



UNIVERSIDAD DE ORIENTE
NÚCLEO DE ANZOÁTEGUI
ESCUELA DE CIENCIAS DE LA SALUD
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FISIOLÓGICAS
SECCIÓN DE FARMACOLOGÍA

**CAMBIOS HISTOLOGICOS CAUSADOS POR EL VENENO DEL
PEZ SAPO *Thalassophryne maculosa* (PISCES,
BATRACHOIDIDAE) EN TEJIDO AORTICO Y RENAL DE
RATONES C57BL/6**

Asesores:

Trabajo de Grado presentado por:

Aleikar Vásquez-Suárez

Pereira Carbonara, Vito Alejandro

Leonardo De Sousa

Como requisito parcial para optar al título de Médico Cirujano

Barcelona, junio de 2013



UNIVERSIDAD DE ORIENTE
NÚCLEO DE ANZOÁTEGUI
ESCUELA DE CIENCIAS DE LA SALUD
COMISIÓN DE TRABAJO DE GRADO

DECLARACIÓN JURADA

El Trabajo de Grado presentado por el Estudiante Universitario **Pereira Carbonara, Vito Alejandro** C. I. N° V-17.721.962, titulado “**CAMBIOS HISTOLOGICOS CAUSADOS POR EL VENENO DEL PEZ SAPO *Thalassophryne maculosa* (PISCES, BATRACHOIDIDAE) EN TEJIDO AORTICO Y RENAL DE RATONES C57BL/6**”, ha sido aprobado por los miembros del Jurado Evaluador, quienes lo han encontrado correcto en su contenido y forma de presentación; asimismo, declaran que los datos presentados son responsabilidad exclusiva de los autores, en fe de lo cual firman:

Prof. Irene Rodríguez
Miembro Principal

Prof. Mercedes Matos
Miembro Principal

Prof. Aleikar Vásquez-Suárez
Miembro Principal Asesor

Prof. Leonardo De Sousa
Miembro Principal Asesor

Profa. Rosibel Villegas
Coordinadora Comisión de Trabajos de Grado
Escuela de Ciencias de la Salud

JUNIO 2013

RESUMEN

CAMBIOS HISTOLOGICOS CAUSADOS POR EL VENENO DEL PEZ SAPO *Thalassophryne maculosa* (PISCES, BATRACHOIDIDAE) EN TEJIDO AORTICO Y RENAL DE RATONES C57BL/6

Pereira Carbonara, Vito A. Asesores: Vásquez-Suárez, Aleikar y De Sousa, Leonardo. Laboratorio de Toxinología, Grupo de Investigación en Toxinología Aplicada y Animales Venenosos, Escuela de Ciencias de la Salud, Núcleo de Anzoátegui, Universidad de Oriente.

Ejemplares del pez sapo *Thalassophryne maculosa* fueron capturados en aguas someras del Parque Nacional La Restinga, estado Nueva Esparta, Venezuela. El veneno se obtuvo por ordeño manual de las espinas dorsales y operculares. La DL_{50} del veneno, para una hora de experimentación, fue determinada por el método secuencial de Dixon y Mood. Se escogió al azar, cuatro ratones hembra de la cepa C57BL/6. Se administró por vía intraperitoneal una DL_{50} de veneno de *Thalassophryne maculosa* equivalente a $70,8 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ de ratón. Luego fueron evaluados durante sesenta minutos, obteniendo una frecuencia de mortalidad de 50% ($n = 2$). El tiempo de aparición de las manifestaciones clínicas inducidas por el veneno fue gradual presentando de forma inmediata hiperactividad y taquipnea, seguida de hipoactividad y distensión abdominal para suceder, alrededor de los 30 minutos del curso temporal de toxicidad, periodos de bradipnea/apnea a la cual sobreviene la muerte. Los ratones fallecidos se utilizaron para evaluar los cambios histológicos en el tejido aórtico y renal causados por efecto tóxico del veneno.

En el tejido aórtico de los ratones C57BL/6 inyectados con una DL_{50} de veneno *Thalassophryne maculosa*, los cambios histológicos más significativos fueron degeneración mixoide entre las fibras elásticas de la capa media, lesión del endotelio vascular con presencia de material fibrinoide, ruptura de las fibras elástica con pérdida de la arquitectura de la capa media, material fibrino-hemático adherido a la luz de los vasos, macrófagos cargados de hemosiderina, edema interfibrilar de la capa media, recanalización de trombos arteriales y oclusión de la luz vascular. En tejido renal se observó parénquima cortical renal con presencia de glomérulos con cambios degenerativos, necrosis hemorrágica, área renal de transición cortico-medular con presencia de hemorragia en el intersticio, colapso de los capilares glomerulares con necrosis fibrinoide, trombosis vascular, penacho glomerular congestivo, degeneración glucogénica de las células de los túbulos renales con presencia de material eosinofílico amorfo en la luz de los túbulos renales y arteriolas eferentes congestiva.

DEDICATORIA

A Dios quien ha sido guía en cada uno de mis pasos, mi fortaleza en los momentos difíciles y mi protector.

A mis padres SINA CARBONARA Y JOSE PEREIRA por ser pieza fundamental en mi vida, por estar siempre ahí cuando los he necesitado, por todos sus sacrificios y por su apoyo incondicional para ayudarme alcanzar cada una de mis metas. Gracias por sus consejos, por su amor y por hacerme crecer cada día como persona.

A mis Abuelos, VITO CARBONARA Y RAMONA RAMOS por inculcarme los valores del respeto, la responsabilidad y la paciencia. Y, estar siempre velando por mí, por sus palabras de apoyo en todo momento y por su inmenso amor.

A mis hermanos Víctor y José Pereira por estar siempre hay para mí, por quererme como soy.

A mi esposa Josycarly Girart de Pereira, ha sido mi amiga y compañera incondicional durante todos estos años. Gracias por tus consejos, por preocuparte por mí y por ser mi sostén en mis momentos de dificultad.

Vito Pereira Carbonara

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad de Oriente y Escuela de Ciencias de la Salud, Núcleo de Anzoátegui, por ser nuestra segunda casa y brindarnos la oportunidad de formar parte de su gran Comunidad Académica.

Al Laboratorio de Toxinología y Grupo de Investigación en Toxinología Aplicada y Animales Venenosos, Escuela de Ciencias de la Salud, Núcleo Anzoátegui, por permitirnos el desempeño y elaboración de nuestro Trabajo de Grado.

La realización de este trabajo fue posible debido a la contribución de muchas personas, quienes con sus valiosos aportes, sugerencias, estímulos y disposición lograron que el mismo llegara a un feliz término.

A mis tutores Aleikar Vásquez-Suárez y Leonardo De Sousa por su dedicación, colaboración, apoyo, paciencia, sabiduría, conocimientos, inteligencia y pedagogía en la elaboración de nuestro proyecto de investigación.

A la Dra. Irene Rodríguez por su incalculable ayuda en el desarrollo de este trabajo.

A todas aquellas personas que contribuyeron en la realización del presente trabajo, mis más profundos agradecimientos

Vito Pereira Carbonara

ÍNDICE GENERAL

	Página
DECLARACIÓN JURADA	ii
RESUMEN.....	iii
DEDICATORIA	iv
AGRADECIMIENTOS	v
ÍNDICE GENERAL	vi
ÍNDICE DE FIGURAS.....	viii
INTRODUCCIÓN	10
CAPÍTULO I.....	11
EL PROBLEMA.....	11
OBJETIVOS	12
Objetivo general	12
Objetivos específicos.....	12
CAPÍTULO II	13
MARCO TEÓRICO.....	13
CAPÍTULO III.....	16
MARCO METODOLÓGICO.....	16
Obtención y purificación parcial del veneno	16
Designación de una DL ₅₀ como dosis controlada del veneno de <i>Thalassophryne maculosa</i>	17
Evaluación de los signos de toxicidad aguda experimental y su curso temporal de aparición	18

Descripción de los cambios histológicos agudos en tejido aortico y renal de ratones C57BL/6, causados por la inyección intraperitoneal del veneno de <i>Thalassophryne maculosa</i>	18
CAPÍTULO IV	20
ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS Y DISCUSIÓN	20
Resultados.....	20
Curso temporal de toxicidad aguda experimental.....	20
Hallazgos histológicos normales.....	21
Descripción histológica del tejido aortico y renal posterior a la inyección de una DL ₅₀ de veneno de <i>Thalassophryne maculosa</i> en ratones de la cepa C57/BL6.....	24
Discusión	34
CAPÍTULO V	37
CONCLUSIONES	37
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	38
HOJA DE METADATOS PARA TESIS Y TRABAJOS DE ASCENSO	42

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Determinación de la Dosis Letal Cincuenta (DL ₅₀) del veneno de <i>Thalassophryne maculosa</i> (Pisces, Batrachoididae) por vip en ratones hembra C57BL/6.....	17
Figura 2. Curso temporal de aparición de los signos de toxicidad aguda experimental inducidos por el veneno de <i>Thalassophryne maculosa</i> administrado por vip en ratones C57BL/6.....	21
Figura 3. Tejido renal correspondiente a un ratón control C57BL/6.....	22
Figura 4. Sección de corteza renal correspondiente a ratón control C57BL/6.....	23
Figura 5. Corte longitudinal de tejido aórtico de ratón C57/BL6 inyectado con una DL ₅₀ del veneno de <i>Thalassophryne maculosa</i> teñido con hematoxilina-eosina a 10x.....	24
Figura 6. Corte longitudinal de tejido aórtico de ratón C57/BL6 inyectado con una DL ₅₀ del veneno de <i>Thalassophryne maculosa</i> teñido con hematoxilina-eosina a 40x.....	25
Figura 7. Corte tangencial de tejido aórtico de ratón C57/BL6 inyectado con una DL ₅₀ del veneno de <i>Thalassophryne maculosa</i> teñido con hematoxilina-eosina a 4x.....	26
Figura 8. Corte longitudinal de tejido aórtico de ratón C57/BL6 inyectado con una DL ₅₀ del veneno de <i>Thalassophryne maculosa</i> teñido con hematoxilina-eosina a 10x.....	27
Figura 9 Corte transversal de tejido aórtico de ratón C57/BL6 inyectado con una DL ₅₀ del veneno de <i>Thalassophryne maculosa</i> teñido con hematoxilina-eosina a 10x.....	28
Figura 10. Corte longitudinal de tejido renal de ratón C57BL/6 inyectado con una DL ₅₀ del veneno de <i>Thalassophryne maculosa</i> teñido con hematoxilina-eosina a 4x.....	29

