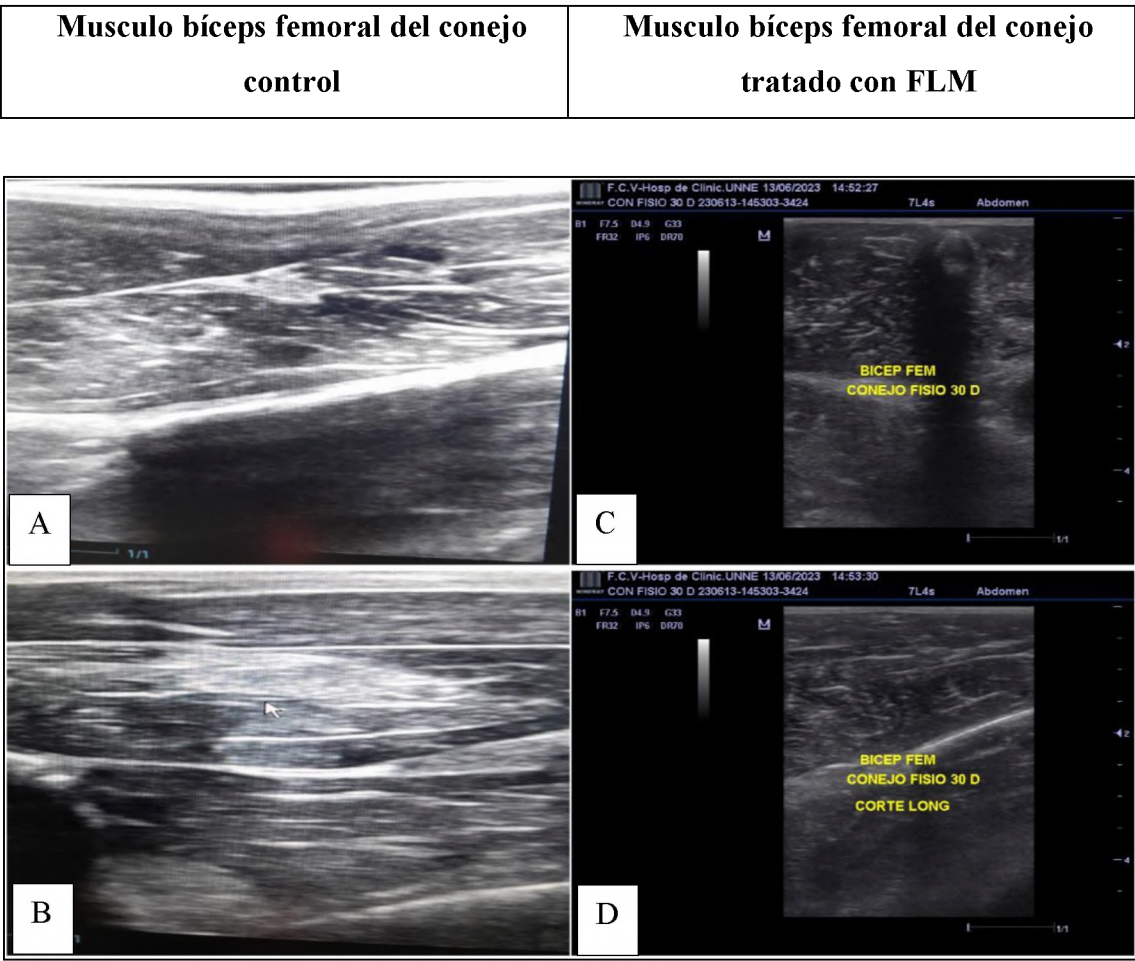


Figura 12: Imágenes ecográficas del musculo Biceps Femoral. A y B corresponden al conejo control. Se observa interrupción de las fibras musculares, zonas hipoeecogenicas y presencia de septos ecogénicos con una alteración de su estructura normal. En C y D, correspondiente al conejo tratado con FLM, se observa en corte transversal, múltiples focos ecogénicos que representan el tejido conectivo entre las fibras musculares. Mientras que en un corte longitudinal se evidencio una estructura relativamente hipoeecogénica, con finas estrias que representan el tejido conectivo entre las fascias musculares.

