



Caracterización toxinológica, bioquímica e inmunológica del veneno de la serpiente *Bothrops venezuelensis* (Macizo del Turimiquire, estado Monagas, Venezuela)

Toxinological, biochemical and immunological characterization of *Bothrops venezuelensis* snake venom (Macizo del Turimiquire. Monagas state, Venezuela)

CARMEN T DUQUE ZERPA^{1, 2*}, MARÍA E PINEDA^{2**}, LUIS F NAVARRETE^{3, 4***}, ALBA M VARGAS^{2****}

Resumen

Bothrops venezuelensis Sandner-Montilla, 1952 es reconocida por la Organización Mundial de la Salud (OMS) como una de las serpientes de mayor importancia médica en Suramérica. En Venezuela, a pesar de que esta se considera una especie agresiva y que se distribuye en zonas densamente pobladas, sus venenos han sido escasamente estudiados desconociéndose su potencial toxinológico e inmunológico incluso en áreas geográficas de alta endémicidad como el estado Monagas. Este estudio caracterizó bioquímica, toxinológica e inmunológicamente el veneno de *B. venezuelensis* del estado Monagas, evaluando su perfil electroforético, sus actividades letal, hemorrágica, hemolítica indirecta, coagulante, fibrino(geno)lítica y proteolítica sobre caseína, el éster etílico de N-alfa-benzoil-L-arginina (BAEE) y gelatina, además de su inmuno-neutralización por un antiveneno venezolano. Los resultados evidenciaron el perfil toxinológico característico del género *Bothrops*, sin embargo, al comparar con estudios previos resaltan un elevado potencial letal, hemorrágico y hemolítico indirecto, así como importantes variaciones inter e intraespecie de interés clínico. El "Western blot" mostró el reconocimiento parcial de las bandas proteicas más abundantes del veneno (~20-28 y ~41-47 kDa) y un muy débil reconocimiento de bandas de ~30,9-33,3 kDa, sugiriendo limitaciones del antiveneno venezolano para el reconocimiento de grupos con posibles actividades hemorrágica, coagulante y/o fosfolipasas A₂, lo cual implica la necesidad de evaluar el potencial neutralizante de este antiveneno contra las principales actividades inducidas por este veneno y comprobar la efectividad real de este producto terapéutico.

Palabras clave: *Bothrops venezuelensis*, tigre mariposa, estado Monagas, caracterización toxinológica, antiveneno

Abstract

Bothrops venezuelensis Sandner-Montilla, 1952 is recognized by the World Health Organization as one of the snakes of high medical importance in South America. In Venezuela, even though it is considered an aggressive species and that is distributed in densely populated areas, its venoms have been poorly studied. In addition, its toxinological potential is unknown even in geographical areas of high endemicity like the Monagas state, as well as its recognition by the antivenom Venezuelan. This study biochemically, toxinologically, and immunologically characterized the venom of *B. venezuelensis* from Monagas state, evaluating its electrophoretic profile, its lethal, hemorrhagic, indirect hemolytic, coagulant, fibrino(geno)lytic and proteolytic activities on casein, BAEE, and gelatin, in addition to its immuno-neutralization by the Venezuelan antivenom. The results evidenced the characteristic toxinological profile of the *Bothrops* genus, however, when compared with previous studies, they highlight a high lethal, hemorrhagic, and indirect hemolytic potential, as well as important inter and intraspecies variations of clinical interest. The western blot showed the partial recognition of the most abundant protein bands of the venom (~20-28 and ~41-47 kDa) and the very weak recognition of bands of ~30.9-33.3 kDa, suggesting limitations of the Venezuelan antivenom for the recognition of groups with possible hemorrhagic, coagulant and/or phospholipase A₂ activities, which implies the need to evaluate the neutralizing potential of the Venezuelan antivenom against the main activities induced by this venom and verify the real effectiveness of this therapeutic product.

