



UNIVERSIDAD DEL ZULIA
REVISTA CIENTÍFICA

FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS
DIVISIÓN DE INVESTIGACIÓN



MARACAIBO, ESTADO ZULIA, VENEZUELA



AVANCES EN LA CARACTERIZACIÓN DEL VENENO DE LA MAPANARE *Bothriopsis medusa*: ALTERACIONES HEMOSTÁTICAS Y RECONOCIMIENTO ANTIGÉNICO POR UN ANTIVENENO VENEZOLANO

ADVANCES IN THE CHARACTERIZATION OF THE MAPANARE VENOM *Bothriopsis medusa*: HEMOSTATIC ALTERATIONS AND ANTIGENIC RECOGNITION BY A VENEZUELAN ANTIVENOM

Carmen Teresa Duque-Zerpa^{1,2*}, Katherine Grillet³ y María Eugenia Pineda²

¹Servicio de Análisis Toxicológico (SATOX), Facultad de Farmacia, Universidad Central de Venezuela. ²Unidad de Biotecnología, Facultad de Farmacia, Universidad Central de Venezuela. ³Escuela de Bioanálisis. Facultad de Medicina. Universidad Central de Venezuela. *Teléfonos: +58 212 6052687. Correo e: ctduque@gmail.com

RESUMEN

Bothriopsis medusa, conocida comúnmente como "viejita" o "mapanare", es una especie venenosa endémica de Venezuela, localizada en los estados Aragua, Carabobo, Miranda, Vargas y Distrito Capital. Esta importante localización geográfica, su coloración críptica, pequeño tamaño y hábitos semiarbóreos, podrían darle cierta relevancia en la incidencia de accidentes ofídicos. Como toda mapanare, se considera que podría inducir un cuadro clínico que incluya: edema, necrosis, hemorragias y/o coagulopatías; sin embargo, la información experimental y clínica sobre esta especie es virtualmente nula. Este estudio caracterizó parcialmente el veneno de *B. medusa* evaluando sus perfiles electroforético y cromatográfico (exclusión molecular), sus actividades hemorrágica, fibrinogenolítica, coagulante y anticoagulante, además de su reconocimiento antigénico por un antiveneno venezolano empleando ensayos de inmuno-precipitación. Los resultados obtenidos evidenciaron un perfil electroforético constituido por proteínas de ~19 a 130 kDa, aunque claramente distribuidas en tres grupos (~19-27; 55-68 y 100-130 kDa). El fraccionamiento presentó cinco fracciones, sin embargo solo las primeras tres presentaron niveles importantes de proteínas. El veneno indujo actividad hemorrágica y fibrinogenolítica, pero no anticoagulante o procoagulante *in vitro*. Los ensayos de inmuno-precipitación mostraron bandas de reconocimiento veneno-antiveneno. En conclusión, el veneno de *B. medusa* presentó características toxicológicas que evidenciaron importantes variaciones con respecto a las exhibidas por otros grupos de mapanares en Venezuela, como aquellas pertenecientes al género *Bothrops* las cuales se relacionaron esencialmente a la ausencia de efecto procoagulante el cual determina actualmente

el diagnóstico y tratamiento en caso de envenenamiento ofídico en el país. Adicionalmente, el veneno comparte antígenos o en su defecto epítetos en común, con aquellos empleados en la producción del antiveneno evaluado. Este estudio presentó las primeras evidencias sobre el potencial toxicológico del veneno de *B. medusa*, datos que pueden contribuir a ampliar el conocimiento sobre los envenenamientos por "mapanares" en el país y mejorar el manejo clínico en estos accidentes.

Palabras clave: *Bothriopsis medusa*; mapanare; alteraciones hemostáticas; antiveneno

ABSTRACT

Bothriopsis medusa, commonly known as "viejita" or "mapanare" is a venom species endemic to Venezuela. This is distributed in the States of Aragua, Carabobo, Miranda, Vargas and Capital District. This important geographic location, its cryptic coloration, small size and semi-aerial habits, could give it some relevance in the incidence of ophidian accidents. Like all mapanare, it is considered that it could induce an accident characterized by edema, necrosis, hemorrhages and/or coagulopathies, however the experimental and clinical information on this species is scarce. This study partially characterized the venom from *B. medusa*, evaluating its electrophoretic and chromatographic profiles by molecular exclusion, its hemorrhagic, fibrinolytic, coagulant and anticoagulant activities. In addition to its antigenic recognition by a Venezuelan antivenom, using immuno-precipitation assays. The results obtained showed an electrophoretic profile constituted by proteins of ~19 to 130 kDa, although clearly distributed in three groups (~19-27, 55-68 and 100-130 kDa). The fractionation presented five fractions, however only the first three showed important levels of proteins. The venom induced hemorrhagic and fibrinolytic activities, but not anticoagulant or procoagulant *in vitro*. The immuno-precipitation assays showed venom-antivenom recognition bands. In conclusion, the venom of

B. medusa presented toxinological characteristics that showed important variations with respect to those exhibited by other groups of mapanares in Venezuela, as those belonging to the *Bothrops* genus, which were essentially related to the absence of a procoagulant effect which determines the diagnosis and treatment in case of ophidian envenomation in the Country. Additionally, the venom shares antigens or, failing that, common epitopes, with those used in the production of the antivenom evaluated. This study presented new evidences about the toxinological potential of the venom of *B. medusa*, which can contribute to broaden the knowledge about the envenomation from “mapanares” in the Country and improve the clinical management of these accidents.

Key words: *Bothriopsis medusa*; mapanare; hemostatic alterations; antivenom

INTRODUCCIÓN

En Venezuela, el envenenamiento por mordedura de serpiente es considerado un problema de salud colectiva, debido al elevado número de casos que se producen (expertos estiman alrededor de 7.000 casos anualmente) y la gravedad de los mismos [4, 28, 34]. Estos accidentes se considera están relacionados específicamente a siete géneros [8, 22, 26, 27], que incluyen: *Micrurus* (serpientes de coral), *Lachesis* (cuaimas), *Crotalus* (cascabeles), además de *Porthidium*, *Bothrops*, *Bothriechis* y *Bothriopsis* conocidas comúnmente en conjunto como mapanares [8, 22, 28]. Sin embargo, en el caso particular del género *Bothriopsis* se debe referir que existe una clara divergencia taxonómica, algunos autores abogan por la sinonimia de éste con *Bothrops*, mientras que otros han sostenido que *Bothriopsis* debería permanecer como un género distinto [3, 5, 23, 35] y de hecho se puede observar actualmente el uso de ambas denominaciones en la literatura científica en Suramérica [5, 18, 22-24, 26, 30, 35, 36].