-El análisis histopatológico:

El veneno botrópico posee actividad proteolítica, coagulante y hemorrágica que se manifiesta por un cuadro histotóxico-hemorrágico predominantemente local (Peichoto, 2014). La mionecrosis y el exudado inflamatorio es característico del accidente Bothropico (Maruñak, *et al*; 1999). A nivel experimental, la actividad miotóxica de este veneno es consecuencia fundamentalmente de la acción de miotoxinas, presentes en una alta concentración en el veneno (Gutiérrez, *et al*; 1984). En 1989, el mismo autor hace mención de 4 grupos proteicos responsables de la mionecrosis con pesos moleculares alrededor de 13.000 daltons, algunas de las cuales tienen actividad Fosfolipasa A.

Estas miotoxinas actúan directamente sobre la membrana plasmática de las células musculares (Gutiérrez, *et al*; 1986; Brenes, *et al*; 1987). Ya en el año 1976, Wrogemann y Pena, hicieron referencia sobre lesiones de la membrana plasmática, que conllevan a un marcado influjo de calcio. Este aumento en la concentración citosólica de calcio resulta, entre otras cosas, en hipercontracción de los miofilamentos, envenenamiento mitocondrial y activación de proteasas y fosfolipasas calcio-dependientes, todo lo cual redundan en la muerte celular. En este ensayo la evaluación de la miotoxicidad, a los 29 días, a través de la tinción de hematoxilina-eosina evidencio fibras musculares necróticas en ambos conejos, siendo con mayor intensidad en el conejo que no recibió tratamiento con FLM (Figura13).

Si bien las miotoxinas son responsables de la mayor parte de la necrosis muscular, varios autores indican que hay una proporción de fibras musculares que se afectan como consecuencia de la isquemia, la cual se produce en el músculo envenenado debido a la drástica alteración de la microvasculatura originada por el veneno (Gutiérrez, *et al*; 1984; Acosta de Pérez, *et al*; 1998; Bustillo, *et al*; 2012; Gay, *et al*; 2005; García Denegri, *et al*; 2019).

En el año 2005, Gay y colaboradores, aislaron una metaloproteinasa cuya masa molecular fue de alrededor de 55 kDa, y exhibió una actividad hemorrágica con una dosis hemorrágica mínima de 1,9 µg, casi dos veces menor que el veneno completo (3,6 µg). La enzima aislada presentó actividad miotóxica con niveles elevados de CK a las 6 h, debido a isquemia local producto de su actividad hemorrágica, la cuales degradan el colágeno tipo IV presente en la lámina basal de los vasos capilares, y un importante efecto inductor de edema, corroborados ambos resultados mediante observaciones histológicas

de muestras de músculo gastrocnemio. En nuestro ensayo, a través del análisis histopatológico, y con tinción de Hematoxilina-Eosina, se observó en el musculo del conejo control, mionecrosis, hemorragia interfibrilar, infiltrado inflamatorio mononuclear y edema (Figura 13 A y B) y a través de la tinción Tricrómica de Masson se evidencio mínima presencia de fibras colágenas Tipo I (Figura 13 C). En el musculo del conejo tratado con FLM, con tinción de Hematoxilina-Eosina, no se evidencio hemorragia ni infiltrado inflamatorio a los 29 días, en cambio el edema y la necrosis muscular, si bien estuvo presente fue en menor grado comparando con el control (Figura 14 AyB) y a través de la tinción Tricrómica de Masson se evidencio mayor presencia de fibras colágenas Tipo I (Figura 14 C). Estos resultados coinciden con lo observado por Teibler y colaboradores (2001); quienes observaron que la reacción inflamatoria disminuyo recién después de 6 semanas (42 días), en musculo gastronemio de ratones inoculados con veneno de *Bothrops jararacussu*.

La regeneración muscular producida por veneno de serpientes del género *Bothrops* varía según la especie ofídica responsable de la intoxicación. Así *Bothrops jararacussu* induce a una regeneración parcial (Teibler, *et al*; 2001); en cambio el tejido muscular dañado por veneno de *B. alternatus* posee una mayor eficacia al momento de regenerarse probablemente por presentar mayor actividad de metaloproteinasa de la clase P-III denominada Baltergina () y menor actividad de PLA₂ (Cardozo, *et al*; 2010). En los cortes histológicos de los conejos tratado con FLM, se observó un leve incremento de fibras de regeneración en comparación con el musculo de conejo control, coincidiendo con los autores citados anteriormente y con García Denegri, y colaboradores, 2016, donde observaron a la cuarta semana (28 días) áreas de regeneración de fibras musculares y tejido de granulación en musculo gastronemio de ratones inoculados con veneno de *B. alternatus*.