Figura 11. Corte longitudinal de tejido renal de ratón C57BL/6 inyectado con una DL ₅₀ del veneno de <i>Thalassophryne maculosa</i> teñido con hematoxilina-eosina a 40x.....	30
Figura 12. Corte longitudinal de tejido renal de ratón C57BL/6 inyectado con una DL ₅₀ del veneno de <i>Thalassophryne maculosa</i> teñido con hematoxilina-eosina a 40x.....	31
Figura 13. Corte longitudinal de tejido renal de ratón C57BL/6 inyectado con una DL ₅₀ del veneno de <i>Thalassophryne maculosa</i> teñido con hematoxilina-eosina a 40x.....	32
Figura 14. Corte longitudinal de tejido renal de ratón C57BL/6 inyectado con una DL ₅₀ del veneno de <i>Thalassophryne maculosa</i> teñido con hematoxilina-eosina a 4x.	33

INTRODUCCIÓN

En este trabajo se evaluaron los cambios histológicos observados en aorta y riñones de ratones C57BL/6 inducidos por efecto tóxico del envenenamiento agudo experimental causado por el veneno de *Thalassophryne maculosa*. Para tal fin, se administró en ratones hembra C57BL/6, por vía intraperitoneal y para 60 minutos de experimentación, una DL₅₀, como dosis controlada del veneno de *Thalassophryne maculosa* [obtenida por el método secuencial de Dixon y Mood (1948) modificado (Sevcik, 1987)],

Con base en lo expuesto anteriormente, este trabajo se elaboró de acuerdo con los siguientes capítulos:

El capítulo I, denominado el problema, en el cual se plantea la pregunta de investigación, a raíz de ello surgen las interrogantes que dan paso a la formulación del objetivo general y los objetivos específicos. También contempla la justificación e importancia y los alcances de la investigación. Seguidamente, en el capítulo II se expone el marco teórico, en el cual se presenta los antecedentes de la investigación relacionados con estudios previos que tienen relación con el problema planteado. Además, comprende las bases teóricas donde se citan distintos autores sobre los conceptos y puntos relevantes del tema de estudio y los objetivos planteados. El capítulo III, está dirigido a describir e interpretar la naturaleza de la investigación, estableciendo el tipo, modelo y diseño de la misma. Luego, el capítulo IV referido al análisis de la investigación, consiste en interpretar cada uno de los objetivos para obtener respuestas a las interrogantes surgidas en el planteamiento del problema. En el capítulo V, se desarrollan las conclusiones obtenidas.

CAPÍTULO I

EL PROBLEMA

En las costas venezolanas, especialmente las del oriente del país, tanto pescadores artesanales como turistas y deportistas, son víctimas frecuentes de accidentes con diversos animales marinos (Boccalon y col., 2004). Sin embargo, la carencia de datos epidemiológicos no permite, al presente, conocer la verdadera magnitud de la incidencia de estos casos y por ende, su relevancia (Boccalon y col., 2004; Gutiérrez y col., 2004; Loyo y col., 2008).

El desarrollo de este trabajo se justificó con base en la inexistencia de investigaciones experimentales previas sobre la evaluación de alteraciones histológicas agudas desarrolladas en tejido aórtico y renal de ratones C57BL/6, como consecuencia del efecto tóxico del envenenamiento agudo experimental con el veneno de *Thalassophryne maculosa*. Por este motivo fue de gran interés para el Laboratorio de Toxinología del Grupo de Investigación en Toxinología Aplicada y Animales Venenosos (GITAAV) de la Universidad de Oriente, Núcleo de Anzoátegui, la realización del presente proyecto, ya que constituye la continuidad en la adquisición de información en el área histopatológica, que permitiría comprender de forma integral los accidentes causados por el pez sapo en la región costera venezolana.

OBJETIVOS

Objetivo general

Evaluar los cambios histológicos agudos en tejido aórtico y renal de ratones hembra C57BL/6, causados como respuesta de toxicidad aguda experimental a una dosis controlada del veneno del pez sapo *Thalassophryne maculosa*, inyectado por vía intraperitoneal.

Objetivos específicos

1. Designar la DL_{50} , como dosis controlada, del veneno de *Thalassophryne maculosa* para la cepa de ratón C57BL/6.
2. Establecer, en la cepa de ratón C57BL/6, los signos clínicos de toxicidad aguda experimental y su curso temporal de aparición, durante sesenta minutos, inducidos como efecto tóxico de la inyección intraperitoneal de una dosis controlada de veneno de *Thalassophryne maculosa*.
3. Determinar los cambios histológicos agudos como efecto de toxicidad aguda experimental del veneno de *Thalassophryne maculosa* en tejido aórtico y renal de ratones C57BL/6.

CAPÍTULO II

MARCO TEÓRICO

Las costas venezolanas, por su ubicación relativa en la zona tropical, presentan gran variedad de especies de vertebrados o invertebrados, marinos o dulceacuícolas, que pueden ocasionar diferentes tipos de interacción con el hombre, potencialmente negativas, caracterizadas por dolor, envenenamiento, reacciones alérgicas, trastornos psicológicos y hasta la muerte (Machado-Allison y Rodríguez-Acosta, 1997; Boccalon y col., 2004; Gutiérrez y col., 2004; Loyo y col., 2008).

Los animales marinos que causan, activa o pasivamente, lesiones debido a la presencia de glándulas de veneno, en conjunto con un mecanismo estructural para la inyección del mismo, se encuentran confinados a un reducido número de especies definidas por Halstead (1978) como peces venenosos o acantotóxicos. En este caso, el accidente humano causado por éstos se denomina ictismo y sus mecanismos fisiopatológicos, poco conocidos, representan un problema económico y social, agravado por la ausencia de tratamientos eficientes, desconocimiento relativo sobre la composición y naturaleza de sus venenos y los mecanismos de acción de sus componentes (Lima y Ferreira, 2000; Haddad Junior, 2003; Haddad Junior y col., 2003).

Los venenos de peces son mezclas complejas de sustancias específicas, farmacológicamente activas que pueden causar una amplia gama de signos clínicos en los humanos, los cuales pueden ser agrupados en siete categorías: locales, autofarmacológicos, antihemostáticos, neurológicos, musculares, cardíacos y de efectos renales (Junghanss y Bodio, 2006). Muchos géneros de Uranoscópidos son bentónicos y venenosos al igual que los Batracóidos, dentro de los que se encuentra

el género *Thalassophryne*. Algunos de sus taxas están provistos de dos espinas dorsales rodeadas en su parte basal por tejido glandular, que vacía su contenido hacia espinas huecas, para eyectar el veneno. Adicionalmente, las espinosas operculares también son utilizadas como órganos defensivos venenosos.

El envenenamiento causado por *Thalassophryne maculosa* inicia con intensa inflamación, eritema, edema y dolor local persistente, en algunos casos con necrosis alrededor del área de penetración de las espinas y en algunas ocasiones acompañadas con infecciones secundarias (Sosa-Rosales y col., 2005). El dolor, con poca respuesta a fármacos antiinflamatorios y analgésicos, suele persistir hasta por 24 horas (Lima y Ferreira, 2000); predominando posteriormente síntomas parestésicos en el miembro afectado. Los síntomas dependen de la cantidad de veneno eyectado por el pez, así como por el tamaño, el peso y la inmuno-reactividad de la víctima. En algunos casos se ha observado persistencia de la herida con alteraciones sensoriales durante meses (Sosa-Rosales y col., 2005). Gran parte de los venenos producidos por estos organismos, incluyendo el de *Thalassophryne maculosa* causan lesiones severas; aunque generalmente no letales. A pesar de ello, muchos de los componentes responsables de tales efectos no han sido estudiados ni identificados con precisión (Hodgson, 1997).

Algunos estudios, realizados en ratones, han demostrado que el veneno de *Thalassophryne maculosa* tiene efectos nefrotóxicos y hemostáticos mediados por la liberación de citoquinas. Sin embargo, los datos de algunas investigaciones son contradictorios o insuficientes (Alcalá y col., 2010).

Alcalá y colaboradores (2010) determinaron por el método de Dixon y Mood (1948) modificado (Sevcik, 1987) la DL_{50} del veneno de *Thalassophryne maculosa*, administrado por vía intraperitoneal, en ratones hembra C57BL/6, para una hora de experimentación. Bajo esas condiciones la DL_{50} fue de 70,80 (66,95-75,12) $mg.kg^{-1}$;

con un índice de variabilidad de 7,02%. Los autores indicaron que los signos inmediatos de toxicidad aguda, en los primeros cuatro minutos, causados por el veneno de *Thalassophryne maculosa*, fueron hiperactividad, seguida de taquipnea. Posterior a éstos, en el espectro medió de toxicidad moderadamente grave, entre los 10 y 20 minutos, se instalaron la hipoactividad y distensión abdominal. Tardíamente como expresión de toxicidad grave, después de los 20 minutos, los ratones presentaron disnea caracterizada por periodos de bradipnea alternada con apnea, con cianosis peribucal, hasta finalmente la sobrevivencia o la muerte de los animales.

Adicionalmente, Alcalá y colaboradores (2010) indicaron la naturaleza proteica del veneno de *Thalassophryne maculosa*, indicando su actividad proteolítica.

CAPÍTULO III

MARCO METODOLÓGICO

Obtención y purificación parcial del veneno

Ejemplares del pez sapo *Thalassophryne maculosa* fueron capturados en aguas someras del Parque Nacional La Restinga, estado Nueva Esparta, Venezuela. El veneno se obtendrá por ordeño manual, mediante el descubrimiento de sus espinas dorsales y operculares. Posterior a su eyección, éste fue recogido con ayuda de una micropipeta y transferido a tubos Eppendorf de 1,5 mL. Las muestras se mantuvieron a -20°C hasta el momento de su uso.