A grandes rasgos se considera que los envenenamientos causados por las especies conocidas popularmente como mapanares cursan con un cuadro clínico característico, que puede incluir según la gravedad del caso: edema, dolor, necrosis, hemorragias y/o alteraciones en la coagulación sanguínea, eventos que son consecuencia del efecto aditivo y/o sinérgico del coctel enzimático presente en estos venenos [28, 29]. Sin embargo es ampliamente conocido que los venenos de serpiente presentan una profunda variabilidad bioquímica en su composición, la cual se ha evidenciado está asociada al género, especie (inter e intra), localización geográfica de los ejemplares y sus características ontogénicas, factores que pueden inducir variaciones relevantes en la expresión del cuadro clínico a presentarse en las víctimas e incluso limitar la efectividad de los antivenenos empleados clínicamente [6, 7, 10, 31, 34]. Esto implica la necesidad de caracterizar los venenos de importancia médica, haciendo énfasis en su composición bioquímica y toxicidad, además de evaluar si los antivenenos, única terapia específica disponible para el tratamiento de estos casos, son

efectivos en la neutralización de las toxinas responsables por el envenenamiento, lo cual permitiría garantizar la disponibilidad de datos experimentales, que reflejen la realidad del ofidismo en las zonas estudiadas, facilitando la interpretación de los cuadros clínicos, el seguimiento de los pacientes y la preparación de antivenenos más efectivos. Sin embargo, en Venezuela para el caso particular del género *Bothriopsis* no se dispone de evaluaciones experimentales que expongan el potencial tóxico de su veneno, lo cual puede implicar el abordaje de las víctimas con protocolos empíricos.

En Venezuela se considera que el género *Bothriopsis* incluye tres especies: *taeniata*, *bilineata* y *medusa*. *B. taeniata* descrita en el estado Bolívar, *B. bilineata* en los estados Amazonas y Bolívar, mientras que *B. medusa* (conocida popularmente como “viejita” o “mapanare”) se considera distribuida exclusivamente en el tramo central de la Cordillera de la Costa, localizándose predominantemente en bosques nublados de los estados Aragua, Carabobo, Miranda, Vargas y Distrito Capital, a una altura entre los 1.000 a 2.000 metros sobre el nivel del mar (m.s.n.m.), lo cual la hace una especie endémica [22, 23, 26]. Esta relevante localización geográfica de *B. medusa*, la cual abarca zonas densamente pobladas, aunado a su coloración críptica, su pequeño tamaño que varía de 50 a 70 centímetros (cm) y hábitos semiarbóreos [4, 23, 35] podrían implicar una importante participación en la incidencia de accidentes ofídicos en Venezuela. Con base en estas consideraciones, este estudio caracterizó parcialmente el veneno de la serpiente *B. medusa* y evaluó su reactividad frente a un antiveneno comercial venezolano.

MATERIALES Y MÉTODOS

Veneno

Se utilizó una mezcla de veneno cristalizado, obtenido a partir del ordeño manual de tres individuos adultos de *B. medusa*, recolectados en la localidad de El Junquito, en el estado Vargas y mantenidos en cautiverio en el serpentario de la Unidad de Biotecnología. Facultad de Farmacia. Universidad Central de Venezuela (UCV). Dicho veneno fue conservado hasta su evaluación en un desecador (Duran®, Mod. Tam, Alemania) con CaCl₂ el cual fue mantenido al vacío y a 4°C en un cuarto frío (Refrigeración Caiz®, Winter, Venezuela).

Antiveneno

Se utilizó el suero antiofídico polivalente (Lote 182), producido en la Facultad de Farmacia de la UCV, el cual de acuerdo a lo declarado por el fabricante, está constituido por fragmentos F(ab')₂ de inmunoglobulinas, obtenidas por la inmunización de caballos (*Equus caballus*) con una mezcla de venenos de los géneros *Bothrops* y *Crotalus* y neutraliza al menos 2 miligramos (mg) de veneno de *B. colombiensis* por cada mililitro (mL) de antiveneno.

Fraccionamiento del veneno

El fraccionamiento del veneno se realizó por cromatografía de exclusión molecular. Para esto 5,1 miligramos (mg) de veneno disuelto en 2,5 mililitros (mL) de una solución de acetato de amonio 0,02 Molar (M) y previamente centrifugados a 1.240 G durante 10 minutos (min) (Centrífuga Sorval®, GLC-1, China), se eluyeron en una columna Bio-Silect® SEC 125-5 de 7,8 x 300 milímetros (mm), previamente equilibrada con una solución de acetato de amonio 0,02 M y ajustada a una velocidad de flujo de 0,7 mL/min. Los eluatos obtenidos se evaluaron a través de un detector ultravioleta (UV) (Bio-Rad®, BioFrac™, EUA) a 280 nanómetros (nm) y se registró el cromatograma correspondiente.

Electroforesis

La electroforesis del veneno se realizó en geles de poliacrilamida al 12,5%, en condiciones disociantes con sodio dodecilsulfato (SDS), en presencia y ausencia de una mezcla comercial de inhibidores de proteasas (SIGMA® Cat P-2714). Previamente las muestras, con o sin inhibidores, se disolvieron en buffer de muestra (BM) constituido por 3% SDS, 30% glicerol y azul de bromofenol en buffer Tris-HCl 1,5 M; pH 6,8. La electroforesis se llevo a cabo a 120 voltios (V) hasta completar la corrida. Las bandas de proteínas fueron visualizadas con azul de Coomassie R-250 y su masa molecular se estimó empleando como referencia un marcador de peso molecular de amplio rango (BIO-RAD® Cat. 161-0318) [19].

Determinación de la actividad coagulante

La actividad coagulante fue evaluada empleando plasma humano citratado (9:1) como sustrato, el cual se distribuyó a razón de 0,2 mL en tubos de ensayo de plástico, los cuales se incubaron en baño María (Gallenkamp®, Model 2, Inglaterra) a 37°C durante 3 min. Post incubación se adicionó, a razón de 4 tubos por tratamiento, alícuotas de 0,1mL de soluciones con 100 y 200 microgramos (µg) de veneno en solución de NaCl 0,85% y se midió el tiempo de coagulación del plasma con la ayuda de un cronómetro (Casio®, HS-5, Japón). Los resultados se expresaron como dosis coagulante mínima (DCM), definida como la menor cantidad de veneno que indujo la coagulación del plasma en 1 min. Los controles fueron constituidos por soluciones de trombina 5 unidades (U)/mL (SIGMA®) y de NaCl 0,85% [15].