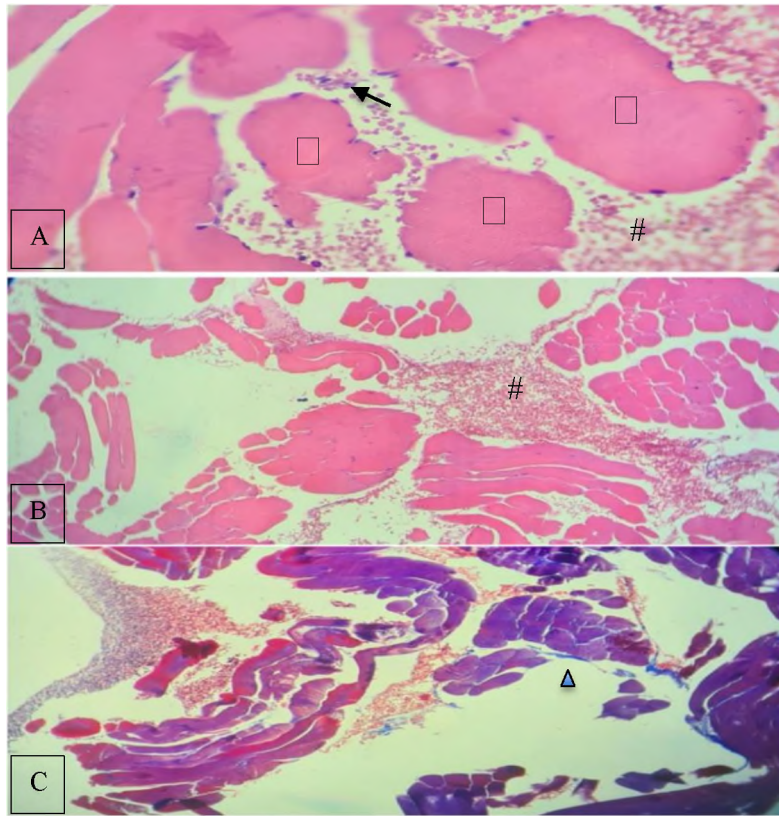


Figura 13: Corte histológico de musculo Bíceps Femoral del conejo que no recibió tratamiento con FLM. En A y B se observa corte transversal de fibras musculares con necrosis (□), hemorragia interfibrilar (#), edema e infiltrado inflamatorio (*) (H-E 100x y 400x). En C, se observa con tinción Tricrómica de Masson mínima presencia de fibras colágenas Tipo I (Tinción Tricromica de Masson (Δ)100x).

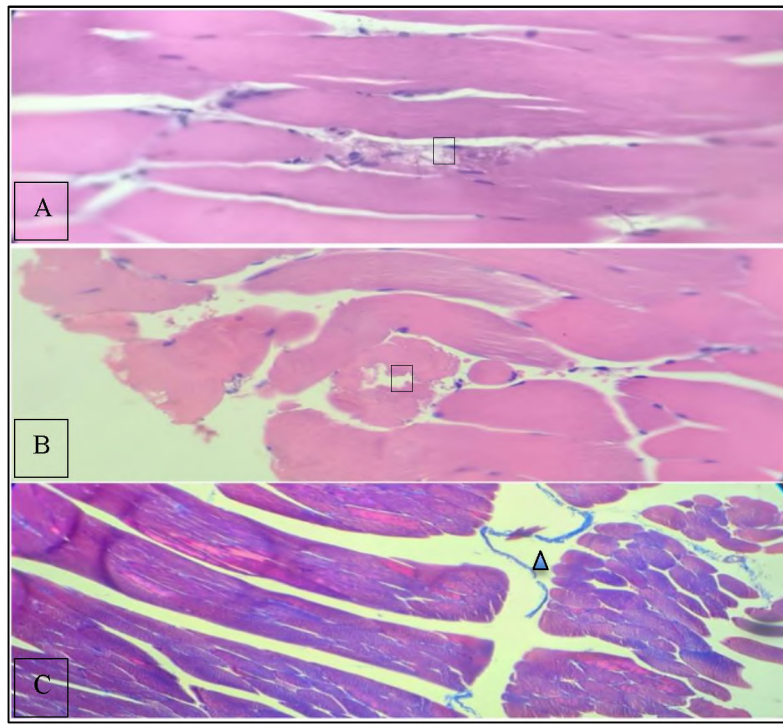


Figura 14: Corte histológico de musculo Biceps Femoral del conejo tratado con FLM. En A y B se observa corte longitudinal de fibras musculares con necrosis miolítica (□) y edema. (H-E 100x). En C, se observa con tinción Tricrómica de Masson moderada presencia de fibras colágenas Tipo I (Tinción Tricrómica de Masson (Δ) 100x).