El veneno, transferido a tubos Eppendorf de 1,5 mL, fue suspendido en 1 mL de agua bidestilada y agitado en vortex (Super-Mixer[®]). Consecutivamente se centrifugó a 14.000 g (Labnet para tubos Eppendorf[®], modelo Z180M) por 20 minutos para separar restos celulares de la fase soluble que contiene las proteínas con actividad farmacológica.

Se realizaron diluciones del veneno, 1/5, 1/10 o 1/20, en agua bidestilada como paso previo a la cuantificación de las proteínas contenidas en el veneno. Se determinó la concentración de proteínas mediante lectura de absorbancia en un espectrofotómetro Jenway[®], modelo 6405 UV/vis, a una longitud de onda de 280 nm, asumiendo que 1 unidad de absorbancia (a esta longitud) representó una concentración de 5,46 mg/mL (De Sousa y col., 2009; 2010; De Sousa, 2011).

Designación de una DL_{50} como dosis controlada del veneno de *Thalassophryne maculosa*

La DL_{50} del veneno de *Thalassophryne maculosa*, para una hora de experimentación, fue determinada (en trabajo previo) por el método secuencial de Dixon y Mood (1948) modificado por Sevcik (1987) en ratones hembra C57BL/6 (Alcalá y col., 2010) (Figura.1).

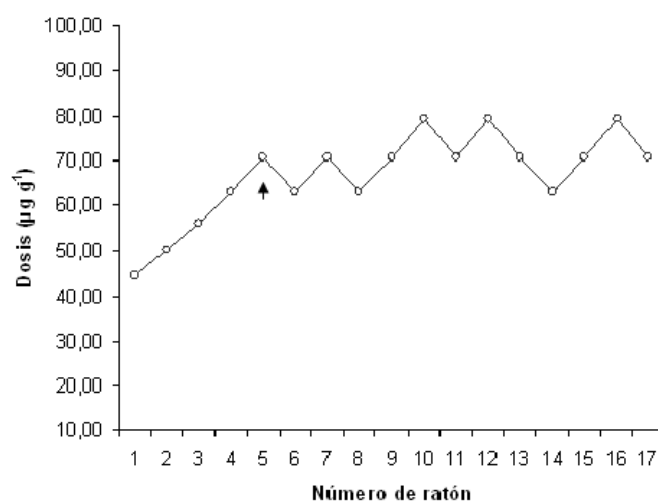


Figura 1. Determinación de la Dosis Letal Cincuenta (DL_{50}) del veneno de *Thalassophryne maculosa* (Pisces, Batrachoididae) por vip en ratones hembra C57BL/6.

La flecha indica el punto de inflexión e inicio de los datos válidos para el cálculo de la DL_{50} . El resultado se presenta como la mediana y sus límites para un 95% de confianza (entre paréntesis): DL_{50} , vip, 60 minutos = 70,80 (66,95–75,12) $\mu\text{g g}^{-1}$ de ratón.

Evaluación de los signos de toxicidad aguda experimental y su curso temporal de aparición

Dos ratones hembra de la cepa C57BL/6, adquiridos en el Bioterio del Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC) y disponibles en el área del Laboratorio de Toxinología, fueron inyectados por vía intraperitoneal con una DL_{50} del veneno de *Thalassophryne maculosa*, como dosis controlada. En tal sentido, a cada uno de los dos ratones C57BL/6 se les administró una dosis de veneno de $70,80 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ de ratón.

Los signos clínicos expresados como efecto de toxicidad aguda experimental inducida por la inyección intraperitoneal de la dosis controlada del veneno de *Thalassophryne maculosa*, fueron observados meticulosamente durante los 60 minutos de experimentación y tabulados cronológicamente; adicionalmente se registró el resultado final de sobrevivencia o muerte. Se utilizaron animales testigo a los cuales se les administró solución fisiológica en volúmenes similares a los del grupo experimental (De Sousa y col., 2009, 2010; De Sousa, 2011).

Descripción de los cambios histológicos agudos en tejido aortico y renal de ratones C57BL/6, causados por la inyección intraperitoneal del veneno de *Thalassophryne maculosa*

Una vez cumplido el tiempo de sesenta minutos de exposición al tratamiento, los animales que no sobrevivieron fueron elegidos para evaluar los cambios histológicos agudos causados por el veneno de *Thalassophryne maculosa*; para ello, se practicó incisión en la línea medio esternal y abdominal y se extrajeron las vísceras en bloque. Luego se fijaron mediante inmersión en formalina al 10% (v/v). Similarmente se procedió con un ratón control. Los órganos se fijaron, durante tres

días, y luego se procedió a la separación de la aorta abdominal y de los riñones (envenenados y controles) para colocarlos individualmente en cajetillas de inclusión para su posterior tratamiento.

Las piezas se lavaron con agua corriente, por quince minutos, para eliminar la formalina. Posteriormente se deshidrataron con etanol, con concentraciones crecientes (v/v), iniciando al 70%, 80%, 95% y finalmente 100%. Cada paso de deshidratación duró 30 minutos. Posteriormente, el tejido se fijó con xilol (solución 50%-50% v/v de alcohol-xilol) por 15 minutos, seguido por dos períodos en xilol de 15 minutos cada uno. Finalmente fueron incluidos en bloques de parafina para realizar los cortes, con microtomo, con un espesor de 3 micras. Los cortes fueron colocados en portaobjetos rotulados, previamente tratados con albúmina de Mayer. Posteriormente se realizó su secado, en estufa, entre 50 y 55°C durante 20 a 30 minutos, y se dejaron a temperatura ambiente. Una vez enfriados, se procedió a fijar y colorear los cortes con Hematoxilina-Eosina (H-E), ácido peryódico de Shiff (PAS) y ácido tricrómico. Finalmente observados en microscopio de luz.

CAPÍTULO IV

ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Resultados

Curso temporal de toxicidad aguda experimental

Luego de la exposición, durante sesenta minutos, al tratamiento conformado por una DL_{50} , como dosis controlada, se obtuvo una frecuencia de 100% ($n = 2$) de muerte. En la Figura 2 se presenta el curso temporal de aparición de los signos de toxicidad aguda experimental inducida por el veneno de *Thalassophryne maculosa* en ratones, hembra, cepa C57BL/6. La toxicidad se inició con retracción abdominal, seguida por la presencia de deambulación errática, taquipnea e hipoactividad. Luego de la hipoactividad se evidencio bradipnea, convulsiones tónico-clónicas y finalmente la muerte.

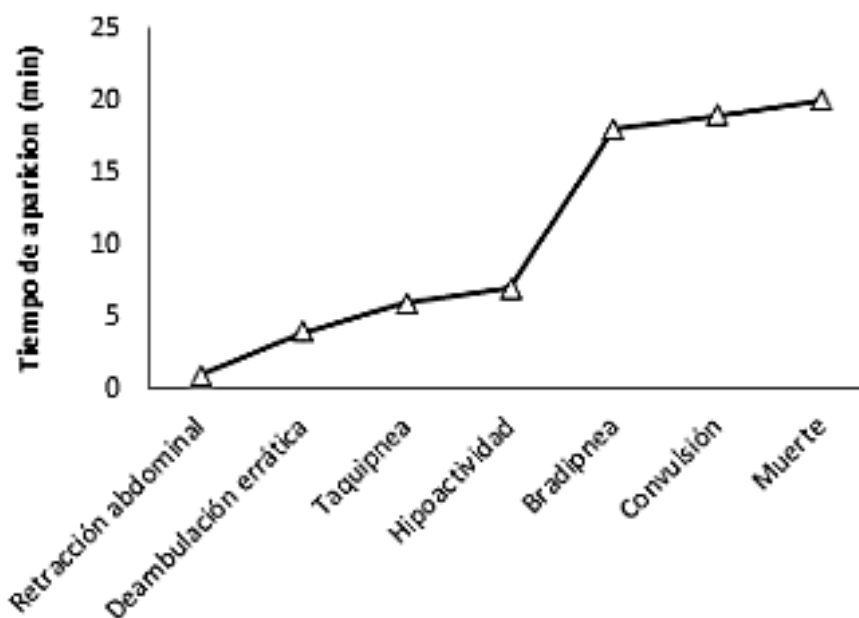


Figura 2. Curso temporal de aparición de los signos de toxicidad aguda experimental inducidos por el veneno de *Thalassophryne maculosa* administrado por vip en ratones C57BL/6.

Hallazgos histológicos normales

Las figuras 3 (a hasta d) y 4, muestran imágenes de tejido renal normal, de ratones C57BL/6, caracterizados por la integridad de los corpúsculos renales, túbulos, vasos sanguíneos y tejido intersticial.