Determinación de la actividad anticoagulante

Alícuotas de plasma humano citratado (9:1) se distribuyeron a razón de 0,1 mL en tubos de ensayo de vidrio y se incubaron en baño María (Gallenkamp®, Model 2, Inglaterra) a 37°C durante 5 min. Post incubación se añadió, a razón de cuatro tubos por tratamiento, 0,05 mL de soluciones de veneno conteniendo 25; 50; 100 y 200 µg en solución de NaCl 0,85% o 0,05 mL del vehículo. Las mezclas se continuaron incubando a 37°C durante 5 min, en baño María (Gallenkamp®, Model 2, Inglaterra), al cabo

de los cuales se adicionó 0,1 mL de CaCl₂ 0,1 M y se completó la incubación durante 30 min, registrándose la formación o no de un coagulo estable [25].

Determinación de la actividad proteolítica del veneno sobre fibrinógeno

Mezclas constituidas por una concentración constante de fibrinógeno humano (100 µg, SIGMA®) y concentraciones seriadas del veneno (2,28x10⁻⁴ a 0,5 µg), en buffer Tris-HCL pH 7,5 y 0,02 M, se incubaron en baño María (Gallenkamp®, Model 2, Inglaterra) a 37° C durante 30 min. Post incubación, se adicionó a cada una de las muestras 100 µL de una solución 3,2 % β-mercapto-etanol en BM y se llevaron a un baño de agua hirviendo durante 5 min. La degradación diferencial de las cadenas α, β y/o γ del fibrinógeno fue expuesta empleando electroforesis con geles de poliacrilamida-SDS al 12,5% con tinción de azul de Coomassie R-250 [9].

Evaluación de la actividad hemorrágica

Alícuotas de 0,1 mL de soluciones de veneno conteniendo 2,5 y 5,0 µg en solución de NaCl 0,85% se inyectaron por la vía intradérmica en la región abdominal a grupos de cuatro ratones (*Mus musculus*) (cepa IVIC) por dosis. Un grupo adicional de ratones, se trató con 0,1 mL del vehículo y constituyó el control del experimento. Dos horas (h) después de la inyección, los ratones se sacrificaron por dislocación cervical, se removió la piel de la región abdominal, y se midió el área de la lesión hemorrágica. Posteriormente, se determinó el diámetro (mm) de las lesiones por la aplicación de la formula: $D = 2\sqrt{\text{área}/\pi}$. Los resultados se expresaron en términos de diámetro promedio para cada grupo de tratamiento [18].

Evaluación del reconocimiento antigénico del veneno por un antiveneno comercial venezolano

En placas de Petri de plástico de 6 cm de diámetro, se adicionaron 5 mL de una solución al 1% agarosa en buffer de fosfato salino (PBS) pH 7,2. Una vez solidificado el gel, con la ayuda de un sacabocado se abrieron pozos de 4-5 mm de diámetro formando un patrón hexagonal con un pozo central. En el centro de las placas se colocaron 20 µL del antiveneno y en su periferia 20 µL de soluciones del veneno conteniendo de 5 a 80 µg en PBS pH 7,2. Posteriormente las placas se incubaron en cámara húmeda a temperatura ambiente durante 24 h, al cabo de las cuales fueron lavadas con cambios consecutivos de PBS diluido (1:4), empleando agitación leve durante 24 h (Gyrotory®, Shaker-Model 62, EUA). Las líneas de precipitación por formación de inmunocomplejos fueron evidenciadas por tinción con azul de Coomassie R 250 [21].

Análisis estadístico

Para la determinación de la DCM se construyeron gráficas dosis-respuesta, con curvas de regresión lineal con transformaciones

semilogarítmicas, a partir de las cuales se calculó la ecuación de la recta y los valores de "r²", considerándose regresiones significativas a un intervalo de confianza del 95% (P<0,05). Los resultados se estimaron a partir de la ecuación de la recta y se expresaron como la media aritmética ± la desviación estándar de tres evaluaciones independientes, empleando estadística descriptiva. Se utilizó el programa estadístico GraphPad Prism® 5.01.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

B. medusa es una especie venenosa endémica de Venezuela, la cual abarca importantes zonas regiones pobladas en la región central de la Cordillera de la Costa [23, 26]. Ante la ausencia de datos experimentales o clínicos específicos para esta especie, se considera con base en estudios para otras mapanares en Venezuela o en otras especies del género *Bothriopsis* en Suramérica como *taeniata*, *punctata* o *bilineata* que *B. medusa* podría ser poseedora de un veneno con características hemotóxicas y miotóxicas [18, 24, 30, 36]. Sin embargo, la reconocida variabilidad en la constitución bioquímica de los venenos y sus repercusiones [6, 7, 10, 31, 34], implican la necesidad de caracterizar su veneno y de evaluar si sus toxinas son reconocidas por los antivenenos empleados en el país, de manera de disponer de datos experimentales que sienten bases para garantizar el óptimo abordaje clínico en accidentes por ésta especie.

El fraccionamiento del veneno de *B. medusa*, empleando cromatografía de exclusión molecular (Bio-Silect® SEC 125-5), originó un perfil de elución constituido por un total de cinco picos bien definidos, los cuales se identificaron de FI a FV, como se observa en la FIG. 1. La FI constituyó el pico principal del cromatograma y es seguida en orden de magnitud por FII y FIII, respectivamente. FIV y FV son las fracciones minoritarias, con una magnitud de absorbancia aproximadamente 8-10 veces menor a lo obtenido para FI, FII o FIII (FIG. 1). Dicho perfil, considerando el rango de exclusión de la columna empleada (5-100 kDa), permite referir que el veneno evaluado podría estar constituido principalmente por proteínas de mediana y alta masa molecular. Entre las cuales se pudieran encontrar proteínas con actividad tipo fosfodiesterasas (94-140 kDa), L amino-ácido oxidasas (85-150 kDa), hialuronidasas (73 kDa), así como ciertas metalo y serinoproteasas [16, 20].