Conclusión:

El ofidismo en mamíferos, causado por serpientes del género *Bothrops* se caracteriza, por un prominente efecto local (edema, hemorragia y necrosis de tejido muscular) y sistémico (alteración de la coagulación y hemorragia). Entre los componentes de estos venenos las miotoxinas afectan a las fibras musculares. Las hemorraginas lesionan la microvasculatura local y sistémica, y otras sustancias como los eicosanoides inducen a edema incrementando la presión tisular local. Además, participan mediadores endógenos, liberados por tejidos tales como histaminas, prostaglandinas, kininas.

Algunas de las secuelas más significativas del envenenamiento por mordedura de *Bothrops* es la pérdida de tejido, fibrosis y dificultades motoras debido a la mionecrosis. La regeneración muscular puede desarrollarse en algunos casos con recuperación estructural y funcional, mientras que en otros casos es incompleta. Para que el proceso de regeneración se desarrolle con éxito debe existir un flujo sanguíneo

adecuado, presencia de innervación en células regenerativas y permanencia de la lámina basal alrededor de las fibras musculares necróticas. Al faltar alguno de estos requisitos básicos la regeneración será deficiente.

En el presente trabajo se estudió la regeneración muscular a través de técnicas ecográficas, histopatológicas y dosaje de CPK, del músculo Bíceps Femoral de conejo sometido a fisioterapia convencional (Estimulación Lumínica con Laser de Arseniuro de Galio (ELLAG) y Estimulación Eléctrica con Magnetoterapia (EEM) a los 29 días post inoculación de veneno.

Como resultado se pudo observar que tanto las imágenes ecográficas e histopatología revelaron que el conejo control presentaba lesión muscular coincidente con el aumento sérico de la enzima CPK. En tanto que en el conejo tratado con FLM, si bien se evidencio daño muscular, este fue notablemente menor, como así también disminuyo el valor enzimático de la enzima creatinfosfoquinasa. Esto indica que no todas las fibras se regeneraron, lo que puede verse como una secuela funcional del músculo lesionado.

En conclusión, el tratamiento con fisioterapia convencional redujo significativamente los parámetros evaluados, siendo eficaz para reducir los efectos locales inducidos por el veneno de *B. alternatus* y es una herramienta útil como tratamiento adyuvante para el envenenamiento botrópico.

Bibliografía:

