

CARACTERIZACIÓN TOXINOLÓGICA DEL VENENO DE LA SERPIENTE *Bothrops colombiensis* DE PARACOTOS, ESTADO MIRANDA, VENEZUELA

Toxinological Characterization of *Bothrops colombiensis* Snake Venom from Paracotos, Miranda State, Venezuela

Carmen Teresa Duque-Zerpa^{1,2*} y Alba Vargas²

¹Servicio de Análisis Toxicológico. Facultad de Farmacia. Universidad Central de Venezuela.

²Unidad de Biotecnología. Facultad de Farmacia. Universidad Central de Venezuela.

*Teléfono: 58 0412-7012397. ctduque@gmail.com

RESUMEN

Bothrops colombiensis es una de las serpientes venenosas predominantes en Venezuela, abarca todo el oriente, centro, occidente y algunas regiones del sur del país, al norte del río Orinoco, desde el nivel del mar hasta unos 2.500 metros de altura. Esta amplia distribución geográfica en los ofidios venenosos ha sido asociada a variabilidad en la composición de sus venenos, característica que influye en la fisiopatología observada en las víctimas y en la capacidad neutralizante de los antivenenos, esto implica la necesidad de caracterizar toxicológicamente los venenos de importancia médica para coleccionar datos experimentales que permitan mejorar el manejo clínico y seleccionar venenos representativos para la producción de antivenenos. Este estudio planteó la caracterización toxicológicamente del veneno de *Bothrops colombiensis* de Paracotos (Edo. Miranda), región geográfica no evaluada, estimando sus actividades letal, hemorrágica, edematizante, coagulante, defibrinante y necrosante, así como su perfil electroforético. Los resultados obtenidos evidenciaron un perfil toxicológico similar a lo usualmente descrito para este género, aunque con variaciones cuantitativas como una elevada actividad edematizante, una baja actividad hemorrágica y un importante efecto neurotóxico, observado por primera vez en esta especie. La posible incidencia de estos resultados en el cuadro clínico, tras el accidente por esta especie, hace necesario documentar esta situación con estudios clínicos y evaluar el potencial neutralizante de la terapia antiofídica existente. Adicionalmente, la escasa actividad hemorrágica evidenciada sugiere que el veneno evaluado no posee una carga antigénica representativa del poten-

cial hemorrágico del género *Bothrops*, por lo que no debería ser empleado como único representante de su especie para la producción de antivenenos en Venezuela.

Palabras clave: *Bothrops colombiensis*, caracterización toxicológica, hemorragia, efecto neurotóxico.

ABSTRACT

Bothrops colombiensis is one of the predominant venomous snakes in Venezuela; its range covers the whole Eastern, Central and Western Regions and some Southern regions of the country, to the North of the Orinoco river, from sea level up to 2500 meters in height. This wide geographic distribution of a venomous snake has been associated to the variability of the venom composition, which influences both the physiopathology observed in the victims and the neutralizing capacity of antivenoms. This fact justifies the characterization of venoms of medical importance, in order to gather experimental data that will allow to improve the clinical management and to choose representative venoms for antivenom production. This study proposed the toxinological characterization of *Bothrops colombiensis* snake venom from Paracotos, Miranda State, a geographical region not evaluated, as for venoms, in order to estimate its lethal, hemorrhagic, edema-forming, coagulant, defibrinating and necrotizing activities and also its electrophoretic profile. The results show a toxinological profile similar to the one described for this genus, even though with some highlighted quantitative variations such as high edema-forming activity, a low hemorrhagic effect and a high neurotoxic effect, which has been observed for the first time on this Venezuelan species. The relevance of these results in the clinical context makes it necessary to document these with clinical studies

and the evaluation of the neutralizing capacity of the antivenom. In addition, the scarce hemorrhagic activity suggests that the evaluated venom does not seem to have an antigenic charge which properly represents the hemorrhagic potential of *Bothrops* genus and it should not be used alone for the antivenom production in Venezuela.

Key words: *Bothrops colombiensis*, toxinological characterization, hemorrhage, neurotoxic effect.

INTRODUCCIÓN

En Venezuela, el envenenamiento por mordedura de serpiente constituye un problema de salud pública [4, 8], los expertos señalan una incidencia de 7000 accidentes al año, de los cuales un 70 a 80% son atribuidos a serpientes del género *Bothrops* [8, 18]. Dentro de este género, *Bothrops colombiensis* es la especie predominante en Venezuela, abarca todo el oriente, centro, occidente y algunas regiones del sur del país, al norte del río Orinoco, desde el nivel del mar hasta unos 2500 metros de altura, aunque se restringe a áreas tropicales y subtropicales, principalmente aquellas representadas por bosques húmedos, piedemontes y márgenes de los ríos, lo que la convierte en una de las especies principalmente asociada al accidente ofídico [13].

El envenenamiento por este género se caracteriza por la presencia de daños locales rápidos y prominentes que incluyen: hemorragia, edema y necrosis; seguidos de alteraciones sistémicas entre las que se encuentran: hemorragias, coagulopatías, colapso cardiovascular e insuficiencia renal aguda [32], las cuales son la consecuencia del efecto aditivo y/o sinérgico de una variedad de enzimas presentes en los venenos, como fosfolipasas (PLA₂), esterasas, exonucleasas, 5´nucleotidasas, L-aminoácido oxidasas, hialuronidasas, ribonucleasas, serino proteasas y metaloproteasas, entre otras, las cuales representan entre un 90-95% del peso seco del veneno [6, 7, 36]. A esta complicada constitución bioquímica se suman constantes evidencias de variaciones en la constitución de los venenos de acuerdo a su localización geográfica y características ontogénicas [3, 5-7, 28, 38, 39]. Estas variaciones, conforme a su magnitud e implicaciones bioquímicas, pueden tener repercusiones en el cuadro fisiopatológico desarrollado en las víctimas y sobre el potencial neutralizante de los antivenenos, único tratamiento específico disponible [3, 22, 29, 37, 38]. En consecuencia, las regiones con una abundante herpetofauna venenosa, como es el caso de Venezuela, deben realizar esfuerzos para identificar las serpientes de importancia médica, caracterizar ampliamente sus venenos y reconocer los factores implicados en la morbilidad y mortalidad de los accidentes ofídicos, de manera de establecer pautas para mejorar el tratamiento de las víctimas y fortalecer las etapas de diseño, producción y control de los antivenenos con base a la realidad del ofidismo en las regiones implicadas [8, 38, 40]. El objetivo de este estudio fue caracterizar toxinológicamente el veneno de *Bothrops colombiensis* de Paracotos (Edo. Miranda).