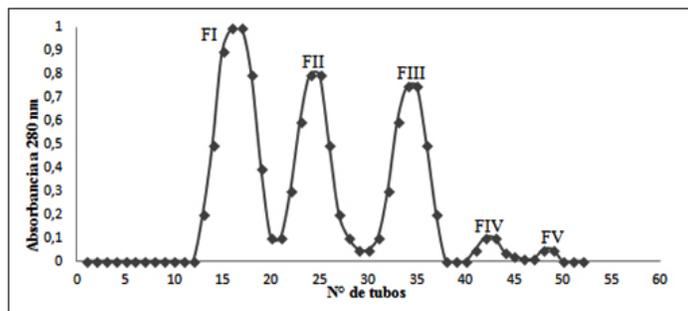


FIGURA 1. PERFIL DE ELUCIÓN OBTENIDO POR CROMATOGRFÍA DE EXCLUSIÓN MOLECULAR DEL VENENO DE *Bothriopsis medusa*

Columna: Bio-Silect® SEC 125-5 (7,8 x 300 mm). Elusión: Acetato de amonio 0,2 M. FI: fracción I. FII: fracción II. FIII: fracción III. FIV: fracción IV. FV: fracción V

Los resultados representan la observación de siete evaluaciones independientes (n: 7)

Esta constitución proteica sugerida al observar el cromatograma en la FIG. 1 es respaldada por el perfil electroforético, obtenido para el veneno de *B. medusa*, el cual se presentó en la FIG. 2. Dicho perfil mostró una distribución de bandas proteicas aproximadamente en el rango de 19 a 130 kDa, las cuales se distribuyen claramente en tres grupos que comprenden proteínas aproximadamente de 19-27; 55-68 y 100-130 kDa, sugiriendo la presencia en el veneno de los constituyentes enzimáticos referidos previamente, además de enzimas tipo fosfolipasas A₂ (~18 kDa) y las diferentes clases de metaloproteasas o toxinas hemorrágicas: PI (20-30 kDa), PII (30-60 kDa) y PIII (60-100 kDa) [16, 20], grupos enzimáticos que han sido descritos en estudios previos para venenos del género *Bothriopsis* en Suramérica [30, 36].

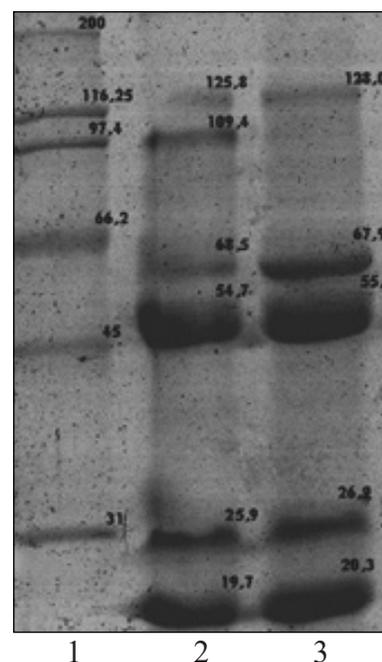


FIGURA 2: PERFIL ELECTROFORÉTICO (GEL DE POLIACRILAMIDA-SDS 12,5%) DEL VENENO DE LA SERPIENTE *Bothriopsis medusa* EN PRESENCIA Y AUSENCIA DE UNA MEZCLA DE INHIBIDORES DE PROTEASAS (SIGMA® Cat P-2714)

Carriles: 1. Marcador de peso molecular (BIO-RAD® Cat. 161-0318). 2. Veneno con inhibidor. 3. Veneno sin inhibidor

Adicionalmente al comparar entre si los perfiles del veneno con y sin inhibidores de proteasas, no se evidenciaron diferencias relevantes bajo las referidas condiciones. Solo se apreció la desaparición de una banda de ~109 kDa, en el caso del perfil sin inhibidores, banda posiblemente asociada a la degradación de ciertas metaloproteasas (FIG. 2). Esto sugiere, en las condiciones experimentales empleadas, bajos niveles de proteasas con actividad autocatalítica en el veneno evaluado, actividad que se ha evidenciado de forma marcada en estudios previos con venenos del género *Bothrops* como *B. colombiensis* [7].

En el caso de la actividad coagulante los resultados obtenidos se presentaron en la TABLA 1. En ésta se muestra que, bajo las condiciones de este estudio, las elevadas concentraciones de veneno evaluadas (100 y 200 µg/0,1mL), no promovieron la coagulación del plasma humano. En el caso de los controles, la solución de trombina de 5 unidades/mL indujo la coagulación del plasma a los 29,20±1,60 segundos (seg) (n: 3), mientras que con la solución de NaCl 0,85% el plasma se mantuvo incoagulable.

TABLA I
EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD COAGULANTE DEL
VENENO DE *Bothriopsis medusa*

Concentración evaluada (µg/100µL)	Efecto sobre el plasma
100	No coaguló
200	No coaguló
Control negativo (NaCl 0,85%)	No coaguló

Los resultados representan la observación de tres evaluaciones independientes (n: 3)

Estos resultados sugieren que el veneno de *B. medusa* podría carecer de enzimas tipo activadores del factor X y/o protrombina, grupos relacionados con la acción procoagulante directa de los venenos sobre el plasma humano [32], aunque no se debería descartar que éstas pudieran encontrarse en muy bajas concentraciones en el veneno evaluado. Estos resultados coinciden con reportes previos para serpientes de este género, como *B. taeniata* (Ecuador), aunque también se debe referir que en el caso de otras especies de dicho género como *B. punctata* (Ecuador), se ha reportado una leve actividad coagulante (DCM: 21±3 µg) [18] y difiere marcadamente de lo reportado para venenos del género *Bothrops* en Venezuela, los cuales se caracterizan por su elevada actividad procoagulante [6, 33], la cual incluso ha llegado a determinar el diagnóstico y tratamiento en casos de envenenamiento ofídico en Venezuela [27].

En la evaluación de la actividad anticoagulante se observó que el veneno evaluado no inhibió la coagulación del plasma humano bajo las condiciones de este estudio (TABLA II). Por el contrario, concentraciones del veneno de 100 y 200 µg/50 µL indujeron la

formación de un coágulo firme en ausencia de CaCl₂ a los 5 min de incubación; mientras que con concentraciones de 25 y 50 µg/50 µL se evidenció la formación de un coágulo estable a los 30 min, después de la adición de calcio al medio (n: 3).