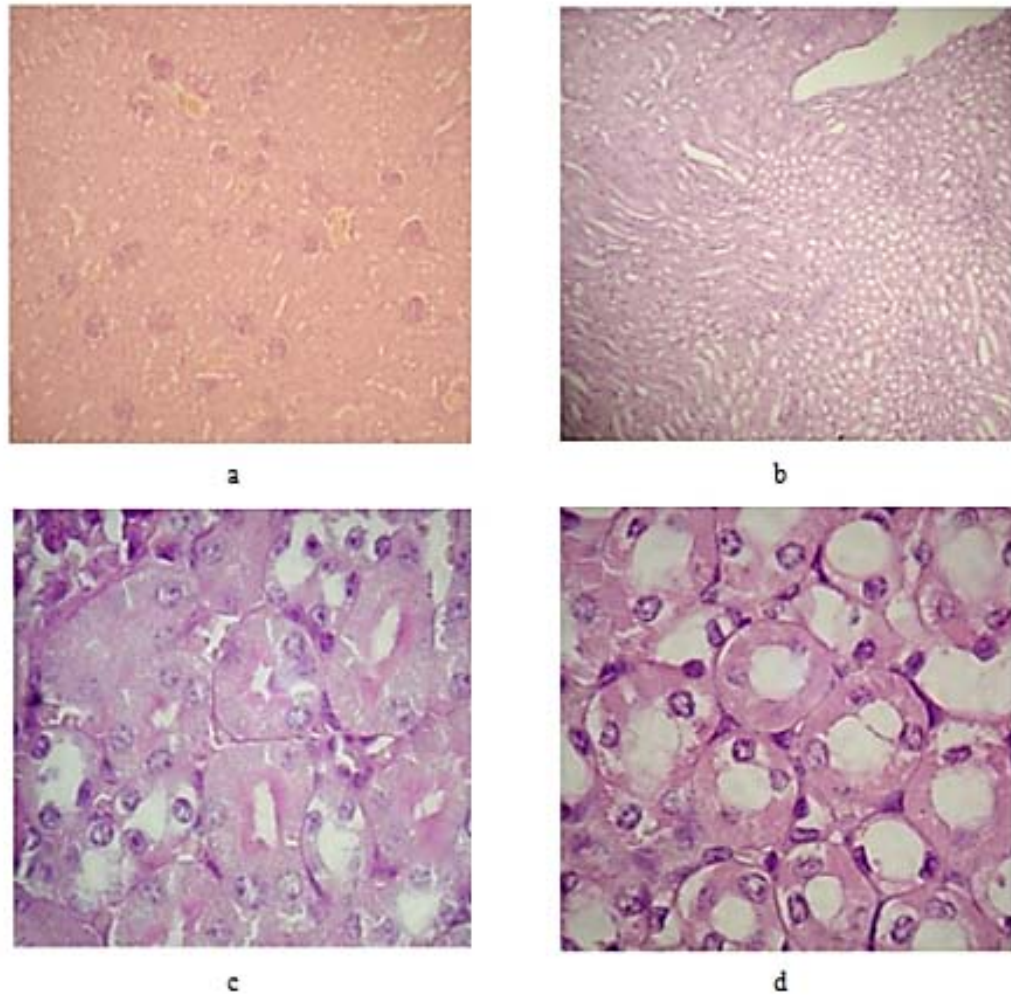


Figura 3. Tejido renal correspondiente a un ratón control C57BL/6.

(a). Corteza renal, H-E, 10x. (b). Médula renal, H-E, 10x. (c). Nótese túbulos renales mostrando la integridad de su pared, obsérvese las características núcleo-citoplasma y la presencia del ribete en cepillo de los túbulos contorneados proximales; todos descansando sobre una membrana basal continua PAS positiva, 40x. (d). Sección de médula renal, mostrando la integridad de las asas de Henle. H-E, 40x.

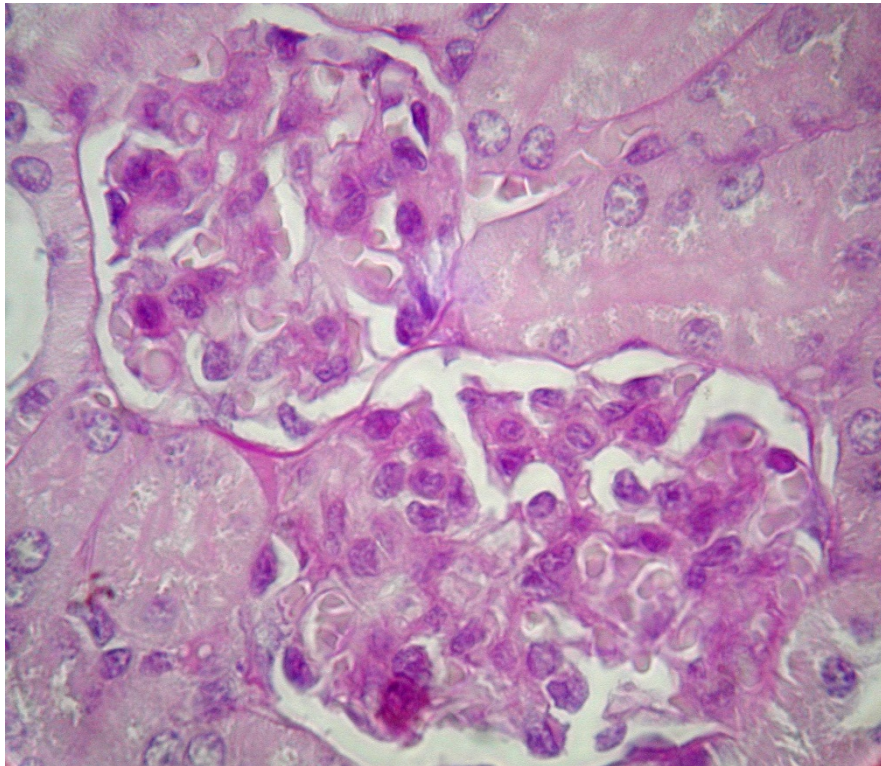


Figura 4. Sección de corteza renal correspondiente a ratón control C57BL/6.

Detállese las características normales de los corpúsculos y túbulos renales. Obsérvese la nitidez de las hojas parietal y visceral de la cápsula de Bowman y la membrana basal, claramente PAS positiva. Coloración PAS 100x.

Descripción histológica del tejido aortico y renal posterior a la inyección de una DL₅₀ de veneno de *Thalassophryne maculosa* en ratones de la cepa C57/BL6

En las figuras 5 hasta la 9, se observan los cambios histológicos observados en el tejido aortico de los ratones C57/BL6 inyectados con una DL₅₀ de veneno *Thalassophryne maculosa*.

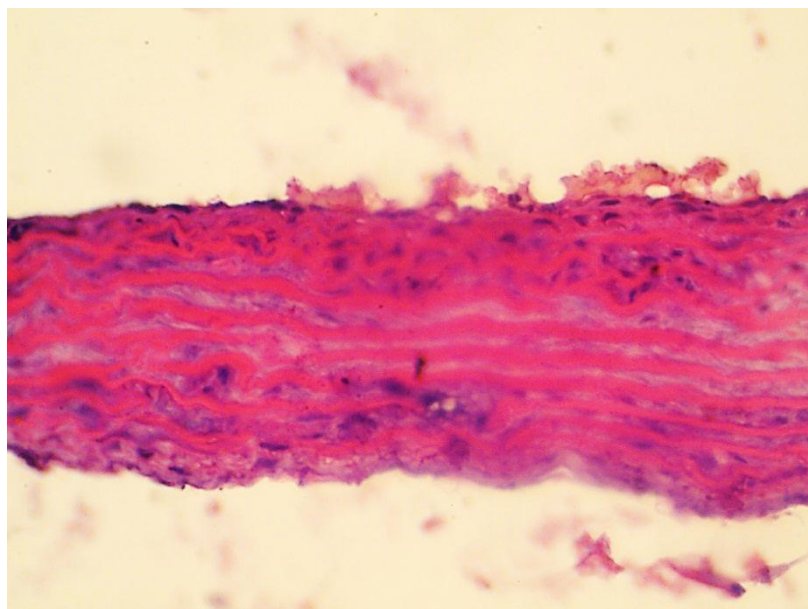


Figura 5. Corte longitudinal de tejido aórtico de ratón C57/BL6 inyectado con una DL₅₀ del veneno de *Thalassophryne maculosa* teñido con hematoxilina-eosina a 10x. Se observa degeneración mixoide entre las fibras elásticas de la capa media lesión del endotelio vascular con presencia de material fibrinoide.

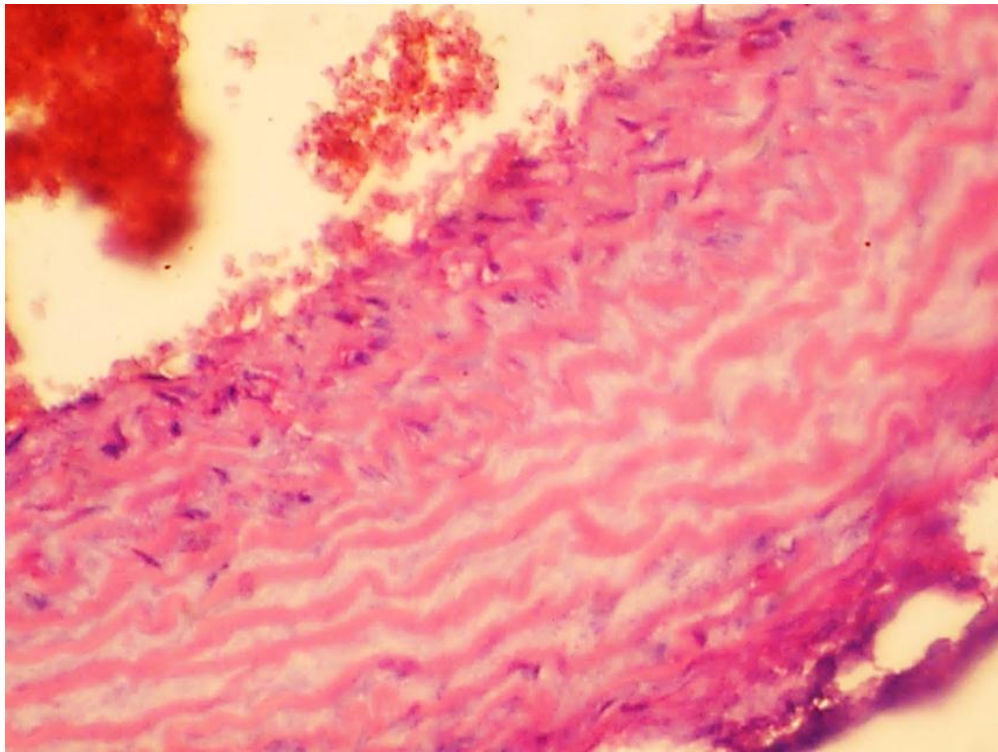


Figura 6. Corte longitudinal de tejido aórtico de ratón C57/BL6 inyectado con una DL_{50} del veneno de *Thalassophryne maculosa* teñido con hematoxilina-eosina a 40x. Se observa ruptura de las fibras elásticas con pérdida de la arquitectura de la capa media. Lesión del endotelio vascular. Presencia de material mixoide.