MATERIALES Y MÉTODOS

Veneno

Se utilizó una mezcla de veneno cristalizado, obtenido a partir del ordeño manual de cinco individuos adultos (4 hembras y 1 macho) de *Bothrops colombiensis*, recolectados en la localidad de Paracotos municipio Guaicaipuro en el estado Miranda (Venezuela) y mantenidos en cautiverio en el serpentario de la Facultad de Farmacia de la Universidad Central de Venezuela. Dicho veneno fue conservado hasta su evaluación en refrigeración a 4°C en un desecador al vacío (Duran®, Mod. Tam, Alemania).

Animales de experimentación

Se emplearon ratones blancos (*Mus musculus*), cepa NIH, sin distinción de sexo, con pesos pre-establecidos para cada prueba y procedentes del Bioterio del Instituto Nacional de Higiene "Rafael Rangel", Ciudad Universitaria, Caracas- Venezuela.

Perfil electroforético

La electroforesis del veneno se realizó en geles de poliacrilamida al 12,5%, en condiciones no reducidas (SDS-PAGE) de acuerdo al método de Laemmli [21]. Se emplearon alícuotas de 7 µL de soluciones de veneno y mezclas de veneno/EDTA-Na₂ (5 mM) y veneno/Benzamidina (1 mM) a una concentración de 2 µg/µL en un buffer constituido por 10% duodecilsulfato de sodio (SDS), 1% de glicerol, 0,02% de azul de bromofenol y Tris 0,5 M pH 6,8. Las bandas de proteínas fueron visualizadas con azul de Coomassie y su masa molecular se estimó empleando como referencia una mezcla de pesos moleculares de amplio rango (BIO-RAD® Cat. 161-0318).

Determinación de la dosis letal cincuenta (DL₅₀)

La DL₅₀ se determinó de acuerdo al método de Spearman-Kärber [40]. Grupos de cuatro ratones por dosis, con pesos entre 18 y 20 gramos (g), fueron inyectados por vía intraperitoneal con 0,2 mL de soluciones del veneno conteniendo 75, 150, 300, 600 y 1200 µg/mL en NaCl al 0,85%. Luego de 48 horas (h) se registró el número de animales muertos por dosis. Durante la evaluación de esta actividad se registraron los signos de toxicidad aguda evidenciados en los ratones.

Determinación de la actividad hemorrágica

Grupos de cuatro ratones por dosis, con pesos entre 22 y 24 g, fueron inyectados por vía intradérmica en la región abdominal con 0,1 mL de soluciones del veneno conteniendo 150, 300, 600 y 1.120 µg/mL en NaCl al 0,85%. Un grupo adicional de cuatro ratones se inyectó con 0,1 mL del vehículo y constituyó el control del experimento. A las 2 h. se evaluó el área hemorrágica inducida por cada tratamiento, los resultados se expresaron como dosis hemorrágica mínima (DHM) definida como la cantidad de veneno que indujo un área hemorrágica de 10 mm de diámetro [19].

Determinación de la actividad desfibrinante

La actividad desfibrinante se estimó por la inducción de incoagulabilidad en la sangre de ratones. Grupos de cuatro ratones por dosis, con pesos entre 22 y 24 g, fueron inyectados por vía intravenosa con 0,2 mL de soluciones del veneno conteniendo 5; 10; 20 y 40 µg/ml en NaCl al 0,85%. Un grupo adicional de cuatro ratones se inyectó con 0,2 mL del vehículo y se empleó como control. Luego de 1 h, los animales se anestesiaron con éter y se extrajeron 200 µL de sangre a través de un corte en la arteria braquial. Las muestras se colocaron individualmente en tubos de ensayo secos y a las 2 h. se evaluó la coagulación de las mismas. Los resultados se expresaron como dosis desfibrinante mínima (DDM), definida como la menor cantidad de veneno que indujo la incoagulabilidad de la sangre por grupo tratado [19].

Determinación de la actividad coagulante

La actividad coagulante se estimó empleando plasma humano citratado (9:1) como sustrato, el cual se distribuyó a razón de 0,1 mL en tubos de ensayo de plástico, se añadió 0,1 mL de buffer Tris-HCL 0,01 M pH 7,3/NaCl 0,15 M a cada tubo y se incubaron en baño María (Gallenkamp®, Model 2, Inglaterra) a 37°C. durante 1 min. Post incubación se adicionó al plasma 0,1 mL de soluciones del veneno conteniendo 20; 40; 80; 160 y 320 µg/mL en NaCl al 0,85% (4 tubos por tratamiento) o 0,1 mL de NaCl 0,85% (control de vehículo), las mezclas se llevaron al baño María a 37°C durante 1 min, se adicionó 0,05 M de CaCl₂ y se midió el tiempo de coagulación 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 la menor unidad de tiempo posible [11].