TABLA II

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTICOAGULANTE DEL
VENENO DE *Bothriopsis medusa*

Concentración evaluada (µg/50µL)	Efecto sobre el plasma
25	Coaguló
50	Coaguló
100	Coaguló en ausencia de CaCl ₂
200	Coaguló en ausencia de CaCl ₂
Control negativo (NaCl 0,85%)	No coaguló
Control positivo (NaCl 0,85%/ CaCl ₂)	Coaguló

Los resultados representan la observación de tres evaluaciones independientes (n: 3)

Estos resultados permiten señalar dos aspectos interesantes: (1) En efecto, el veneno de *B. medusa* evaluado presenta constituyentes capaces de inducir la coagulación del plasma humano, sin embargo éstos se encuentran en muy bajas concentraciones en comparación a lo reportado para diferentes venenos del género *Bothrops* en Venezuela [6], otras especies del género *Bothriopsis* como *punctata* de Ecuador (DCM: 21±3 µg) [18] o incluso algunas especies crotálicas, las cuales se caracterizan por su débil actividad procoagulante *in vitro* como *C. durissus cumanensis* (estado Zulia-Venezuela) (DCM: 31,4±2,3 µg) [31]. (2) Este veneno podría carecer de proteínas capaces de prolongar el tiempo de recalcificación del plasma o éstas se encuentran en muy bajas concentraciones, por lo que su efecto no pudo ser evidenciado bajo las condiciones de este estudio. De hecho Verheij y col. [38] evaluando el potencial anticoagulante de cierto grupo enzimático señalaron con base en la magnitud de este efecto que las enzimas evaluadas podían dividirse en tres grupos que incluyen: (1) las fuertemente anticoagulantes, (2) las que requieren altas concentraciones para mediar dicho efecto (3-10µg/mL) y aquellas (3) débilmente anticoagulantes, las cuales incluso a muy elevadas concentraciones (20µg/mL) no prolongaron el tiempo de coagulación significativamente (< a 25 min).

Con esto en consideración y al revisar los estudios previos para venenos en los que se ha reportado efecto anticoagulante, se puede observar que algunos de ellos podrían entrar dentro de esa consideración de débilmente anticoagulante como es el caso de

Porthidium lansbergii rozei (estado Sucre-Venezuela) o *Micrurus mipartitus* (Colombia), para los cuales se reportó un tiempo de recalcificación del plasma de 5 y 10 min, respectivamente [11, 25].

Entre los constituyentes de los venenos responsables por este efecto se han descrito fosfolipasas A₂ (fuertemente básicas), metaloproteasas (α -fibrinogenasas), serinoproteasas (activadores de proteína C, enzimas tipo trombina), L amino-ácido oxidasas y/o proteínas liberadoras de lectina tipo C, estas últimas carentes de actividad enzimática [17, 36], las cuales han sido descritas en venenos de la familia Viperidae que incluyen *Bothrops jararaca*, *B. atrox*, *B. cotiara*, *B. moojeni*, *B. jararacussu*, *B. neuwiedi*, *B. leucurus* y *Lachesis muta* [13, 14, 17].

En el caso de la actividad fibrinogenolítica, los resultados obtenidos evidenciaron la degradación proteolítica directa del fibrinógeno, por el veneno de *B. medusa*, bajo las condiciones de este estudio (FIG. 3), la cual se caracterizó por la degradación de las cadenas α y β del referido sustrato. En el caso de la cadena α , la degradación se inició con 0,019 μ g de veneno y se observó totalmente degradada con el tratamiento con 0,50 μ g. En el caso de la cadena β la degradación se inició con 0,167 μ g, pero ésta solo fue parcial, incluso al ser expuesta a 0,50 μ g de veneno. Mientras que la cadena γ se mantuvo inalterada, como se aprecia en la FIG. 3.

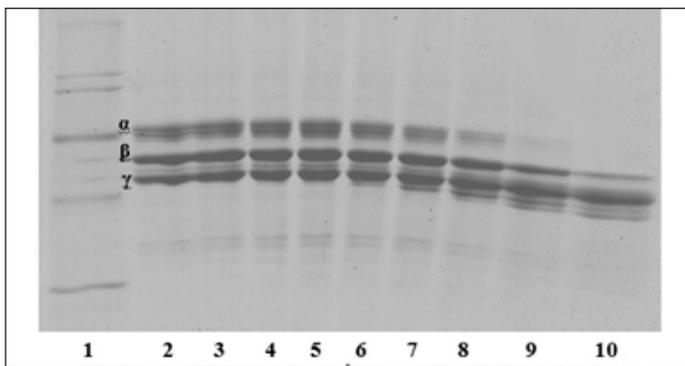


FIGURA 3. ACTIVIDAD FIBRINOGENOLÍTICA DEL VENENO DE *Bothriopsis medusa*. Carriles: 1. Peso Molecular (BIO-RAD® Cat. 161-0318). 2. Fibrinógeno (100 μ g). 3-10: Fibrinógeno (100 μ g). Vs veneno (0,0002; 0,0007; 0,002; 0,006; 0,019; 0,056; 0,167 y 0,50 μ g)

Los resultados representan la observación de tres evaluaciones independientes (n: 3)

Esta actividad ha sido descrita en diferentes venenos de la familia Viperidae en Venezuela como *Bothrops*, *Crotalus* o *Porthidium* [10, 11, 28]. Al comparar los resultados obtenidos, con reportes previos para venenos del género *Bothrops* en Venezuela, se pueden referir diferencias marcadas en los patrones de degradación. Por ejemplo, para el veneno de *B. isabellae* [29] los

autores reportaron la degradación total y selectiva de la cadena α , tras la incubación del sustrato con 1 μ g del veneno durante 30 min, mientras que la degradación de la cadena β se inició a la 2 h. Resultados similares fueron reportados para venenos de *B. venezuelensis* de diferentes localidades de la Región Capital (Lagunetica, Baruta, La Boyera) [10], aunque en todos los casos el sustrato se enfrentó a 0,1 μ g de veneno. Sin embargo, en comparación con reportes previos para el veneno de *Porthidium lansbergii rozei* (estado Sucre-Venezuela) se pueden referir similitudes en el patrón de degradación (total de la cadena α y parcial de la β) tras la incubación de 100 μ g fibrinógeno:1 μ g veneno durante 30 min [11].

Estos resultados sugieren la presencia de una relevante actividad fibrinogenolítica en el veneno de *B. medusa*, la cual presentó una elevada potencia sobre la cadena β (como en el caso de *P. l. rozei*) y una magnitud α fibrinogenolítica dentro de lo descrito para los venenos de *B. isabellae*, *B. venezuelensis* y *P. l. rozei* [10, 11].