Keywords: *Bothrops venezuelensis*, tigre mariposa, Monagas state, toxinological characterization, antivenom

1. Servicio de Análisis Toxicológico (SATOX), Facultad de Farmacia, Universidad Central de Venezuela. 2. Unidad de Biotecnología, Facultad de Farmacia, Universidad Central de Venezuela. 3. Serpentario, Instituto de Medicina Tropical, Universidad Central de Venezuela. 4. Colección de Herpetología, Fundación Museo de Ciencia, Fundación Museos Nacionales. Correspondencia: ctduque@gmail.com

Orcid: [0000-0003-0873-2962*](https://orcid.org/0000-0003-0873-2962)

Orcid: [0000-0002-9363-6993**](https://orcid.org/0000-0002-9363-6993)

Orcid: [0000-0001-5014-6495***](https://orcid.org/0000-0001-5014-6495)

Orcid: [0000-0001-8953-3644****](https://orcid.org/0000-0001-8953-3644)

DOI: [10.54305/RFFUCV.2022.85.1-2.7](https://doi.org/10.54305/RFFUCV.2022.85.1-2.7)

Disponible: http://saber.ucv.ve/ojs/index.php/rev_ff

Recepción: 20/04/2022

Aprobación: 18/05/2022

Rev. Fac. Farmacia 85(1y2): 67-79. 2022

Introducción

Bothrops venezuelensis es reconocida por la OMS como una de las serpientes de mayor importancia médica en Suramérica, (WHO, 2017) donde se restringe a Colombia y Venezuela (Mendoza y col., 2012). En Venezuela esta especie conocida popularmente como tигра mariposa, exhibe una amplia distribución geográfica circunscrita a sistemas orográficos al norte del río Orinoco, extendiéndose desde el oriente a través de las costas venezolanas a las regiones andinas en el occidente del país (Mendoza y col., 2012; Rengifo y col., 2019) y es considerada una de las principales responsables por los accidentes ofídicos reportados al Ministerio de Salud.

Los envenenamientos inducidos por las serpientes de este género implican un cuadro clínico que puede incluir edema, hemorragia, coagulopatías y mionecrosis (Rengifo y col., 2019), consecuencia de la presencia en sus venenos de enzimas hidrolíticas como fosfolipasas A₂ (PLA₂), hialuronidasas, serino proteasas y metaloproteasas, entre otras (Núñez y col., 2009; Calvete y col., 2011). Sin embargo, desde hace más de 50 años se conoce que existe una importante variabilidad bioquímica inter e intraespecie en la composición de sus venenos, según la localización geográfica y sus características ontogénicas (Sousa y col., 2013) lo cual hace necesario la caracterización de estos venenos, aspecto de relevancia clínica, farmacológica y biotecnológica (WHO, 2017). A pesar de estas consideraciones, los estudios de esta especie se han restringido a la caracterización del veneno de ejemplares procedentes del tramo central de la Cordillera de la Costa (Distrito Capital y los estados Aragua y Miranda) (López y col., 1999; Sánchez y col., 2014;

Girón y col., 2018), desconociéndose su toxicidad, su variabilidad bioquímica, así como la efectividad del antiveneno venezolano en la mayoría de los estados de distribución de esta especie, incluyendo áreas geográficas de alta endemicidad como el estado Monagas (De Sousa y col., 2013). Tomando esto en consideración, este estudio caracterizó toxinológica, bioquímica e inmunológicamente el veneno de la serpiente *B. venezuelensis* del Macizo del Turimiquire del estado Monagas.

Materiales y Métodos

VENENO

Se utilizó una mezcla de veneno cristalizado obtenido, por el ordeño manual, de cinco individuos adultos de *B. venezuelensis* procedentes del Macizo del Turimiquire en el estado Monagas. El veneno se mantuvo a 4 °C en un desecador al vacío, con CaCl₂ como agente desecante, hasta su evaluación.

ANTIVENENO

Se empleó el antiveneno polivalente producido en la Universidad Central de Venezuela (Biotecfar C. A, Caracas, Venezuela) (Lote 171). Este tiene presentación líquida y está constituido por fragmentos F(ab')₂ de inmunoglobulinas equinas, obtenidas con venenos de los géneros *Bothrops*, *Porthidium* y *Crotalus*. Según el fabricante este producto neutraliza al menos 2 mg de veneno de *B. colombiensis* y 1,5 mg de veneno de *C. durissus cumanensis* por mililitro.

ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN

Se emplearon ratones blancos cepa BALB-c sin distinción de sexo, con un peso

entre 18-20 g, procedentes del Bioterio del Instituto de Biomedicina, Facultad de Medicina, Universidad Central de Venezuela.