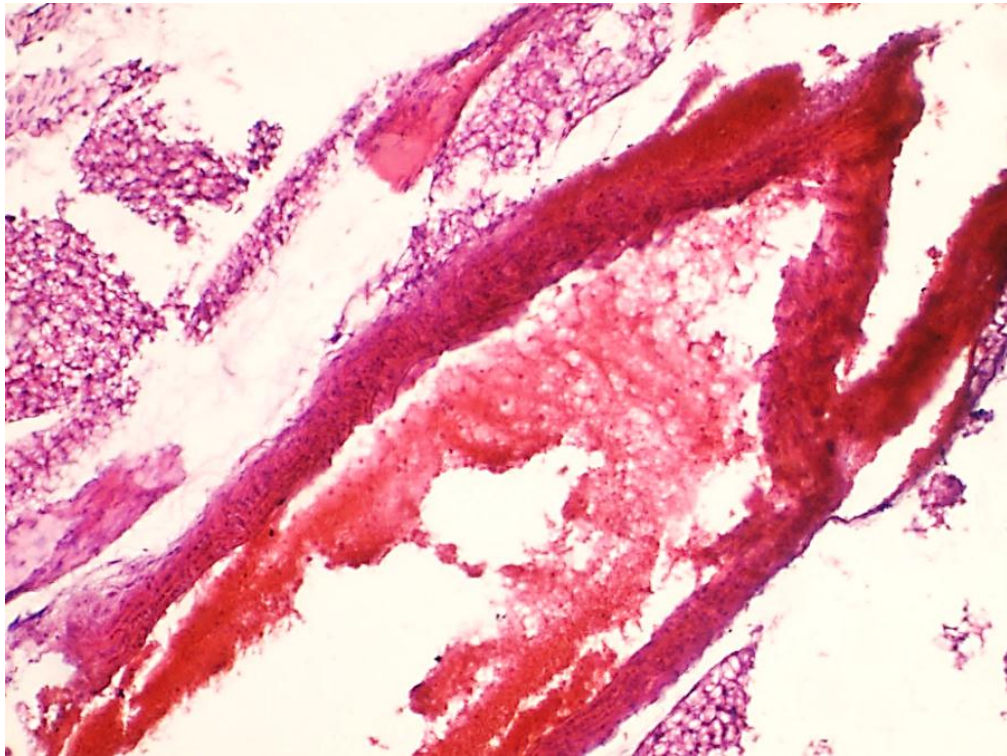


Figura 7. Corte tangencial de tejido aórtico de ratón C57/BL6 inyectado con una DL_{50} del veneno de *Thalassophryne maculosa* teñido con hematoxilina-eosina a 4x. Se observa material fibrino-hemático adherido a la luz de los vasos.

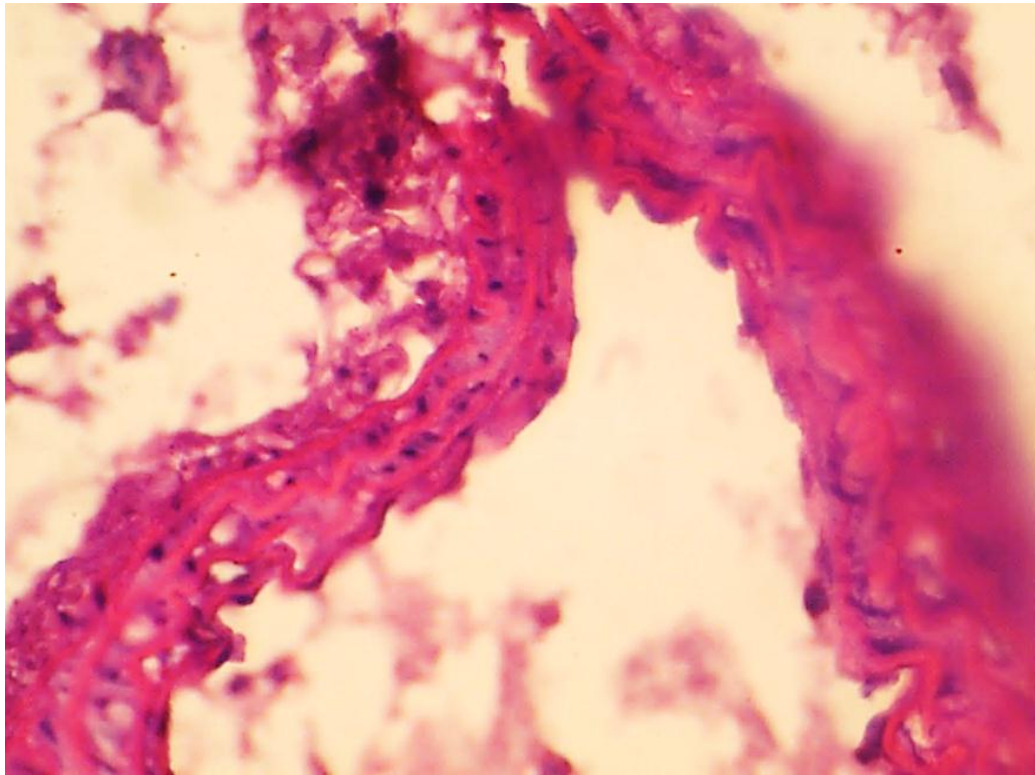


Figura 8. Corte longitudinal de tejido aórtico de ratón C57/BL6 inyectado con una DL_{50} del veneno de *Thalassophryne maculosa* teñido con hematoxilina-eosina a 10x. Se observa edema fibroelástico de la capa media, macrófagos cargados de hemosiderina.

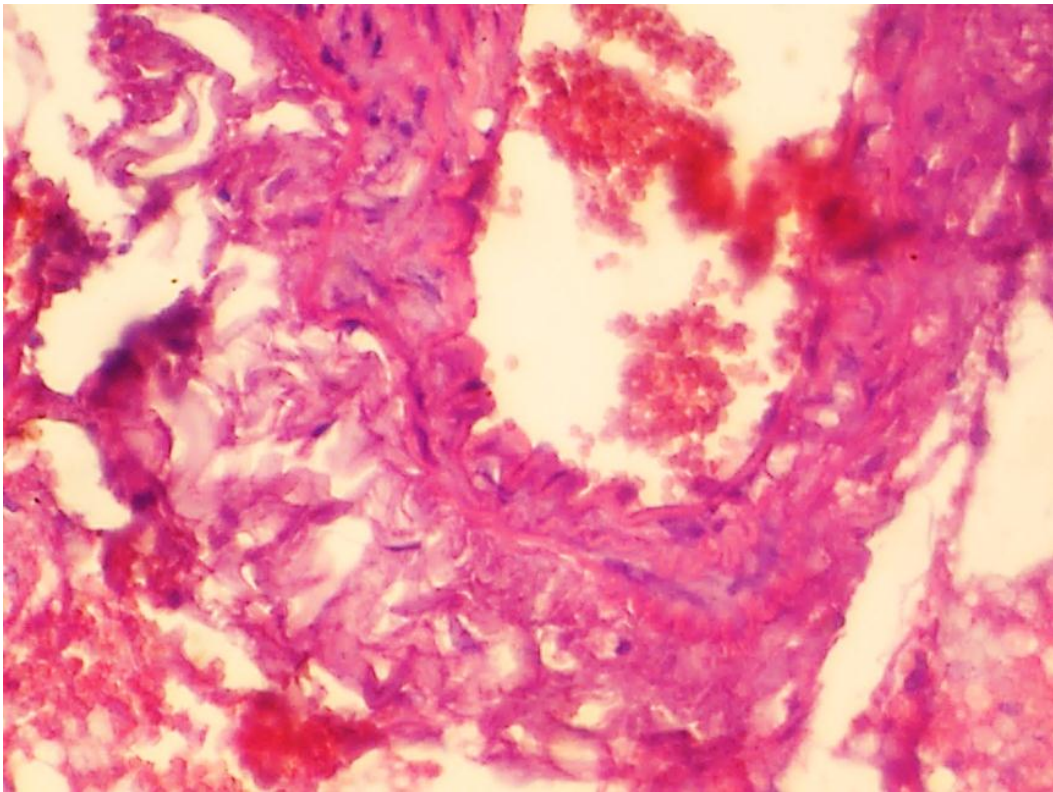


Figura 9 Corte transversal de tejido aórtico de ratón C57/BL6 inyectado con una DL_{50} del veneno de *Thalassophryne maculosa* teñido con hematoxilina-eosina a 10x. Se observa desorganización y degeneración de las fibras elásticas de la capa media y edema interfibrilar de la capa media.

En las figuras 10 hasta la 14 , se observan los cambios histológicos observados en el tejido renal de los ratones C57/BL6 inyectados con una DL₅₀ de veneno *Thalassophryne maculosa*.

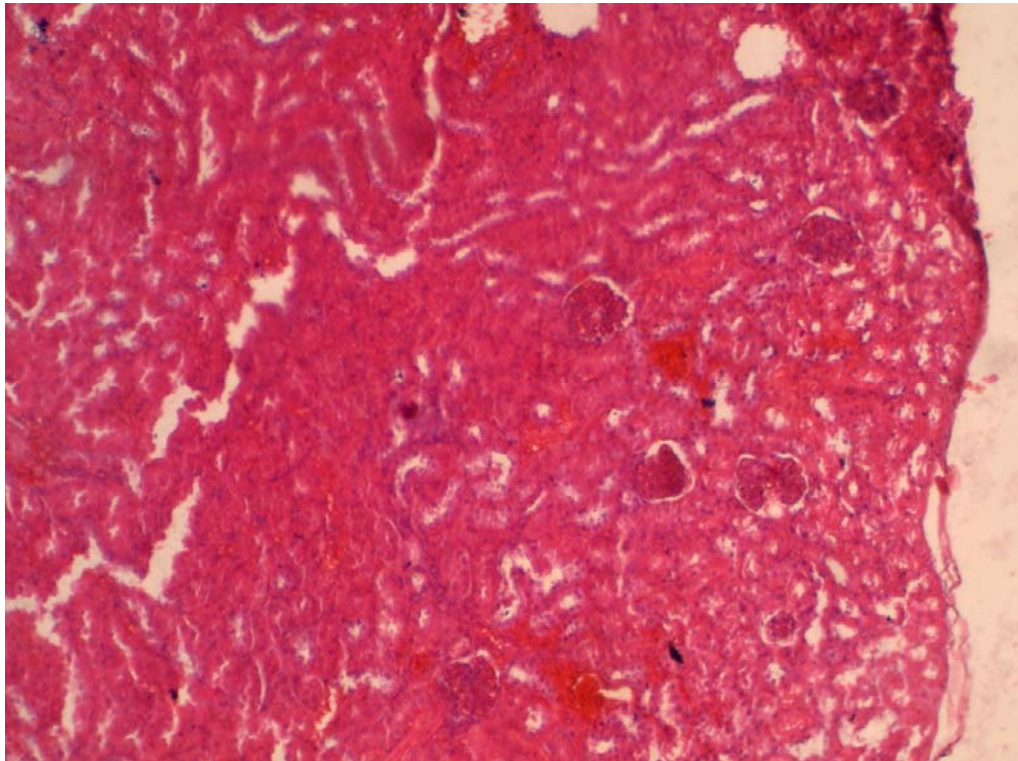


Figura 10. Corte longitudinal de tejido renal de ratón C57BL/6 inyectado con una DL₅₀ del veneno de *Thalassophryne maculosa* teñido con hematoxilina-eosina a 4x. Se observa parénquima cortical renal con presencia de glomérulos con cambios degenerativos y necrosis hemorrágica.