Determinación de la actividad mionecrosante

La actividad mionecrosante se estimó por la cuantificación de la enzima creatina fosfoquinasa (CK) en suero [17]. Una dosis subletal del veneno equivalente a 40 µg/0,1 mL de NaCl al 0,85% se administró por vía intramuscular a un grupo de cuatro ratones con un peso entre los 18-20 g. Un grupo adicional de cuatro ratones se inyectó con 0,1 mL del vehículo y se empleó como control. A las 3 h. los animales se anestesiaron con éter y se extrajeron 500 µL de sangre a través de un corte en la arteria braquial. Las muestras en tubos eppendorf se centrifugaron a 1.240 g durante 10 min. (Centrífuga Sorval®, GLC-1, China) y se separó el suero, donde se cuantificó la enzima CK empleando un kit diagnóstico (Stanbio Laboratory®, Procedimiento N°. 2910). Se determinó la actividad de la enzima CK (U/L) definida como la cantidad de enzima que oxida un µmol/L/min. de NADP. Los resultados se expresaron como la magnitud del incremento de la enzima CK en el grupo tratado con el veneno respecto al control.

Determinación de la actividad edematizante

Grupos de cuatro ratones por dosis, con pesos entre 18 y 20 g se inyectaron en la almohadilla plantar de una de sus extremidades posteriores, con 50 µL de soluciones del veneno conteniendo 5; 10; 20; 40 y 80 µg/mL en NaCl al 0,85%. La extremidad contralateral se inyectó con 50 µL del vehículo y se empleó como control. Luego de 1 h, los animales se sacrificaron bajo anestesia con éter, se seccionaron las extremidades tratadas a la altura de la articulación tarsal con un bisturí y se pesaron en balanza analítica (Mettler®, H10, Suiza). Los resultados se expresaron como dosis edematizante mínima (DEM) definida como la cantidad de veneno que indujo un edema del 30% [19].

Análisis estadístico

Los resultados se expresaron como la media aritmética ± la desviación estándar de tres evaluaciones independientes, empleando estadística descriptiva con un intervalo de confianza del 95% (P<0,05).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La variación en la composición de los venenos de serpientes es un factor asociado a las características ontogénicas de los individuos y a su distribución geográfica, incluso en regiones cercanas como se ha demostrado en diferentes especies del género *Bothrops* en Venezuela [31, 39]. Esta variación en la composición de los venenos puede tener repercusiones, tanto en el cuadro clínico evidenciado en las víctimas como en la potencia neutralizante de los antivenenos, e implica la necesidad de caracterizar los venenos de importancia médica, como es el caso del veneno de *B. colombiensis*, una de las especies principalmente asociada al accidente ofídico en Venezuela [13].

En este estudio, el análisis electroforético del veneno, con y sin inhibidores de proteasas (EDTA y Benzamidina), mostró la presencia de proteínas distribuidas aproximadamente entre los 5-171 kDa, con una elevada densidad de bandas proteicas por debajo de los 36 kDa. El empleo de inhibidores de proteasas permitió exponer la presencia de un grupo minoritario de constituyentes con masas moleculares entre los 50-171 kDa (FIG. I), los cuales son susceptibles de ser degradados en solución a consecuencia de la actividad proteolítica del veneno. La constitución de proteínas del veneno de *B. colombiensis* (Paracotos) difiere de lo reportado en estudios previos para venenos de esta especie procedentes del Guapo y Caucagua (Edo. Miranda) [31], para los cuales se refirió la presencia de proteínas entre los 15-97 kDa. Dichas diferencias podrían ser consecuencia de la reconocida variación en la composición de los venenos, aspecto relacionado a la edad/tamaño de los ejemplares, carga genética de la población, hábitos alimenticios y hábitat, entre otras condiciones [6, 7, 14-16, 35, 37, 38].

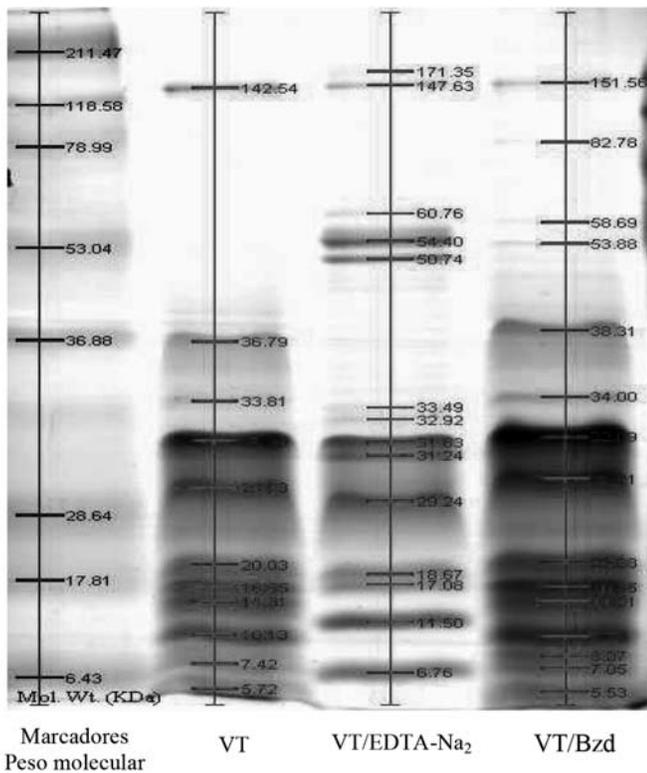


FIGURA 1. PERFIL ELECTROFORÉTICO (SDS-PAGE) DEL VENENO DE LA SERPIENTE *Bothrops colombiensis* (Paracotos. Edo. Miranda)

Marcadores de Peso Molecular (BIO-RAD®. Catalog # 161-0318): Miosina (211,475 kDa). *B* galactosidasa (118,579 kDa). Albúmina de suero bovino (78,995 kDa). Ovalbúmina (53,045 kDa). Anhidrasa carbónica (36,881 kDa). Inhibidor de tripsina (28,643 kDa). Lisozima (17,809 kDa). Aprotinina (6,435 kDa). VT: veneno total. EDTA-Na₂: etilen-di-amino-tetra acetato sódico. Bzd: benzamidina Gel teñido con azul de coomasie.