- Acosta de Pérez, O; Koscinczuk, P; Sánchez Negrette, M; Teibler, P; Ruíz, R. Efectos del veneno de *Bothrops alternatus* de Argentina sobre músculo y distintos órganos en ratones. APPTLA, 46: 97-102, 1996a.
- Acosta de Pérez, O; Koscinczuk, P; Flinta, S; Maidana, HR; Teibler, GP. Descripción de tres casos de intoxicación ofídica. Selecciones Veterinarias 4 pp.32-35, 1996b.
- Acosta de Pérez, O; Maruñak, S; Ruíz, R; Koscinczuk, P; Teibler, P. Hemorragia inducida por veneno de serpientes de Argentina. APPTLA, 47: 221-224, 1997a.
- Acosta de Pérez, O; Koscinczuk, P; Teibler, P; Sánchez Negrette, M; Ruiz, R; Maruñak, S; Bogarín, S. Actividades hemorrágica y edematizante y alteraciones histológicas en almohadilla plantar del ratón inducidas por venenos de serpientes de los géneros *Bothrops* y *Crotalus* de Argentina. Toxicon. 36:1165-1172, 1998.
- Báez, A; Teibler, P; Merlo, W; Burna, A; Acosta Badaró, M; Solana, M; Infuleski, R; Acosta de Pérez, O: Lesiones sistémicas en un canino por intoxicación ofídica. Rev. Vet. 16: 2, 95–98, 2005.
- Brenes, F; Gutiérrez, JM; Lomonte, B. Immunohistochemical demonstration of the binding of *Bothrops asper* myotoxin to skeletal muscle sarcolemma. Toxicon 25: 574, 1987.
- Bustillo, S; Gay, CC; García Denegri, ME; Ponce-Soto, LA; Bal de Kier, JE; Acosta, OC; Leiva, LC. Synergism between baltergin metalloproteinase and Ba SPII RP4 PLA₂ from *Bothrops alternatus* venom on skeletal muscle (C2C12) cells. Toxicon 59 338–343, 2012.
- Ceí, JM. Reptiles del noroeste, nordeste y este de la Argentina. Monografía, Museo Regional de Ciencias Naturales, Torino, p. 715, 1993.
- Cabral, DA; Gonçalves Silva, LM; García Denegri, ME; Leiva, LC; Silva, JAJ; Pavan Zuliani, J; Zamuner, SR. Photobiomodulation therapy on local effects induced by juvenile and adult venoms of *Bothrops alternatus*. Toxicon Vol 220, 2022.
- Cardoso, KC; Da Silva, MJ; Costa, GG; Torres, TT; Del Bem, LEV; Vidal, RO; Menossi, M; Hyslop, S. A transcriptomic analysis of gene expression in the venom gland of the snake *Bothrops alternatus* (urutu). BMC Genomics, 11(1), 605. [<http://dx.doi.org/10.1186/1471-2164-11-605>] [PMID: 20977763, 2010].

- Duque-Zerpa, CT; Scannone-Tempone, H; Varga, A. Alteraciones en marcadores séricos de lesión tisular en ratones tratados con el veneno de la serpiente *Bothrops Colombiensis* (Paracotos, Estado Miranda, Venezuela). <https://www.redalyc.org/journal/959/95955158002/html/>, 2017.
- Estesio, SC. Ofidismo en la República Argentina, Ed. Arpon, Cordoba, Argentina, p. 61-64, 1985.
- Estrada Gómez, S; Quintana Castillo, JC; Vargas Muñoz, LJ. Accidente ofídico en animales de pastoreo: acercamiento epidemiológico, clínico y de manejo. Rev Med Vet (27):149-161, 2014.
- Fernández, ML; De Belaustegui, EA; Servín, RE. Mordedura de yarará en pacientes pediátricos. Revista de la Facultad de Medicina, revistas.unne.edu.ar, Vol. 29, Núm. 1, 2009.
- Francis, B; Gutiérrez, JM; Lomonte, B; Kaiser, II. Archives of biochemistry and biophysics. 284: 352-359, 1991.
- Gay, CC; Leiva, LC; Maruñak, S; Teibler, P; Acosta de Pérez O. Proteolytic, edematogenic and myotoxic activities of a hemorrhagic metalloproteinase isolated from *Bothrops alternatus* venom. Toxicon. Volume 46:546-554, 2005.
- García Denegri, ME; Acosta, OC; Huancahuire-Vega, S. Isolation and functional characterization of a new acidic PLA₂ Ba SpII RP4 of the *Bothrops alternatus* snake venom from Argentina. Elsevier. Toxicon. 56(1):64-74, 2010.
- García Denegri, ME; Teibler, GP; Maruñak, SL; Hernández, DR; Acosta, OC; Leiva, LC. Efficient muscle regeneration after highly haemorrhagic *Bothrops alternatus* venom injection. Toxicon, Volume 122, Pages 167-175, ISSN 0041-0101, <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2016.10.005>. 2016.
- García Denegri, ME; Bustillo, S; Gay, CC; Van De Velde, A; Gómez, G; Echeverría, S; Gauna Pereira, MDC; Maruñak, S; Núñez, S; Bogado, F; Sánchez, M; Teibler, GP; Fusco, L; Leiva, LCA. 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, volumen 19, número 22, 1962-1980, 2019.
- Gay, C.C; Marunak, SL; Teibler, P; Ruiz, R; Acosta de Pérez, OC; Leiva, LC. Systemic alterations induced by a *Bothrops alternatus* hemorrhagic metalloproteinase (baltergin) in mice. Toxicon 53, 53-59, 2009.