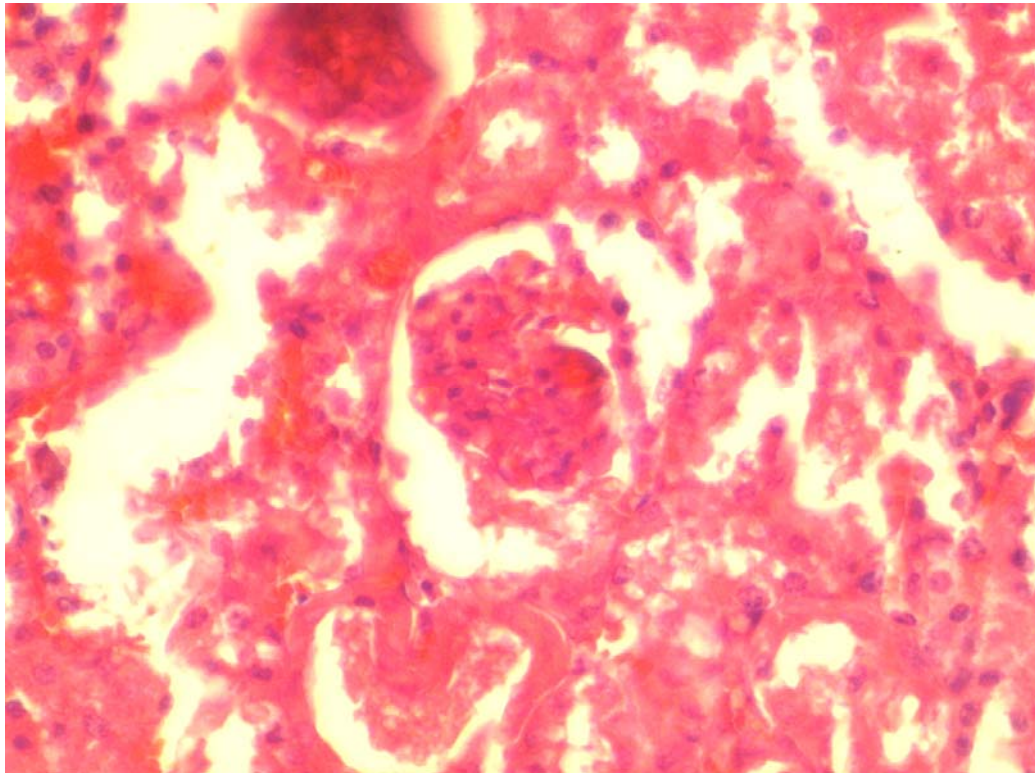


Figura 11. Corte longitudinal de tejido renal de ratón C57BL/6 inyectado con una DL_{50} del veneno de *Thalassophryne maculosa* teñido con hematoxilina-eosina a 40x. Se observa colapso de los capilares glomerulares con necrosis fibrinoide y trombosis vascular.

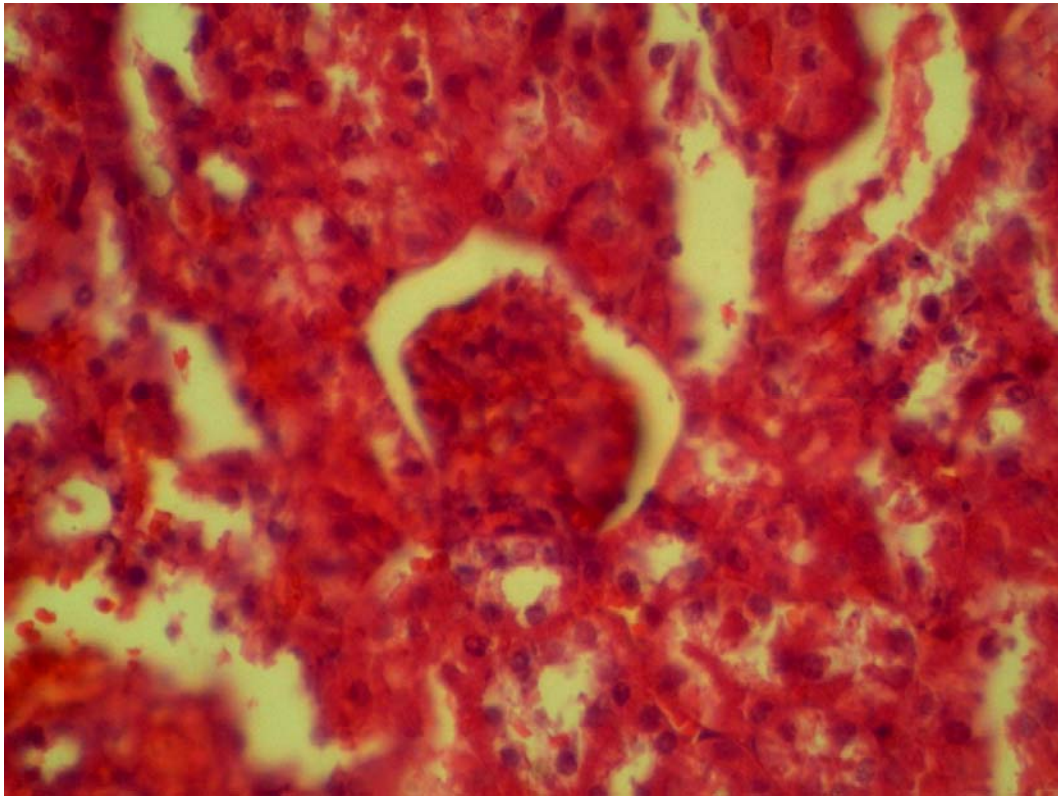


Figura 12. Corte longitudinal de tejido renal de ratón C57BL/6 inyectado con una DL_{50} del veneno de *Thalassophryne maculosa* teñido con hematoxilina-eosina a 40x. Se observa penacho glomerular congestivo, degeneración glucogénica de las células de los túbulos renales con presencia de material eosinofílico amorfo en la luz de los túbulos renales.

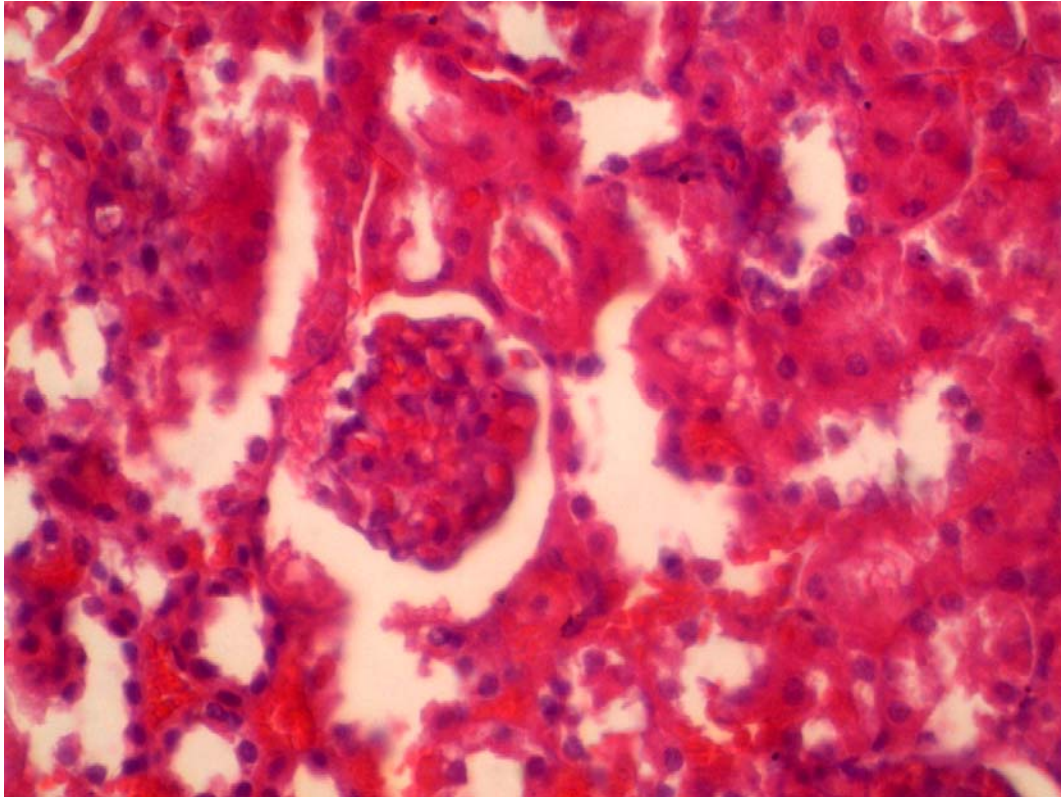


Figura 13. Corte longitudinal de tejido renal de ratón C57BL/6 inyectado con una DL_{50} del veneno de *Thalassophryne maculosa* teñido con hematoxilina-eosina a 40x. Se observan glomerulos congestivos y arteriolas glomerulares congestivas.