En la caracterización toxinológica del veneno de *B. colombiensis* (Paracotos, Edo. Miranda), se observó que éste indujo actividades letal, hemorrágica, desfibrinante, edematizante, necrosante y coagulante sobre plasma humano (TABLA I), estos resultados están en concordancia con lo reportado para la mayoría de las serpientes de este género [10, 22, 31, 37], aunque con algunas variaciones cuantitativas al comparar con estudios previos (TABLA II).

En la determinación de la actividad letal se obtuvo una DL₅₀ de 4,92 ± 0,16 mg/kg (n=3). Adicionalmente, durante la evaluación de esta actividad se registraron los signos de toxicidad evidenciados en los ratones tratados, los más relevantes fueron: contractura en extremidades anteriores y parálisis flácida de las posteriores con una dosis de 6 mg/kg, mientras que con dosis del veneno entre los 11-13 mg/kg se observó adicionalmente la presencia de exoftalmos, parálisis flácida de las extremidades anteriores, convulsiones tónico-clónicas y opistótonos, lo cual sugiere la presencia de constituyentes neurotóxi-

**TABLA I
PERFIL TOXINOLÓGICO DEL VENENO DE *Bothrops colombiensis* DE PARACOTOS-EDO. MIRANDA, VENEZUELA**

Actividad Evaluada	Dosis
DL ₅₀ (mg/kg)	4,92 ± 0,16
DHM (µg/ratón)	34,62 ± 6,25
DEM (µg/ratón)	0,62 ± 0,04
DDM (µg/ratón)	3,5
DCM (µg)	0,5

DL₅₀: dosis letal cincuenta, via IP. DHM: dosis hemorrágica mínima. DEM: dosis edematizante mínima. DDM: dosis desfibrinante mínima. DCM: dosis coagulante mínima.

cos en el veneno. Estas observaciones coinciden con reportes previos de potencial neurotóxico en algunos venenos de este género como *B. jararacussu*, *B. erythromelas*, *B. jararaca*, *B. moojeni* y *B. neuwiedii* los cuales indujeron el bloqueo neuromuscular, en modelos nervio-músculo *in vitro*, con la inhibición de la respuesta muscular a la acetilcolina y al cloruro de potasio [41]. Por otra parte, en la caracterización de la fracción I del veneno de la especie *B. venezuelensis* (Venezuela), obtenida por exclusión molecular (Sephadex G100®), se reportó que ésta indujo signos clínicos similares en ratones [24]. Mientras que en el caso de *B. asper* (Costa Rica) se aisló una serino proteasa responsable en ratones de alteraciones tipo pérdida del reflejo de enderezamiento, opistótonos y rotación intermitente sobre el eje del cuerpo [30].

Al comparar la DL₅₀ obtenida con estudios previos (TABLA II), se observó que el veneno de *B. colombiensis* (Paracotos) presentó un índice de letalidad dentro de lo usualmente reportado, con algunas notables excepciones como *B. colombiensis* del Guapo (Edo. Miranda) [14] y *B. atrox* (Edo. Amazonas) [31] los cuales presentan un menor índice de letalidad que el veneno de *B. colombiensis* (Paracotos) o *B. jararaca* [26] y *B. neuwiedii* (Bolivia) [37], los cuales exhibieron una muy potente actividad letal.

En el caso de la actividad hemorrágica, el veneno de *B. colombiensis* (Paracotos) exhibió un escaso potencial hemorrágico (DHM: 34,62 µg) al compararlo con estudios previos para este género (TABLA II). Adicionalmente, se debe referir que con dosis del veneno ≤5µg, rango en el que se encuentra la mayoría de los reportes de DHM para este género (TABLA II), no se observó el desarrollo de lesión hemorrágica en los ratones tratados. La escasa actividad hemorrágica evidenciada en este estudio es similar a la reportada para algunos venenos del género *Crotalus* suramericano, venenos reconocidos por su menor actividad hemorrágica, como *C. d. terrificus* (Colombia) el cual exhibió una DHM de 31,9 ± 6,1 µg [29], y sugiere que el veneno evaluado presenta una menor concentración de las enzimas responsables por esta actividad, la cual es reconocida como uno de los efectos más característico de este género [17, 32].

TABLA II
COMPARACIÓN DE LAS ACTIVIDADES TÓXICAS DEL VENENO DE *B. colombiensis* (PARACOTOS, VENEZUELA)
CON ESPECIES DEL GENERO *Bothrops* DE OTRAS LATITUDES

Especie	DL ₅₀ (mg/kg)	DHM (µg/ratón)	DEM (µg/ratón)	DDM (µg/ratón)	DCM (µg)	Actividad necrosante*
<i>B. jararaca</i> Argentina [1]	NE	4,4	0,85	NE	NE	NE
<i>B. jararacusso</i> Argentina [1]	NE	2,4	1,5	NE	NE	NE
<i>B. neuwidii</i> Argentina [37]	3,29	0,56 ± 0,04	NE	2,6 ± 0,6	OM	NE
<i>B. jararaca</i> . Brasil [26]	2,28	0,43	NE	NE	NE	NE
<i>B. neuwidii</i> . Bolivia [37]	1,23	7,0 ± 1,9	NE	2,0 ± 0,4	OM	1,68 (50)
<i>B. atrox</i> . Colombia [37]	4,47	1,4 ± 0,42	NE	2,2 ± 0,01	OM	3,26 (50)
<i>B. asper</i> . Costa Rica [5]	3,35-4,23	0,8 ± 0,1	1,7 ± 0,1	5	NE	NI
<i>B. atrox</i> . Ecuador [22]	4,59-7,41	3,7 ± 1	NE	1	OM	3,57 (50)
<i>B. brazili</i> . Perú [33]	4,76-6,37	3,71 ± 0,41	1,18	NE	NE	4 (13,50)
<i>B. atrox</i> . Perú [33]	3,55	6,45 ± 0,43	2,95 ± 1,11	2,5	OM	4 (56,30)
<i>B. pictus</i> . Perú [33]	2,31-3,34	1,06 ± 0,15	0,52 ± 0,13	10	OM	4 (15,4)
<i>B. barnetti</i> . Perú [33]	2,30-3,07	0,75 ± 0,26	1,13 ± 0,05	2,5	OM	4 (40,4)
<i>B. atrox</i> . Perú [37]	4,35	1,4 ± 0,07	NE	1,7 ± 0,4	OM	2,56 (50)
<i>B. atrox</i> . Serranía del Cuao. Edo. Amazonas. Venezuela [31]	8,3	4,2 ± 0,5	NE	NE	OM	NE
<i>B. atrox</i> . Edo. Bolívar-Venezuela [31]	4,0	2,7 ± 0,4	NE	NE	OM	NE
<i>B. Isabelae</i> . Trujillo Venezuela [31]	5,9	11,5 ± 1,2	NE	NE	OM	NE
<i>B. atrox</i> . Pto. Ayacucho Edo. Amazonas. Venezuela [10]	3,07 ± 0,52	5,28 ± 0,37	0,84 ± 0,16	5	OM	NE
<i>B. colombiensis</i> . El Guapo. Venezuela [14]	11,6	5,3	NE	NE	NE	NE
<i>B. colombiensis</i> . Caucagua. Venezuela [14]	5,8	11,6	NE	NE	NE	NE
<i>B. colombiensis</i> . Paracotos Venezuela	4,92 ± 0,16	34,62 ± 6,25	0,62 ± 0,04	3,5	0,5	4 (40)