PERFIL ELECTROFORÉTICO

El perfil electroforético del veneno, en presencia (4:1) y ausencia de una mezcla comercial de inhibidores de proteasas (Sigma® Cat. P-2714), se realizó en geles de poliacrilamida (12,5%) bajo condiciones disociantes de acuerdo con el método de Laemmli (1970).

ACTIVIDAD LETAL

Se determinó la dosis letal media (DL_{50}) del veneno por la vía intraperitoneal de acuerdo con el método de Spearman-Kärber (WHO, 2017).

DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD HEMORRÁGICA

Se evaluó por la inyección intradérmica de dosis seriadas del veneno en ratones, empleando la metodología recomendada por la OMS (WHO, 2017). Los resultados se expresaron como dosis hemorrágica mínima (DHM), definida como la cantidad de veneno que induce un área hemorrágica de 10 mm de diámetro

DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD HEMOLÍTICA INDIRECTA

Se evaluó en placas agar-sangre-yema de huevo. Los resultados se expresaron como dosis hemolítica indirecta mínima (DHIM), cantidad de veneno que induce un halo hemolítico de 20 mm de diámetro (WHO, 2017).

DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD COAGULANTE

Se evaluó empleando plasma humano citratado (9:1) como sustrato. Los resultados se expresaron como dosis

coagulante mínima (DCM), definida como la menor cantidad de veneno que induce la coagulación del plasma en 1 min (WHO, 2017).

DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD FIBRINOGENOLÍTICA

Se evaluó por la observación en SDS-PAGE (12,5 %) del efecto del veneno, por un lapso de 30 min, sobre las cadenas del fibrinógeno de acuerdo con el método de Gay y col. (2005).

DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD FIBRINOLÍTICA

Se evaluó por el método de placas de fibrina de Marsh y Arocha-Piñango (1972). Los resultados se expresaron como actividad fibrinolítica, definida como el área de lisis inducida por microgramo de veneno ($mm^2/\mu g$).

DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ESTERÁSICA

Se empleó el método cinético propuesto por Tu y col. (1965) empleando el sustrato BAEE. Los resultados se expresaron como actividad específica (U/mg), definida como los micromoles de sustrato hidrolizados en un minuto por 1 mg de veneno.

DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD PROTEOLÍTICA SOBRE GELATINA

Se evaluó empleando zimografía en gel de acuerdo con el método de Terra y col. (2009). Adicionalmente, para evaluar el compromiso específico de serino y/o metaloproteasas en el veneno, previo a la zimografía se incubaron dosis independientes del veneno ($6 \mu g$), en baño María a $37^\circ C$ durante 30 min, con 12 mM PMSF (fenil-metil-sulfonil fluoruro) y 20 mM EDTA- Na_2 (etilen di-amino-tetra acetato de sodio).

DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD PROTEOLÍTICA SOBRE CASEÍNA

Se evaluó por la observación en SDS-PAGE (12,5 %) del efecto del veneno, durante 30 min, sobre las cadenas de la caseína según el método de Gay y col. (2005).

REACTIVIDAD INMUNOLÓGICA (WESTERN BLOT)

El Wester blot se realizó a partir de la separación de las proteínas en 40 g del veneno en una SDS-PAGE al 12,5 % empleando el método de Terra y col. (2009).

Análisis estadístico

Los resultados para las actividades letal, hemorrágica, coagulante, hemolítica indirecta, fibrinolítica y esterásica se expresaron como la media aritmética \pm desviación estándar de tres evaluaciones independientes, empleando estadística descriptiva a un intervalo de confianza del 95 % ($P < 0,05$).

Resultados

PERFIL ELECTROFORÉTICO

El perfil electroforético del veneno de *B. venezuelensis* en presencia de inhibidores de proteasas evidenció la presencia de bandas proteicas en el rango de 6-200 kDa. Estas se distribuyeron en tres grupos \sim 20-33; 41-49 y $>$ 69 kDa (Figura 1), con una predominancia de bandas entre los \sim 20-28 y \sim 41-47 kDa. Al comparar este perfil con el obtenido en ausencia de inhibidores de proteasas, se observó en este último la desaparición de las bandas en los rangos \sim 20-33; 41-50 y los 69-177 kDa (Figura 1).

ACTIVIDAD LETAL

Se obtuvo una DL_{50} de $3,51 \pm 0,91$ mg/kg ($n = 3$) (Tabla I).

DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD HEMORRÁGICA

El veneno indujo actividad hemorrágica en piel de ratón, con una DHM de $0,97 \pm 0,18$ μ g ($n = 3$) (Tabla I).

DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD HEMOLÍTICA INDIRECTA

El veneno indujo hemólisis indirecta, con una DHIM de $0,66 \pm 0,24$ μ g ($n = 3$) (Tabla I).

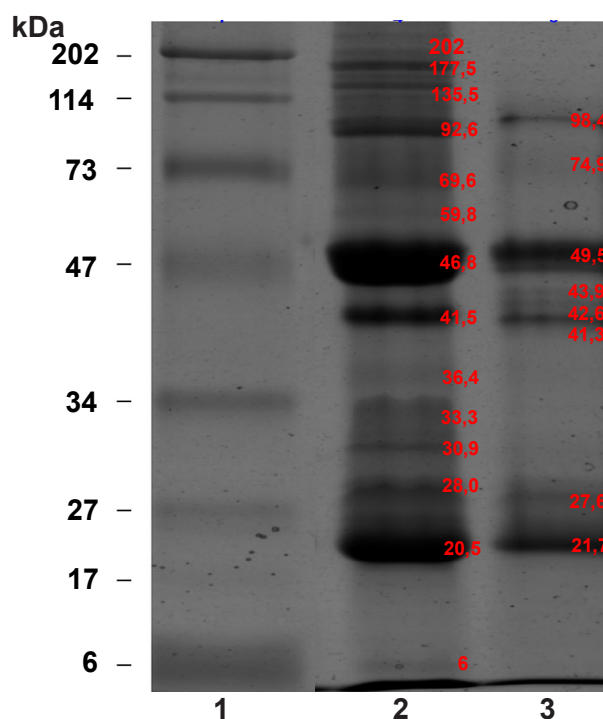


Figura 1. Perfil electroforético del veneno de la serpiente *Bothrops venezuelensis* (Macizo del Turimiquire. Estado Monagas). 30 μ g del veneno en ausencia o en presencia de una mezcla de inhibidores de proteasas (4:1) (Sigma® Cat. P-2714), se evaluó en geles poliacrilamida (12,5 %) con SDS. Carril 1: Marcadores de masa molecular (BIO-RAD®. Cat. 161-0318). Carril 2: veneno con inhibidores. Carril 3: veneno sin inhibidores. Tinción: azul de coomasie R 250. La evaluación se realizó por duplicado

Tabla I. Comparación de las actividades letal, hemorrágica, coagulante y hemolítica indirecta del veneno de *B. venezuelensis* (Macizo del Turimiquire. Edo. Monagas) con reportes previos para este género en Venezuela

Especie (Procedencia)	DL ₅₀ (mg/kg)	DHM (µg/ratón)	DCM (g)	DHIM (µg)	Referencia
<i>B. atrox.</i> (Semania del Cuao. Edo. Amazonas)	8,3	4,2 ± 0,5	NE	NE	Salazar y col., 2007
<i>B. atrox.</i> (Parguasa Edo. Bolívar)	4,0	2,7 ± 0,4	NE	NE	Salazar y col., 2007
<i>B. atrox.</i> (Pto. Ayacucho. Edo. Amazonas)	3,07 ± 0,52	5,28 ± 0,37	7,66 ± 0,48	2,75 ± 0,36	Duque y col., 2014.
<i>B. colombiensis.</i> (El Guapo. Edo. Miranda)	11,6	5,3	NE	NE	Girón y col., 2008
<i>B. colombiensis</i> (Caucagua. Edo. Miranda)	5,8	11,6	NE	NE	Girón y col., 2008
<i>B. colombiensis</i> (Paracotos. Edo. Miranda)	4,92 ± 0,16	34,6 ± 6,25	< 1	NE	Duque y Vargas, 2015
<i>B. isabellae</i> (Edo. Trujillo)	5,9	11,5 ± 1,20	OM	NE	Rodríguez-Acosta y col., 2010
<i>B. venezuelensis.</i> (Región Central. Cordillera de la Costa)	6,39	OM	OM	NE	Sánchez y col., 2014
<i>B. venezuelensis.</i> (Edo. Aragua)	14	21,4 ± 0,84	0,6 ± 0,06	NE	Girón y col., 2018
<i>B. venezuelensis</i> (Baruta. Edo. Miranda)	8,3	1,2 ± 0,34	2,1 ± 0,39	NE	Girón y col., 2018
<i>B. venezuelensis</i> (La Boyera. Edo. Miranda)	4,4	1,4 ± 0,40	4,8 ± 0,47	NE	Girón y col., 2018
<i>B. venezuelensis</i> (Lagunetica. Edo. Miranda)	16,2	1,2 ± 0,45	1,9 ± 0,57	NE	Girón y col., 2018
<i>B. venezuelensis</i> *	3,51 ± 0,91	0,97 ± 0,18	7,83 ± 0,45	0,66 ± 0,24	Este estudio