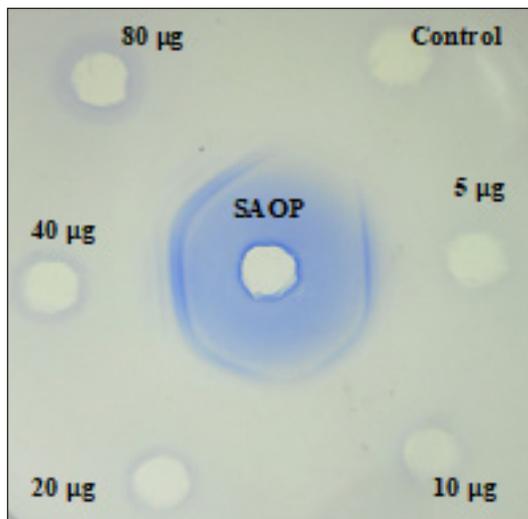
Estudios previos tras la purificación y caracterización de las enzimas responsables de este efecto en diferentes venenos de serpiente, incluyendo especímenes del género *Bothriopsis* como *B. taeniata* [37], han clasificado la mayoría de ellas en α , β o γ fibrinogenasas, según la cadena del fibrinógeno/fibrina sobre la cual actúen más rápidamente y se han identificado como: (1) Serinoproteasas, las cuales incluyen las llamadas enzimas tipo trombina (degradan las cadenas α y/o β) y las fibrinógenasas, para las que se ha descrito usualmente actividad del tipo β -fibrinogenasa [2, 20, 31]. Además de (2) Metaloproteasas dependientes de zinc, capaces de hidrolizar rápidamente la cadena α del fibrinógeno [1, 7, 12, 32, 37].

En el caso de la evaluación de la actividad hemorrágica, se observó que el veneno de *B. medusa* indujo lesiones en el modelo de piel de ratón, las cuales se caracterizaron como lesiones bien definidas, con un diámetro promedio de 10,75 \pm 0,4 y 12,77 \pm 1,05 mm (n: 4, individuos) con dosis de 2,5 y 5 μ g, respectivamente. Estos resultados coinciden con reportes previos en venenos de otras especies de este género, como *B. punctata* o *taeniata* (Ecuador) para los cuales se reportó, después de la inyección de 10 μ g de veneno, el desarrollo de lesiones hemorrágicas en ratones con diámetros promedio de 15,60 y 29,60 mm, respectivamente [18]. Adicionalmente, se debe referir que la actividad hemorrágica evidenciada en el veneno de *B. medusa*, sugiere que éste podría tener un elevado potencial hemorrágico, comparable al atribuido a especies del género *Bothrops* en Venezuela [6, 7, 12, 29].

En cuanto al reconocimiento del veneno de *B. medusa* por el antiveneno venezolano los resultados obtenidos, en el ensayo de inmunodifusión en geles de agarosa, se presentaron en la FIG. 4. En ésta se observó la presencia de bandas de precipitación o inmuno-complejos, para las diferentes concentraciones del veneno evaluado, las cuales fueron observadas como una línea

continua de inmuno-precipitación mostrando identidad completa [21]. Esto permite sugerir, la presencia de antígenos o de epítetos en común entre el veneno de *B. medusa* y los empleados en el inoculo de producción del antiveneno venezolano. Sin embargo, se debe considerar que este reconocimiento antigénico no garantiza la efectiva neutralización de los efectos tóxicos inducidos por el veneno evaluado, por lo que deben realizarse pruebas específicas de neutralización de actividad [15].

FIGURA 4. RECONOCIMIENTO ANTIGÉNICO DEL VENENO DE



LA SERPIENTE *Bothriopsis medusa* POR UN ANTIVENENO VENEZOLANO. Se enfrentaron concentraciones seriadas del veneno (5-80 µg/PBS pH 7,2) con 20 µL antiveneno venezolano (SAOP). **Control:** PBS pH 7,2

Gel teñido con azul de coomassie R-250. **La evaluación fue realizada por duplicado.**

Los resultados obtenidos sugieren que el veneno de *B. medusa*, especie endémica de Venezuela, puede inducir un importante efecto hemorrágico y carece de actividades procogulante y anticogulante *in vitro*, aunque exhibió un importante efecto proteolítico sobre el fibrinógeno. Estas últimas sugieren que en las víctimas de accidentes por esta especie se podría esperar un cuadro clínico caracterizado por la ausencia de coagulopatías, sin embargo no se debería descartar que estas se presenten tardíamente a consecuencia del consumo del fibrinógeno.

Adicionalmente, aunque no se encuentran referencias de envenenamiento por *B. medusa* en la literatura (SciELO, PubMed, ResearchGate), probablemente porque comparte distribución geográfica con importantes especies del género *Bothrops*, como *B. colombiensis* y *B. venezuelensis* [23, 26], y usualmente no se dispone del ejemplar involucrado en el accidente para su identificación [31], las observaciones de este estudio coinciden con hallazgos clínicos referidos en reportes previos de envenenamiento humano con especies del género *Bothriopsis* en Brasil, como *taeniata* [36], veneno que se caracterizó por la

ausencia de actividad procoagulante *in vitro* y una importante actividad hemorrágica *in vivo* [18].

CONCLUSIONES

El veneno de la mapanare *B. medusa* (El Junquito, estado Vargas) se caracterizó por presentar una importante actividad hemorrágica y proteolítica sobre el fibrinógeno humano, además de la carencia de efectos anticoagulante y procoagulante *in vitro*. Estos resultados constituyen las primeras evidencias del potencial toxicológico del veneno de *B. medusa*, datos que pueden contribuir a ampliar el conocimiento sobre los envenenamientos por “mapanares” en el país y mejorar el manejo clínico de los accidentes por ésta especie endémica venezolana.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] AZAÑERO, M.; ESCOBAR, E.; YARLEQUÉ, A. Purificación de una enzima proteolítica del veneno de *Bothrops brazili* y estudio de su actividad sobre fibrinógeno. **Rev. Peru Biol.** 7: 55-66. 2000.
- [2] CARONE, S.; MENALDO, D.; SARTIM, M.; BERNARDES, C.; CAETANO, R.; DA SILVA, R.; CABRAL, H.; BARRAVIEIRA, B.; FERREIRA, R.; SAMPAIO, S. BJS, a novel serine protease from *Bothrops jararaca* snake venom that degrades fibrinogen without forming fibrin clots. **Toxicol. Appl. Pharmacol.** 357: 50-61. 2018.
- [3] CARRASCO, P.; MATTONI, C.; LEYNAUD, G.; SCROCCHI, G. Morphology, phylogeny and taxonomy of South American bothropoid pitvipers (Serpentes, Viperidae). **Zool. Scripta** 41: 109–124. 2012.
- [4] DE SOUSA, L.; BASTOURI-CARRASCO, J.; MATOS, M.; BORGES, A.; BÓNOLI, S.; VÁSQUEZ-SUÁREZ, A.; GUERRERO, B.; RODRÍGUEZ-ACOSTA, A. Epidemiología del ofidismo en Venezuela (1996-2004). **Invest. Clin.** 54(2): 123-137. 2013.
- [5] DEBONO, J., COCHRAN, C.; KURUPPU, S.; NOUWENS, A.; RAJAPAKSE, N.W.; KAWASAKI, M.; WOOD, K.; DOBSON, J.; BAUMANN, K.; JOUIAEI, M.; JACKSON, T.; KOLDAROV, I.; LOW, D.; ALI, S.; SMITH, I.; BARNES, A. FRY, B. Canopy Venom: Proteomic Comparison among New World Arboreal Pit-Viper Venoms. **Toxins.** 8 (210): 2-19. 2016.
- [6] DUQUE-ZERPA, C.T.; FERNÁNDEZ, I.; VARGAS, A.; LÓPEZ-JOHNSTON, J.C.; SCANNONE-TEMPONE, H. Caracterización toxicológica del veneno de *Bothrops atrox* de Puerto Ayacucho, Edo. Amazonas (Venezuela) y su neutralización por un antiveneno venezolano. **Rev. Científ. FVC-LUZ.** XXIV (4): 355-362. 2014.