DL₅₀: dosis letal cincuenta, vía IP. DHM: dosis hemorrágica mínima. DEM: dosis edematizante mínima. DDM: dosis desfibrinante mínima. DCM: dosis coagulante mínima. NE: no evaluado. NI: no indicado. OM: otra metodología. *Magnitud del incremento de la enzima CPK en el grupo tratado con el veneno respecto al control. En paréntesis cantidad de veneno evaluado (µg).

La actividad hemorrágica de los venenos del género *Bothrops* es consecuencia de la acción de las reconocidas hemorraginas o metaloproteasas hemorrágicas. Este grupo enzimático está constituido casi en su totalidad por metaloproteasas dependientes de zinc, las cuales degradan los constituyentes de la membrana basal y de la matriz extracelular que rodea las células endoteliales de los capilares y de las vénulas [2, 25]. De acuerdo a su dominio de composición, estas enzimas son clasificadas en tres grupos: (1) la Clase PI con una masa molecular entre 20-30 kDa, compuestas por un dominio catalítico y consideradas factores débilmente hemorrágicos; (2) la Clase PII con masa molecular de 30-50 kDa y constituidas por dos dominios: el catalítico y el tipo desintegrina, este último les confiere una mayor actividad hemorrágica en comparación con la clase PI; y (3) la Clase PIII con una masa entre 50-100 kDa, constituidas por tres dominios: el me-

taloproteasa, el tipo desintegrina y el rico en cisteína, esta última clase se considera que reúne las toxinas hemorrágicas más potentes [16, 23, 25].

En el caso del veneno de *B. colombiensis* (Paracotos), el perfil electroforético obtenido evidenció que precisamente, las proteínas con una masa ≥ 38 kDa representan un grupo minoritario (FIG. 1) lo cual sugiere una escasa presencia de hemorraginas de las clases PII y PIII y podría explicar su atípico potencial hemorrágico. Estos resultados coinciden con lo reportado en estudios proteómicos previos, los cuales han documentado en algunos especímenes adultos de *B. atrox* (Colombia/Venezuela) y *B. colombiensis* (Venezuela) una baja proporción de hemorraginas tipo PIII (4,8-20%), simultáneo a una elevada composición porcentual de hemorraginas tipo PI (21-65%), en contraste a lo

usualmente reportado en los venenos del género *Bothrops* donde las hemorraginas tipo PIII representan entre un 54-69% de las proteínas del veneno total [6, 7].

Esta escasa actividad hemorrágica en el veneno *B. colombiensis* (Paracotos. Edo. Miranda), es de relevancia clínica, ya que sugiere que en los accidentes con esta especie podría esperarse un cuadro clínico donde no predominen las alteraciones hemorrágicas como equimosis, petequias, gingivorragias, epistaxis o hematurias. En consecuencia este veneno no debería ser empleado como único representante de su especie para la producción de antivenenos en Venezuela, ya que no posee una carga antigénica que represente adecuadamente el potencial hemorrágico del género *Bothrops*, además estudios proteómicos recientes han reportado una escasa reactividad cruzada entre metaloproteasas de la clase PI y PIII [38]. Por otra parte, considerando que estudios previos han demostrado que las toxinas hemorrágicas están comprometidas en la rápida distribución de los componentes del veneno del área de inyección a la circulación sistémica [2], es factible que tras el envenenamiento por *B. colombiensis* (Paracotos. Edo. Miranda) los signos de intoxicación sistémica pudieran expresarse de forma menos severa en las primeras horas del accidente.

En el caso de la actividad desfibrinante se obtuvo una DDM de 3,5 µg de veneno (TABLA I). Al comparar con estudios previos (TABLA II) se observó un mayor potencial desfibrinante para el veneno de *B. colombiensis* (Paracotos) que en el veneno de especímenes de *B. atrox* (Pto. Ayacucho), *B. asper* (Costa Rica) y *B. pictus* (Perú) [5, 10, 33], así como una menor actividad desfibrinante al compararlo con el de especímenes de *B. atrox* del Ecuador y Perú [22, 37]. En el caso de la actividad coagulante, se obtuvo una DCM de 0,5 µg de veneno (TABLA I); sin embargo, no se pudo establecer comparaciones con los estudios previos presentados en la TABLA II por diferencias metodológicas. Estas dos actividades son responsables de las coagulopatías observadas en víctimas humanas, las cuales representan las manifestaciones clínicas más frecuentemente observadas en los accidentes con serpientes del género *Bothrops* [2, 31] y son la consecuencia de la acción conjunta de una variedad de enzimas que afectan el sistema de coagulación sanguínea y la agregación plaquetaria [20, 34], en el caso particular de *B. colombiensis* se ha reportado la presencia de enzimas con actividad tipo trombina, fibrinolítica, tipo factor Xa, activadores de protrombina, L-aminoácido oxidasa y 5' nucleotidasa [6, 12, 14, 27, 31].