- Gutiérrez JM; Ownby, C; Odell, G: Isolation of a myotoxin from *Bothrops asper* venom: Partial characterization and action on skeletal muscle. *Toxicon* 22: 115, 1984.
- Gutiérrez, JM; Lomonte, B; Chaves, F. Pharmacological activities of a toxic phospholipase A isolated from the venom of the snake *Bothrops asper* *Comp. Biochem. Physiol.* 84C: 159, 1986.
- Gutiérrez, JM. Regeneración muscular posterior a mionecrosis inducida por veneno de la serpiente *Bothrops asper* (terciopelo): nuevas posibilidades para enfrentar un viejo problema. *Rev. Méd. Hosp. Nal. Niños Costa Rica* 1 y 2 (24): 1-10, 1989.
- Gutiérrez, JM; Núñez, J; Díaz, C; Cintra, AC; Homsí-Brandeburgo, MI; Giglio, JR. Skeletal muscle degeneration and regeneration after injection of bothropstoxin-ii, a phospholipase A₂ isolated from the venom of the snake *Bothrops jararacussu*. *Exp Mol Pathol.* 55, 217-229, 1991.
- Gutierrez, JM; Romero, M; Nuñez, J; Chaves, F; Borkow, G; Ovadia, M. Skeletal muscle necrosis and regeneration after injection of bahl, a hemorrhagic metalloproteinase isolated from the venom of the snake *Bothrops asper* (terciopelo). *Exp. Mol. Pathol.* 62, 28-48, 1995a.
- Gutiérrez, JM; Lomonte, B. Phospholipase A₂ myotoxins from *Bothrops* snake venoms. *Toxicon*, 33, 1405-1424, 1995b.
- Gutiérrez, JM; Escalante, T; Rucavado, A; Herrera, C Hemorrhage caused by snake venom metalloproteinases: A journey of discovery and understanding. *Toxins.* 8 (4): 93, 2016.
- Keating, SCJ; Thomas, AA; Flecknell, PA; Leach, MC. Evaluation of EMLA cream for preventing pain during tattooing of rabbits: changes in physiological, behavioural and facial expression responses. *PLOS ONE*, 1–11. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0044437>, 2012.
- Lomonte, B; Gutiérrez, JM. Phospholipases A₂ from viperidae snake venoms: How do they induce skeletal muscle damage? *Acta Chim. Slov.* 58: 647-659, 2011.
- Maruñak, SL; Acosta de Pérez, O; Ruíz de Torrent, RM; Teibler, GP; Koscinczuk, P; Sánchez Negrette, M. Actividades hemorrágicas, edematizante, proteolítica y mionecrótica de venenos de viboreznos de *Bothrops alternatus* (víbora de la Cruz) / Hemorrhagic, edema-forming, proteolytic and myonecrotic activities of viper venoms of *Bothrops alternatus* (Víbora de la Cruz). *Acta physiol. pharmacol. ther. latinoam* : 49(3): 149-54, 1999.

- NC3Rs. Grimace scale: Rabbit. <https://www.nc3rs.org.uk/3rs-resources/grimace-scales/grimace-scale-rabbit>, 2022.
- Ruíz, R.; Acosta, O; Koscinczuk, P; Teibler, P; Maruñak, S. Actividades tóxicas y enzimáticas del veneno de *Bothrops moojeni* de Argentina. APPTLA 49 (3), 177-183, 1999.
- Patiño C, Blanca S. Serpientes Venenosas. Volumen III. Número 5, 2002.
- Peichoto, ME; Salomon, OD. La problemática del ofidismo en la región Nordeste de Argentina: una mirada científica integradora. Ministerio De Salud De La Nación – INMeT. <http://iah.salud.gob.ar/doc/Documento43.pdf>. 2014.
- Teibler, P; Acosta de Pérez, O; Maruñak, S; Sánchez Negrette, M; Ortega, H. Muscular regeneration after myonecrosis induced by *Bothrops jararacussu* snake venom from Argentina. Biocell 25, 257-264, 2001.
- Teibler, GP; Marunak, LS; Bogado, EF; Pollitt, C. Equine laminitis *in vitro* induced by whole snake poison and Fosfolipasa A₂ of *Bothrops alternatus* from Argentina. Rev. vet. [online]. vol.33, n.2, pp.146-151. ISSN 1669-6840. <http://dx.doi.org/10.30972/vet.3326174>, 2022.
- Wrogemann, K; Pena, S. Mitochondrial calcium overload: A general mechanism for cell-necrosis in muscle diseases. Lancet 1: 672, 1976.