- [7] DUQUE-ZERPA, C.T.; VARGAS, A. Caracterización toxinológica del veneno de la serpiente *Bothrops colombiensis* de Paracotos, Estado Miranda, Venezuela. **Rev. Científ. FCV-LUZ**. XXV (3): 239-247. 2015.
- [8] FUENTES, O., RODRÍGUEZ-ACOSTA, A. Sobre los géneros *Bothriechis*, *Bothriopsis*, *Bothrops* y *Porthidium* (Serpentes:Crotalidae) existentes en Venezuela. Claves para su identificación de interés biomédico. **Acta Biol. Venez.** 17(3): 31-38. 1997.
- [9] GAY, C.; LEIVA, L.; TEIBLER, P; ACOSTA DE P, O. Proteolytic, edematogenic and mitotoxic activities of a hemorrhagic metalloproteinase isolated from *Bothrops alternatus* venom. **Toxicon**. 46: 546-554. 2005.
- [10] GIRÓN, M.E.; PADRÓN, V.; RAMOS, M.I.; SÁNCHEZ, E.; GUERRERO, B.; GARCÍA, A.; UZCÁTEGUI, N.; NAVARRETE, L.F.; RODRÍGUEZ-ACOSTA, A. Intraspecies geographical variability in the South American tigrá mariposa (*Bothrops venezuelensis* Sandner 1952) snake venom activities. **Toxicon**. 144: 23-33. 2018.
- [11] GIRÓN, M.E.; RAMOS, M.I.; CEDEÑO, L.; CARRASQUEL, A.; SÁNCHEZ, E.; NAVARRETE, L.F.; RODRÍGUEZ-ACOSTA, A. Exploring the biochemical, haemostatic and toxicological aspects of mapanare dry-tail (*Porthidium lansbergii rozei*) snake's venom causing human accidents in Eastern Venezuela. **Invest. Clin.** 59(3): 260-277. 2018.
- [12] GIRÓN, M.E.; SALAZAR, A.; AGUILAR, I.; PÉREZ, J.; SÁNCHEZ, E.; AROCHA-PINANGO, C.; RODRÍGUEZ-ACOSTA, A.; GUERRERO, B. Hemorrhagic, coagulant and fibrinolytic activities of crude venom and fractions from mapanare (*Bothrops colombiensis*) snakes. **Comp. Biochem. Phys. Part C**. 147: 113-121. 2008.
- [13] HIGUCHI, D.A.; BARBOSA, C.M.; BINCOLETTA, C.; CHAGAS, J.R.; MAGALHAES, A.; RICHARDSON, M.; SANCHEZ, E.F.; PESQUERO, J.B.; ARAUJO, R.C.; PESQUERO, J.L. Purification and partial characterization of two phospholipases A₂ from *Bothrops leucurus* (white-tailed-jararaca) snake venom. **Biochimie** 89: 319-328. 2007.
- [14] HUATUCO, S.; ESCOBAR, E.; YARLEQUÉ, A. Aislamiento y caracterización parcial de una miotoxina del veneno de la serpiente *Bothrops atrox* (Ophidia: Viperidae). **Rev. Peru Biol.** 11(1): 79-86. 2004.
- [15] INSTITUTO CLODOMIRO PICADO. Técnicas para determinación de actividades tóxicas de venenos y su neutralización por antivenenos. Manual de Procedimientos. Publicaciones de la Universidad de Costa Rica, Facultad de Microbiología. Pp 2-18. 1998.
- [16] KANG, T.; GEORGIEVA, D.; GENOV, N.; MURAKAMI, M.T.; SINHA, M.; KUMAR, R.P.; KAUR, P.; KUMAR, S.; DEY, S.; SHARMA, S.; VRIELINK, A.; BETZEL, C.; TAKEDA, S.; ARNI, R.K.; SINGH, T.P.; KINI, R.M. Enzymatic toxins from snake venom: structural characterization and mechanism of catalysis. **FEBS J.** 278 (23): 4544-4576. 2011.
- [17] KINI, R. Anticoagulant proteins from snake venoms: structure, function and mechanism. **Biochem. J.** 397: 377-387. 2006
- [18] KUCH, U.; MEBS, D.; GUTIERREZ, J.M.; FREIRE, A. Biochemical and biological characterization of ecuadorian pitviper venoms (genera *Bothriechis*, *Bothriopsis*, *Bothrops* and *Lachesis*). **Toxicon**. 34 (6): 714-717. 1996.
- [19] LAEMMLI, U. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**. 227:680-685. 1970.
- [20] LEÓN, G.; SÁNCHEZ, L.; HERNÁNDEZ, A.; VILLALTA, M.; HERRERA, M. SEGURA, A.; ESTRADA, R.; GUTIÉRREZ, J.M. Immune Response Towards Snake Venoms. **Inflam. Allergy Drug Targets**. 10 (5): 1-18. 2011.
- [21] LOMONTE, B. Manual de métodos Inmunológicos. Universidad de Costa Rica. En línea <http://www.icp.ucr.ac.cr/~blomonte/>. 30/01/2019.
- [22] LÓPEZ-JOHNSTON, J.C. Los venenos de las serpientes. En: **Guía de las serpientes de Venezuela. Biología, venenos, conservación y listado de especies**. Navarrete, L.F.; López-Johnston, J.C.; Blanco, A. (Eds.). 1a. Ed. Caracas. Pp 21-47. 2009.
- [23] NATERA, M.; ESQUEDA, L.F.; CASTELAÍN, M. *Bothrops medusa* (Sternfeld, 1920). En: **Atlas serpientes de Venezuela: Una visión actual de su diversidad**. Natera, M.; Diaz, M. (Eds.). 1a. Ed. Editorial Santiago de Chile. Chile. Pp. 248-249. 2015.
- [24] PORTO, B.; TELLI, C.; DUTRA, T.; ALVES, L.; BOZZA, M.; FIN, C.; THIESEN, F.; RENNEN, R. Biochemical and biological characterization of the venoms of *Bothriopsis bilineata* and *Bothriopsis taeniata* (Serpentes: Viperidae). **Toxicon**. 50: 270-277. 2007.
- [25] REY-SUÁREZ, P.; NÚÑEZ, V.; GUTIÉRREZ, J.; LOMONTE, B. Proteomic and biological characterization of the venom of the redbellied coral snake, *Micrurus mipartitus* (Elapidae), from Colombia and Costa Rica. **J. Proteomic**.75: 655-667. 2011.