En la determinación de la actividad mionecrosante evaluada por la medición de la enzima CK en suero, marcador de lesión que se encuentra en altas concentraciones en el citoplasma de las células musculares (cardíacas y esqueléticas) [9, 17], se observó a las 3 h. de exposición al veneno el incremento de los niveles de CK ($2225,53 \pm 433,63$ U/L), en magnitud equivalente a 4 veces lo obtenido para el grupo

control ($595,88 \pm 83,24$ U/L), lo cual evidencia el potencial necrosante del veneno evaluado. Al comparar estos resultados con los reportados en estudios previos (TABLA II), se notó que el veneno de *B. colombiensis* (Paracotos) tiene una menor actividad necrosante que venenos de *B. Brazili* y *B. pictus* del Perú [33]; un mayor potencial miotóxico que el de *B. neuwidii* (Bolivia) y *B. atrox* (Colombia y Perú) [22, 37] y un perfil miotóxico similar al de *B. barnetti* [33]. Esta actividad constituye una de las manifestaciones clínicas más frecuentes en los accidentes moderados y severos ocasionados por las serpientes de este género [18, 32], y es la consecuencia de la acción de enzimas PLA₂ presentes en los venenos y de la isquemia local que pueda desarrollarse en el músculo esquelético por la fuerte compresión de los tejidos a consecuencia del edema [16].

En la evaluación de la actividad edematizante se obtuvo una DEM de $0,62 \pm 0,04$ µg (TABLA I). Al comparar con los estudios previos presentados en la TABLA II, se observó que el veneno evaluado presentó una elevada actividad edematizante, superando incluso a venenos clasificados como muy edematizantes de *B. jararaca* y *B. jararacussu* con DEM de 0,85 y 1,5 µg, respectivamente [1]. Esta actividad es uno de los efectos más comunes de los venenos del género *Bothrops* y es considerada consecuencia principalmente de la acción de mediadores endógenos como kininas, prostaglandinas, histamina y serotonina liberados por proteasas y PLA₂ presentes en los venenos [1, 16, 32].

Esta elevada actividad edematizante observada para el veneno de *B. colombiensis* (Paracotos) es también de relevancia clínica, ya que sugiere que en los accidentes con esta especie podría esperarse un cuadro clínico que implique un marcado efecto edematizante, lo cual podría incrementar en las probabilidades de compromiso local en las víctimas ya que la isquemia local que pueda desarrollarse a consecuencia del edema es un factor contribuyente a la miotoxicidad de los venenos del género *Bothrops* [16, 18, 32].

La relevancia de los resultados obtenidos en la caracterización del veneno de *B. colombiensis* (Paracotos), aunado con la escasa neutralización *in vivo* de los efectos locales reportada usualmente para los antivenenos [6, 10, 23, 28, 38] y la limitada inmuno-reactividad observada, en la evaluación de antivenenos comerciales de Brasil, Costa Rica y Venezuela, mediante estudios proteómicos hacia diferentes constituyentes de los venenos como desintegrinas, metaloproteasas tipo PI y PLA₂ [6, 7, 38], sugieren la necesidad de evaluar el potencial neutralizante de los antivenenos disponibles en el país, tal como recomienda la Organización Mundial de la Salud [40]. Adicionalmente, las importantes variaciones observadas entre los perfiles toxinológicos del veneno evaluado y sus homólogos procedentes del Guapo y Caucahua, también del Edo. Miranda (TABLA II), resaltan la necesidad de caracterizar los venenos de importancia médica aún en regiones geográficas cercanas.

CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos evidenciaron para el veneno de *Bothrops colombiensis* (Paracotos) un perfil toxinológico caracterizado por una elevada actividad edematizante, escasa actividad hemorrágica y un importante efecto neurotóxico, además del potencial miotóxico y procoagulante, característicos de los venenos del género *Bothrops*, lo cual hace necesario reforzar el seguimiento clínico del paciente para la prevención de complicaciones, planificar estudios epidemiológicos en la región y evaluar el potencial neutralizante de la terapia antiofídica existente.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] ACOSTA, O.; KOSCINCZUC, P.; TEIBLER, P.; SÁNCHEZ, M.; RUIZ, R.; MARUÑAK, S.; BOGARIN, G. 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 (8): 1165- 1172. 1998.
- [2] ANAI, K.; SUGITI, M.; YOSHIDA, E.; MARUYAMA, M. Neutralization of a snake venom hemorrhagic metalloproteinase prevents coagulopathy after subcutaneous injection *Bothrops jararaca* of venom in rats. **Toxicon**. 40: 63-68. 2002.
- [3] ANTUNES, T.; YAMASHITA, K.; BÁRBARO, K.; SAIKI, M.; SANTORO, M. Comparative analysis of newborn and adult *Bothrops jararaca* snake venoms. **Toxicon**. 56 (8): 1443-58. 2010.
- [4] BOADAS, J.; MATOS, M.; BÓNOLI, S.; BORGES, A.; VÁSQUEZ-SUÁREZ, A.; SERRANO, L.; QUIJADA, N.; VILLALBA, R.; PÉREZ, Y.; CHADEE-BURGOS, R.; DE SOUSA, L. Perfil eco-epidemiológico de los accidentes por ofidios en Monagas, Venezuela (2002-2006). **Bol. Mal. Salud Amb.** 52 (1):107-120. 2012.
- [5] BOGARIN, G.; ROMERO, M.; ROJAS, G.; LUTSCH, C.; CASADEMONT, M.; LANG, R.; GUTIÉRREZ, J. Neutralization, by a monospecific *Bothrops lanceolatus* antivenom, of toxic activities induced by homologous and heterologous *Bothrops* snake venom. **Toxicon**. 37: 551-557. 1999.
- [6] CALVETE, J.; BORGES, A.; SEGURA, A.; FLORES, M.; ALAPE, A.; GUTIÉRREZ, J. M.; DIEZ, N.; DE SOUSA, L.; KIRIAKOS, D.; SÁNCHEZ, E.; FAKS, J.; ESCOLANO, J.; SANZ, L. Snake venomomics and antivenomic of *Bothrops colombiensis*, a medically important pitviper of the *Bothrops atrox-asper* complex endemic to Venezuela: contributing to its taxonomy and snakebite management. **J. Proteomics**. 72: 227-240. 2009.
- [7] CALVETE, J.; SANZ, L.; PÉREZ, A.; BORGES, A.; VARGAS, A.; LOMONTE, B.; ANGULO, Y.; GUTIÉRREZ, J.; CHALKIDIS, H.; MOURÃO, R.; FURTADO, F.; MOURADA-SILVA, A. Snake population venomomics and antivenomics of *Bothrops atrox*: Paedomorphism along its transamazonian dispersal and implications of geographic venom variability on snakebite management. **J. Proteomics**. 74 (4): 510-27. 2011.
- [8] DE SOUSA, L.; BASTOURI, J.; MATOS, M.; BORGES, A.; BÓNOLI, S.; VÁSQUEZ, A.; GUERRERO, B.; RODRÍGUEZ-ACOSTA, A. Epidemiología del ofidismo en Venezuela (1996-2004). **Invest. Clin.** 54(2): 123-137. 2013.
- [9] D'OTTAVIO, G.; PARODI, R.; MONTERO, M.; EGRI, N.; CARLSON, D.; GRECA, A. Creatinfosfoquinasa y su aplicación clínica. **Anuario Fundación Dr. J. R. Villavicencio**. 16: 156-159. 2008.
- [10] DUQUE, C.; FERNÁNDEZ, I.; VARGAS, A.; LÓPEZ, J.; SCANNONE, T. Caracterización toxinológica del veneno de *Bothrops atrox* de Puerto Ayacucho, Edo. Amazonas (Venezuela) y su neutralización por un antiveneno venezolano. **Rev. Científ. FCV-LUZ**. XXIV (4): 355-363. 2014.
- [11] FURUKAWA, Y.; HAYASLEI, K. Factor X converting and thrombin-like activities of *Bothrops jararaca* snake venom. **Toxicon**. 15: 107-114. 1977.
- [12] GABRIJELCIC, D.; DRUJAN, B.; GUBENSEK, F. Coagulant proteinase from *Bothrops colombiensis* venoms. **Toxicon**. 20 (1): 275-278. 1982.
- [13] GIRÓN, M.; RODRÍGUEZ-ACOSTA, A.; SALAZAR, A.; SÁNCHEZ, E.; GALÁN, J.; IBARRA, C.; GUERRERO, B. Isolation and characterization of two new non-hemorrhagic metalloproteinases with fibrinogenolytic activity from the mapanare (*Bothrops colombiensis*) venom. **Arch. Toxicol.** 87:197-208. 2013.
- [14] GIRÓN, M.; SALAZAR, A.; AGUILAR, I.; PEREZ, J.; SÁNCHEZ, E.; AROCHA, C.; RODRÍGUEZ-ACOSTA, A.; GUERRERO, B. Hemorrhagic, coagulant and fibrinogenolytic activities of crude venom and fractions from mapanare (*Bothrops colombiensis*) snakes. **Comp. Biochem. Phys.** Part C. 147: 113-121. 2008.
- [15] GUÉRCIO, R.; SHEVCHENKO, A.; SHEVCHENKO, A.; LÓPEZ-LOZANO, J.; PABA, J.; SOUSA, M.; RICART, C. Ontogenetic variations in the venom proteome of the Amazonian snake *Bothrops atrox*. **Proteome Sci.** 4 (11): 2006.
- [16] GUTIÉRREZ, J. Comprendiendo los venenos de serpientes: 50 años de investigaciones en América Latina. **Rev. Biol. Trop.** 50 (2): 377-394. 2002.
- [17] GUTIÉRREZ, J.; CHAVES, F.; BOLAÑOS, R.; CERDAS, L.; ROJAS, E.; ARROYO, O.; PORTILLA, E. Neutralización de los efectos locales del veneno de *Bothrops asper* por un antiveneno polivalente. **Toxicon**. 19: 493-500. 1981.