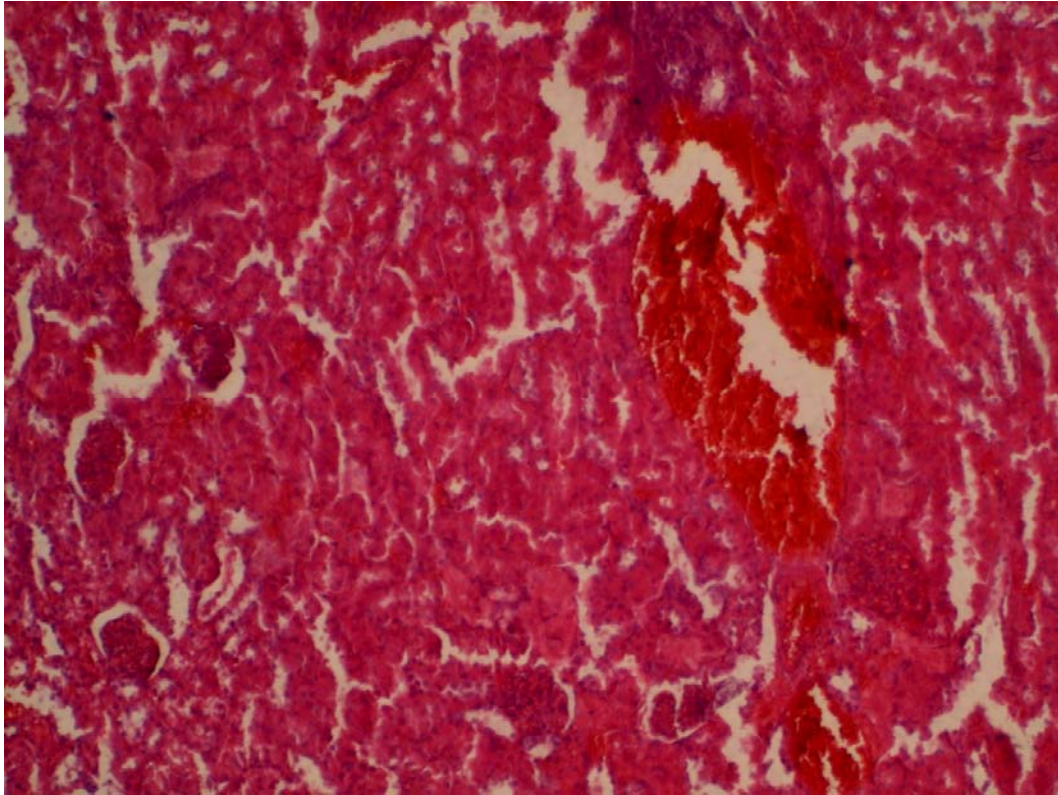


Figura 14. Corte longitudinal de tejido renal de ratón C57BL/6 inyectado con una DL_{50} del veneno de *Thalassophryne maculosa* teñido con hematoxilina-eosina a 4x. Se observa área renal de transición cortico-medular, con presencia de hemorragia en el intersticio.

Discusión

El modelo de ratón utilizado en este trabajo, fue la cepa homocigota C57BL/6. Trabajos previos indican que esta cepa posee mayor sensibilidad a la acción del veneno de vertebrados e invertebrados (De Sousa y col., 2009, 2010; De Sousa, 2011).

Una DL_{50} del veneno de *Thalassophryne maculosa* provocó cambios histopatológicos en el tejido aórtico y renal en comparación con los controles. Las alteraciones fueron más evidentes en algunos de los componentes celulares y en la arquitectura general del tejido.

Lopes-Ferreira y colaboradores (2002), observaron que *Thalassophryne natterii* a nivel histológico induce daño directo en las membranas plasmáticas del músculo esquelético con trombosis y otras alteraciones en la microvasculatura de los ratones, sin inducir hemorragia. Los análisis del músculo cremáster mostraron que el veneno provocó alteración peculiar de la microcirculación, con congestión vascular intensa, trombosis en las vénulas y contracción transitoria focal en las arteriolas. En contraste con otros modelos de mionecrosis, en el que la microvasculatura no se ve afectada, la fagocitosis de material necrótico está activa a las 24 horas.

Lopes-Ferreira y colaboradores (2002) con el veneno de *Thalassophryne natterii*, demostraron presencia de edema, mionecrosis, hiperemia y congestión en las venas y vénulas, presencia de trombos, además de poco infiltrado celular inflamatorio; también observaron alteraciones de la membrana plasmática y prominente desorganización miofibrilar, incluyendo la desaparición de la línea Z en el músculo gastrocnemio. Carrijo y colaboradores (2005) evaluaron las propiedades biológicas del veneno de *Scorpaena plumieri*.

Los cambios histológicos a nivel cardiovascular en ratones de la cepa C57BL/6 se ha estudiado en otras especies, principalmente con el veneno de invertebrados como los escorpiones del género *Tityus*. Albornoz y colaboradores (2008) con una DL₅₀ del veneno de *Tityus nororientalis*, en los ratones C57BL/6, evidenciaron grandes cambios en la estructura microscópica del miocardio, con amplias áreas de tejido cardíaco sustituidas por un sincitio tisular con ausencia total de elementos histológicos compatibles con la normalidad del mismo. En los vasos sanguíneos de corazón los autores observaron degeneración de sus diferentes capas, con presencia de gran vacuolización que separa las fibras musculares entre sí, así como la íntima de la media.

Por su parte, Laucho y López (2011), con el veneno de *Tityus nororientalis*, observaron alteraciones histológicas en tejido pulmonar de ratones NMRI, BALBc y C57BL/6. Los ratones de la cepa C57BL/6 tratados con una DL₅₀ del veneno de esta especie se caracterizaron por presentar alteraciones histológicas del tejido pulmonar, que consistieron en dilatación vascular, con abundante infiltrado inflamatorio perivascular, congestión bronquiolar, infiltrado intraalveolar y engrosamiento de la pared alveolar.

Salomon (2009), con una DL₅₀ del veneno de *Tityus nororientalis*, observó en riñones de la cepa C57BL/6 cambios de la estructura normal del tejido renal, consistentes en necrosis tubular aguda y congestión glomerular. Mientras que Hurtado y colaboradores (2012), en el tejido renal de los ratones C57BL/6 inyectados con una DL₅₀ de veneno de *Tityus zulianus*, observaron glomerulosclerosis segmentaria y focal, congestión glomerular acentuada con cambios isquémicos tubulointersticiales leves, dilatación y ectasia vascular acentuada, fibrosis intersticial leve y difusa, corticomedular con atrofia tubular.

Los cambios histológicos observados con el veneno de *Thalassophryne maculosa*, indicarían que este veneno posiblemente posee un mecanismo de acción fisiopatológico tisular diferente al de los escorpiones del género *Tityus*.

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES

1. Se observaron ocho manifestaciones clínicas inducidas por el veneno de *Thalassophryne maculosa* en ratones C57BL/6; con aparición gradual en el curso temporal de toxicidad aguda. Los signos inmediatos de toxicidad aguda fueron hiperactividad seguida de taquipnea; entre 10 y 20 minutos se evidenció hipoactividad, distensión abdominal; posteriormente se observaron signos de toxicidad grave caracterizados por bradipnea alternada con apnea, hasta finalmente la muerte de los animales.

2. En el tejido aortico de los ratones C57BL/6 inyectados con una DL₅₀ de veneno *Thalassophryne maculosa*, los cambios histológicos más significativos fueron degeneración mixoide entre las fibras elásticas de la capa media, lesión del endotelio vascular con presencia de material fibrinoide, ruptura de las fibras elástica con pérdida de la arquitectura de la capa media, material fibrino-hemático adherido a la luz de los vasos, macrófagos cargados de hemosiderina, edema interfibrilar de la capa media, recanalización de trombos arteriales y oclusión de la luz vascular.

3. En tejido renal se observó parénquima cortical renal con presencia de glomérulos con cambios degenerativos, necrosis hemorrágica, área renal de transición cortico-medular con presencia de hemorragia en el intersticio, colapso de los capilares glomerulares con necrosis fibrinoide, trombosis vascular, penacho glomerular congestivo, degeneración glucogénica de las células de los túbulos renales con presencia de material eosinofílico amorfo en la luz de los túbulos renales y arteriolas glomerulares congestivas.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Albornoz E., Cedeño O., Pereira M. 2008. Cambios histopatológicos agudos causados por el veneno de *Tityus nororientalis* (Scorpiones: Buthidae) en miocardio de ratones NMRI, BALBc y C57BL/6. Trabajo de Grado, Escuela de Ciencias de la Salud, Núcleo de Anzoátegui, Universidad de Oriente, Barcelona, Venezuela.
- Alcalá O., Mendoza G., Navarro N. 2010. Actividad biológica *in vitro* y dosis letal cincuenta del veneno de *Thalassophryne maculosa* (Pisces, Batrachoididae). Trabajo de Grado, Escuela de Ciencias de la Salud, Núcleo de Anzoátegui, Universidad de Oriente, Barcelona, Venezuela.
- Boccalon Y., Gamero D., Romero D. 2004. Antecedentes de envenenamientos por especies marinas en los pescadores de las costas del estado Anzoátegui, y playas aledañas de Sucre, julio-diciembre de 2003. Trabajo de Grado, Escuela de Medicina, Núcleo de Anzoátegui, Universidad de Oriente, Barcelona, Venezuela.
- Carrijo L., Andrich F., De Lima M., Cordeiro M., Richardson M., Figueredo S. 2005. Biological properties of the venom from the scorpionfish (*Scorpaena plumieri*) and purification of a gelatinolytic protease. *Toxicon*, 45: 843-850.
- De Sousa L. 2011. Mapa de toxicidad del veneno de algunos escorpiones (Buthidae, Chactidae) del nororiente venezolano. Trabajo de Ascenso a Profesor Titular. Escuela de Ciencias de la Salud, Universidad de Oriente, Barcelona, Venezuela.