- [26] RIVAS, G.; MOLINA, C.; UGUETO, G.; BARROS, T.; BARRIO-AMORÓS, C.; KOK, P. Reptiles of Venezuela: an updated and commented checklist. Reptiles of Venezuela: an updated and commented checklist. 2012. ZOOTAXA. Magnolia Press. Anckland, Nueva Zelanda. On line: http://www.academia.edu/1459595/Reptiles_of_Venezuela_an_updated_and_commented_checklist.30/01/2019.
- [27] RODRÍGUEZ-ACOSTA, A. ¿Qué hacer frente a un accidente ofídico? Un manual para el diagnóstico y tratamiento de las mordeduras ocasionadas por serpientes venenosas en Venezuela. **Botica**. 33: 1-21. 2015.
- [28] RODRÍGUEZ-ACOSTA, A.; SALAZAR, A.M.; SALAZAR, E.; SÁNCHEZ, E.; GIRÓN, M.E.; AGUILAR, I.; VIVAS, J.; GUERRERO, B. Sistema fibrinolítico: Métodos de estudio y hallazgos en venenos de serpientes de los géneros *Bothrops*, *Crotalus*, *Micrurus* en Venezuela. **Saber-UDO. Venezuela**. 28 (4): 666-705. 2016.
- [29] RODRÍGUEZ-ACOSTA, A.; SÁNCHEZ, E.; MÁRQUEZ, A.; CARVAJAL, C.; SALAZAR, A.M.; GIRÓN, M.E.; AMALID-ESTRELLA, A.; GIL, A.; GUERRERO, B. Hemostatic properties of Venezuelan *Bothrops* snake venoms with special reference to *Bothrops isabellae* venom. **Toxicon**. 56 (6): 926-935. 2010.
- [30] RODRIGUES, C.; TEIXEIRA-FERREIRA, A.; VARGAS, F.; GUERRA-DUARTE, C.; COSTAL-OLIVEIRA, F.; STRANSKY, S.; LOPES, L.; DUTRA, A.; YARLEQUÉ, A.; BONILLA, C.; SANCHEZ, E.; PERALES, J.; CHÁVEZ-OLÓRTEGUI, C. Proteomic profile, biological activities and antigenic analysis of the venom from *Bothriopsis bilineata smaragdina* ("loro machaco"), a pitviper snake from Peru. **J. Proteomics**. 15 (187): 171-181. 2018.
- [31] RODRÍGUEZ-ACOSTA, A.; UZCATEGUI, W.; AZUAJE, R.; AGUILAR, I.; GIRÓN, M.E. Análisis clínico y epidemiológico de los accidentes por mordeduras de serpientes del género *Bothrops* en Venezuela. **Rev. Cub. Med. Trop**. 52 (2): 90-94. 2000.
- [32] SAJEVIC, T.; LEONARDI, A.; KRIŽAJ, I. Haemostatically active proteins in snake venoms. **Toxicon**. 57: 627-645. 2011.
- [33] SARAVIA, P.; ROJAS, E.; ARCE, V.; GUEVARA, C.; LÓPEZ, J.C.; CHAVES, E.; VELÁSQUEZ, R.; ROJAS, G.; GUTIÉRREZ, J.M. Geographic and ontogenic variability in the venom of the neotropical rattlesnake *Crotalus durissus*: Pathophysiological and therapeutic implications. **Rev. Biol. Trop**. 50 (1): 337-346, 2002.
- [34] SÁNCHEZ, E.; GIRÓN, M.E.; GUERRERO, B.; UZCATEGUI, N.; RODRÍGUEZ-ACOSTA, A. Caracterización bioquímica y biológica del veneno de la serpiente Neotropical Macagua (*Bothrops colombiensis*) de la región de Barlovento, estado Miranda, Venezuela. **Rev. Cub. Med. Trop**. 67 (2):213-230. 2015.
- [35] SCHRAMER, T.; KALKI, Y.; WYLIE, D. The first documented prey items for *Bothrops medusa* (Sternfeld, 1920). Primeras presas documentadas para *Bothrops medusa* (Sternfeld, 1920). **Rev. Lat. Herp**. 2(1): 48-50. 2019.
- [36] TORREZ, P.; DUARTE, M.; FRANÇA, F.; FIGUEIREDO, L.; ABATI, P.; CAMPOS, L.; PEREIRA, P.; QUIROGA, M.; MASCHERETTI, M.; BOULOS, M. First report of an accident with the speckled forest pit viper (*Bothriopsis taeniata*) in Brazil. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop**. 42 (3): 342-344. 2009.
- [37] TORRES-HUACO, F.; MARUÑAK, S.; TEIBLER, P.; BUSTILLO, S.; ACOSTA DE P, O.; LEIVA, L.C.; PONCE-SOTO, L.A.; MARANGONI, S. Local and systemic effects of BtaMP-1, a new weakly hemorrhagic Snake Venom Metalloproteinase purified from *Bothriopsis taeniata* Snake Venom. **Int. J. Biol. Macromol**. 5 (141):1044-1054. 2019.
- [38] VERHEIJ, H.M.; BOFFA, M.C.; ROTHEN, C.; BRYCKAERT, M.C.; VERGER, R.; DE HAAS, G.H. Correlation of enzymatic activity and anticoagulant properties of phospholipase A₂. **Eur. J. Biochem**. 112: 25-32 1980.



REVISTA CIENTÍFICA

Vol, XXIX, N° 4

*Esta revista fue editada en formato digital y publicada en
Diciembre 2019, por La Facultad de Ciencias Veterinarias,
Universidad del Zulia. Maracaibo-Venezuela.*

www.luz.edu.ve
www.serbi.luz.edu.ve
produccioncientifica.luz.edu.ve