- [18] GUTIÉRREZ, J.M. Envenenamientos por mordeduras de serpientes en América Latina y el Caribe: una visión integral de carácter regional. **Bol. Mal. Salud Amb.** 51 (1): 1-16. 2011.
- [19] 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.
- [20] KINI, R. Toxins in thrombosis and haemostasis: potential beyond imagination. **J. Thrombos. Haemostas.** 9 (Suppl. 1): 195–208. 2011.
- [21] LAEMMLI, U. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature.** 227: 680-685. 1970.
- [22] LAINES, J.; SEGURA, A.; VILLALTA, M.; HERRERA, M.; VARGAS, M.; ALVAREZ, G.; GUTIERREZ, J.; LEON, G. Toxicity of *Bothrops* sp snake venoms from Ecuador and preclinical assessment of the neutralizing efficacy of a polyspecific antivenom from Costa Rica. **Toxicon.** 88: 34-37. 2014.
- [23] LEÓN, G.; SÁNCHEZ, L.; HERNÁNDEZ, A.; VILLALTA, M.; HERRERA, M.; SEGURA, A.; ESTRADA, R.; GUTIÉRREZ, J.M. Immune Response Towards Snake Venoms. **Inflammation & Allergy-Drug Targets.** 10(5): 1-18. 2011.
- [24] LÓPEZ, J.; VARGAS, A.; FERNÁNDEZ, I.; SCANNONE, H. Caracterización bioquímica y toxicológica de la fracción I de veneno de *Bothrops venezuelensis* (Tigra Mariposa). **Acta Científ. Venez.** 45 (Sup. 1): 124. 1994.
- [25] MARKLAND, F.; SWENSON, S. Snake venom metalloproteinases. **Toxicon.** 62: 3–18. 2013.
- [26] MUNIS, E.; WANY, M.; ESTEVAO-ACOSTA, M.; BUHRNHEIM, O.; CHÁVEZ, C. Neutralizing potency of horse antithrombotic Brazilian antivenom against *Bothrops* snake venom from the Amazonian rain forest. **Toxicon.** 38: 1859-1863. 2000.
- [27] NAHAS, L.; KAMIGUTI, A.; BARROS, A. Thrombin-like and factor X-activator components of *Bothrops* snake venoms. **Thrombos. Haemostas.** 41: 315-328. 1979.
- [28] NÚÑEZ, V.; CID, P.; SANZ, L.; DE LA TORRE, P.; ANGULO, Y.; LOMONTE, B.; GUTIÉRREZ, J. M.; CALVETE, J. Snake venomomics and antivenomics of *Bothrops atrox* venoms from Colombia and the Amazon regions of Brazil, Perú and Ecuador suggest the occurrence of geographic variation of venom phenotype by a trend towards paedomorphism. **J. Proteomics.** 73 (1): 57-78. 2009.
- [29] OTERO, R.; OSORIO, R.; VALDERRAMA, R.; GIRALDO, C. Efectos farmacológicos y enzimáticos de los venenos de serpientes de Antioquia y Choco (Colombia). **Toxicon.** 30 (5/6): 611-620. 1992.
- [30] PÉREZ, A.; RUCAVADO, A.; SANZ, L.; CALVETE, J.; GUTIÉRREZ, J.M. Isolation and characterization of a serine proteinase with thrombin-like activity from the venom of the snake *Bothrops asper*. **Braz. J. Med. Biol. Res.** 41: 12-17. 2008.
- [31] RODRÍGUEZ-ACOSTA, A.; SÁNCHEZ, E.; MÁRQUEZ, A.; CARVAJAL, Z.; SALAZAR, E.; GIRÓN, M.; ESTRELLA, A.; GÍL, A.; GUERRERO, B. Hemostatic properties of Venezuelan *Bothrops* snake venoms with special reference to *Bothrops isabellae* venom. **Toxicon.** 56 (6): 926-35. 2010.
- [32] RODRÍGUEZ-ACOSTA, A.; UZCÁTEGUI, W.; AZUAJE, R.; AGUILAR, I.; GIRÓN, M. Análisis clínico y epidemiológico de los accidentes por mordeduras de serpientes del género *Bothrops* en Venezuela. **Rev. Cub. Med. Trop.** 52(2):90-4. 2000.
- [33] ROJAS, E.; QUESADA, L.; ARCE, V.; LOMONTE, B.; ROJAS, G.; GUTIERREZ, J. Neutralization of four peruvian *Bothrops* sp. Snake venoms by polyvalent antivenoms produced in Perú and Costa Rica: preclinical assessment. **Act. Trop.** 93: 85-95. 2005.
- [34] SAJEVIC, T.; LEONARDI, A.; KRIZAJ, I. Haemostatically active proteins in snake venoms. **Toxicon.** 57 (5): 627-645. 2011.
- [35] SILDARRIAGA, M.; OTERO, R.; NÚÑEZ, V.; TORO, F.; DÍAZ, A.; GUTIÉRREZ, J. M. Ontogenetic variability of *Bothrops atrox* and *Bothrops asper* snake venoms from Colombia. **Toxicon.** 42: 405-411. 2003.
- [36] SCANNONE, H.; GRILLO, O. Physical, chemical and biological characteristics of the venom of *Bothrops colombiensis*. **Toxicon.** 17: 161. 1979.
- [37] SEGURA, A.; CASTILLO, M.; NÚÑEZ, V.; YARLEQUÉ, A.; GONÇALVES, L.; VILLALTA, M.; BONILLA, C.; HERRERA, M.; VARGAS, M.; FERNÁNDEZ, M.; YANO, M.; ARAÚJO, H.; BOLLER, M.; LEÓN, P.; TINTAYA, B.; SANO-MARTINS, I.; GÓMEZ, A.; FERNÁNDEZ, G.; GEOGHEGAN, P.; HIGASHI, H.; LEÓN, G.; GUTIÉRREZ, J. M. Preclinical assessment of the neutralizing capacity of antivenoms produced in six Latin American countries against medically relevant *Bothrops* snake venoms. **Toxicon.** 6: 980-989. 2010.
- [38] SOUSA, L.; NICOLAU, C.; PEIXOTO, P.; BERNARDONI, J.; OLIVEIRA, S.; PORTES, J.; MOURAO, R.; LIMA, I.; SANO-MARTINS, I.; CHALKIDIS, H.; VALENTE, R.; MOURA-DA-SILVA, A. Comparison of phylogeny, venom composition and neutralization by antivenom in diverse species of *Bothrops* complex. **Plos. Negl. Trop. Dis.** 7(9): e2442. 2013.

- [39] VARGAS, A.; SCANNONE, H.; FERNÁNDEZ, I.; FERNÁNDEZ, N. Estudio comparativo de los venenos de *Bothrops atrox* provenientes del Estado Bolívar (El Paují) y Estado Amazonas (Puerto Ayacucho). **Acta Cientif. Venez.** 47 (Sup.1): 111. 1996.
- [40] WORLD HEALTH ORGANIZATION. Guidelines for the production, control and regulation of antivenom immunoglobulins. 2010. WHO, Geneva. On line: www.who.int/bloodproducts/snakeantivenoms. 07/07/2014.
- [41] ZUMUNÉR, E.; DA CRUZ-HÖFLIN, M.; CORRADO, A.; HYSLOP, S.; RODRIGUES-SIMIONI, L. Comparison of the neurotoxic and myotoxic effects of Brazilian *Bothrops* venoms and their neutralization by comercial antivenom. **Toxicon.** 44: 259-271. 2004.