- De Sousa L., Parrilla-Álvarez P., Pérez Di Gaeta P., Romero L., Quiroga M. 2009. Evaluación de la actividad biológica del veneno de *Tityus gonzalespongai* (Scorpiones, Buthidae) en el modelo C57BL/6. *Saber*, 21:50-62.
- De Sousa L., Borges A., Vásquez-Suárez A., Op den Camp H., Chadee-Burgos R., Romero-Bellorín M., De Sousa-Insana L., Pino-García O. 2010. Differences in venom toxicity and antigenicity between females and males of the scorpion *Tityus nororientalis* (Buthidae). *Journal of Venom Research*, 1: 61-70.
- Dixon, W.; Mood, A. 1948. A method for obtaining and analyzing sensitivity data. *Journal of the American Statistical Association*, 43: 109-126.
- Gutiérrez J., Benítez-Guerra I., Benítez-Guerra G. 2004. Envenenamiento por rayas de agua dulce. *Revista de la Facultad de Medicina*, 27: 131-134.
- Haddad Junior V. 2003. Animais aquáticos de importância médica no Brasil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 36(5): 591-597.
- Haddad Junior V., Pardal P., Cardoso JL., Martins I. 2003. The venomous toadfish *Thalassophryne natterii* (Niquim or Miquim): Report of 43 injuries provoked in fishermen os Salinópolis (Pará State) and Aracaju (Sergipe State), Brazil. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 45(4): 221-223.
- Halstead BW. 1978. Poisonous and venomous marine animals of the world (Revised Edition). Darwin Press, New Jersey. XLVI. 1043 pp.
- Hodgson W. 1997. Pharmacological action of Australian animal venoms. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, 24: 10-17

- Junghanss T., Bodio M. 2006. Medically important venomous animals: Biology, prevention, first aid, and clinical management. *Clinical Infectious Diseases*, 43:1309-1317
- Laucho J., López, R. 2011. Cambios histológicos agudos causados por el veneno de *Tityus nororientalis* (Scorpiones, Buthidae) en pulmones de ratones NMRI, BALBc y C57BL/6. Trabajo de Grado, Escuela de Ciencias de la Salud, Núcleo de Anzoátegui, Universidad de Oriente, Barcelona, Venezuela.
- Lima LA., Ferreira M. 2000. Estudos clínico e experimental sobre o envenenamento causado pelo peixe *Thalassophryne nattereri* (niquim). Investigaçãõ clínica, laboratorial e terapéutica clinical. *Anais Brasileiros de Dermatologia*, 75(4): 435-443.
- Lopes-Ferreira M., Moura-da-Silva AM, Piran-Soares AA, Angulo Y., Lomonte B, Gutiérrez JM., Farsky S. 2002. Hemostatic effects induced by *Thalassophryne natteri* fish venom: a model of endothelium-mediated blood flow impairment. *Toxicon*, 40(8): 1141-1147
- Loyo J., Lugo L., Cazorla D., Acosta ME. 2008. Envenenamiento por pez escorpión (*Scorpaena plumieri*) en una comunidad pesquera y turística de la Península de Paraguaná, estado Falcón, Venezuela: Aspectos clínicos, epidemiológicos y tratamiento. *Investigación Clínica*, 49(3): 299-307.
- Machado-Allison A., Rodríguez-Acosta A. 1997. Animales venenosos y ponzoñosos de Venezuela. Caracas: Editora LITOPAR, CDCH, Universidad Central de Venezuela; p 45-111.

Salomón, L 2009. Cambios histopatológicos agudos causados por el veneno de *Tityus nororientalis* (Scorpiones, Buthidae) en riñones de ratones NMRI, BALBc y C57BL/6. Trabajo de Grado, Escuela de Ciencias de la Salud, Núcleo de Anzoátegui, Universidad de Oriente, Barcelona, Venezuela.

Sevcik, C. 1987. DL₅₀ determinations: Objections to the method of Beccari as modified by Molinengo. *Toxicon*, 25: 779-783.

Sosa-Rosales JI., D'Suze G., Salazar V., Fox J., Sevcik C. 2005. Purification of a myotoxin from the toadfish *Thalassophryne maculosa* (Günther) venom. *Toxicon*, 45: 147–153.

HOJA DE METADATOS PARA TESIS Y TRABAJOS DE ASCENSO – 1/5

Título	CAMBIOS HISTOLOGICOS CAUSADOS POR EL VENENO DEL PEZ SAPO <i>Thalassophryne maculosa</i> (PISCES, BATRACHOIDIDAE) EN TEJIDO AORTICO Y RENAL DE RATONES C57BL/6
Subtítulo	

Autor(es):

Apellidos y Nombres	Código CVLAC / e-mail	
Pereira Carbonara Vito Alejandro	CVLAC	17.721.962
	e-mail	lobogris32@hotmail.com
	CVLAC	
	e-mail	
	CVLAC	
	e-mail	

Palabras o frases claves:

Thalassophryne maculosa, toxicología, veneno, toxicidad aguda, histopatología, tejido aórtico y renal, ratones C57BL/6.

HOJA DE METADATOS PARA TESIS Y TRABAJOS DE ASCENSO – 2/5

Líneas y sublíneas de investigación:

Área	Subárea
Escuela de Ciencias de la Salud	Medicina
	Farmacología
	Toxinología

Resumen (abstract):

Ejemplares del pez sapo *Thalassophryne maculosa* fueron capturados en aguas someras del Parque Nacional La Restinga, estado Nueva Esparta, Venezuela. El veneno se obtuvo por ordeño manual de las espinas dorsales y operculares. La DL_{50} del veneno, para una hora de experimentación, fue determinada por el método secuencial de Dixon y Mood. Se escogió al azar, cuatro ratones hembra de la cepa C57BL/6. Se administró por vía intraperitoneal una DL_{50} de veneno de *Thalassophryne maculosa* equivalente a $70,8 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ de ratón. Luego fueron evaluados durante sesenta minutos, obteniendo una frecuencia de mortalidad de 50% ($n = 2$). El tiempo de aparición de las manifestaciones clínicas inducidas por el veneno fue gradual presentando de forma inmediata hiperactividad y taquipnea, seguida de hipoactividad y distensión abdominal para suceder, alrededor de los 30 minutos del curso temporal de toxicidad, periodos de bradipnea/apnea a la cual sobreviene la muerte. Los ratones fallecidos se utilizaron para evaluar los cambios histológicos en el tejido aórtico y renal causados por efecto tóxico del veneno.

En el tejido aórtico de los ratones C57BL/6 inyectados con una DL_{50} de veneno *Thalassophryne maculosa*, los cambios histológicos más significativos fueron degeneración mixoide entre las fibras elásticas de la capa media, lesión del endotelio vascular con presencia de material fibrinoide, ruptura de las fibras elástica con pérdida de la arquitectura de la capa media, material fibrino-hemático adherido a la luz de los vasos, macrófagos cargados de hemosiderina, edema interfibrilar de la capa media, recanalización de trombos arteriales y oclusión de la luz vascular. En tejido renal se observó parénquima cortical renal con presencia de glomérulos con cambios degenerativos, necrosis hemorrágica, área renal de transición cortico-medular con presencia de hemorragia en el intersticio, colapso de los capilares glomerulares con necrosis fibrinoide, trombosis vascular, penacho glomerular congestivo, degeneración glucogénica de las células de los túbulos renales con presencia de material eosinofílico amorfo en la luz de los túbulos renales y arteriolas eferentes congestiva.

HOJA DE METADATOS PARA TESIS Y TRABAJOS DE ASCENSO – 3/5

Contribuidores:

Apellidos y Nombres	ROL / Código CVLAC / e-mail	
Irene Rodríguez	ROL	CA <input type="checkbox"/> AS <input type="checkbox"/> TU <input type="checkbox"/> JU <input checked="" type="checkbox"/>
	CVLAC	8.318.941
	e-mail	irelab_bna@hotmail.com
Mercedes Matos Pérez	ROL	CA <input type="checkbox"/> AS <input type="checkbox"/> TU <input type="checkbox"/> JU <input checked="" type="checkbox"/>
	CVLAC	8.032.140
	e-mail	mmatosb@cantv.net
Aleikar José Vásquez-Suárez	ROL	CA <input type="checkbox"/> AS <input type="checkbox"/> TU <input checked="" type="checkbox"/> JU <input type="checkbox"/>
	CVLAC	12.672.563
	e-mail	valeikar@yahoo.es
Leonardo De Sousa	ROL	CA <input type="checkbox"/> AS <input type="checkbox"/> TU <input checked="" type="checkbox"/> JU <input type="checkbox"/>
	CVLAC	14.214.493
	e-mail	leonardodesousa@yahoo.com

Fecha de discusión y aprobación:

Año	Mes	Día
2013	06	21

Lenguaje: SPA: **X**

HOJA DE METADATOS PARA TESIS Y TRABAJOS DE ASCENSO – 4/5**Archivo(s):**

Nombre de archivo	Tipo MIME
Thalassophryne .maculosa.aortico.renal.doc	Aplication/Word

Caracteres en los nombres de los archivos: A B C D E F G H I J K L M N O P Q R
S T U V W X Y Z. a b c d e f g h i j k l m n o p q r s t u v w x y z. 0 1 2 3 4 5 6 7 8 9.

Alcance:

Espacial: Escuela de Ciencias de la Salud

Temporal:

Título o Grado asociado con el trabajo:

Médico Cirujano

Nivel Asociado con el Trabajo:

Pre Grado

Área de Estudio:

Sección de Farmacología, Toxinología
Departamento de Ciencias Fisiológicas

Institución(es) que garantiza(n) el Título o grado:

Universidad de Oriente, Núcleo de Anzoátegui

HOJA DE METADATOS PARA TESIS Y TRABAJOS DE ASCENSO – 5/5

Derechos:

De acuerdo al Artículo 41 del Reglamento de Trabajos de Grado: “Los Trabajos de Grado son de exclusiva propiedad de la Universidad de Oriente, y solo podrán ser utilizados para otros fines con el consentimiento del Consejo de Núcleo respectivo, quien deberá participarlo previamente al Consejo Universitario, para su autorización”.

Pereira Carbonara Vito
Alejandro

AUTOR

Aleikar Vásquez
Suárez

TUTOR

Leonardo De
Sousa

TUTOR

Irene
Rodríguez

JURADO

Mercedes Matos
Pérez

JURADO

Profª. Rosibel Villegas

Coordinadora de la Comisión de Trabajos de Grado

POR LA SUBCOMISIÓN DE TESIS