DL₅₀: dosis letal cincuenta. DHM: dosis hemorrágica mínima. DCM: dosis coagulante mínima. DHIM: dosis hemolítica indirecta mínima. NE: no evaluado. OM: otra metodología. *Los resultados representan la media ± desviación estándar (n= 3, P<0,05).

DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD COAGULANTE

El veneno evaluado indujo la coagulación directa del plasma humano, con una DCM de $7,83 \pm 0,45 \mu\text{g}$ (n= 3) (Tabla I).

DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD FIBRINOGENOLÍTICA

El veneno de *B. venezuelensis* degradó parcialmente el fibrinógeno, glicoproteína dimérica conformada por tres cadenas polipeptídica: alfa (α), beta (β) y gamma (γ). Esta actividad fue selectiva sobre la

cadena α , se inició con $0,03 \mu\text{g}$ de veneno, mientras que la degradación fue completa con concentraciones $\geq 0,5 \mu\text{g}$ (Figura 2).

DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD FIBRINOLÍTICA

El veneno evaluado indujo la degradación directa del gel de la fibrina, con una actividad de $19,47 \pm 3,75 \text{ mm}^2/\mu\text{g}$ (n= 3) (Tabla II).

DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ESTERÁSICA

El veneno en estudio indujo la degradación del BAEE, con una actividad específica de $158,87 \pm 18,65 \text{ U/mg}$ (n= 3) (Tabla I).

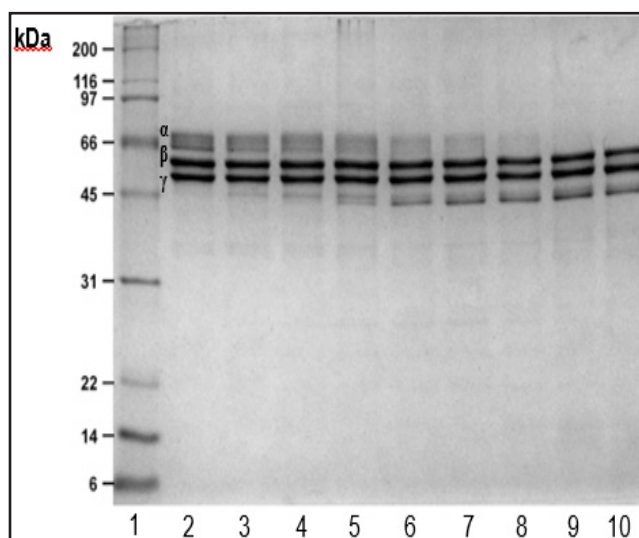


Figura 2. Actividad fibrinogenolítica del veneno de *Bothrops venezuelensis* (Macizo del Turimiquire, Estado Monagas). carril 1: marcador de masa molecular (BIO-RAD®, cat. 161-0317), carril 2: 100 µg de fibrinógeno, carriles 3 al 10: fibrinógeno (100 µg) vs. concentraciones seriadas de veneno (3: 0,0078 µg, 4: 0,0156 µg, 5: 0,03 µg, 6: 0,06 µg, 7: 0,125 µg, 8: 0,25 µg, 9: 0,5 µg, 10: 1 µg), tinción: Azul de Coomassie R-250. la evaluación se realizó por duplicado

DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD PROTEOLÍTICA SOBRE GELATINA

Las proteínas en el veneno evaluado indujeron el desarrollo de bandas de degradación en el gel entre los ~43-180 kDa (Figura 3).

DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD PROTEOLÍTICA SOBRE CASEÍNA

En el caso de la actividad proteolítica sobre caseína, glicoproteína dimérica conformada por tres cadenas polipeptídicas alfa (α), beta (β) y kappa (κ), el veneno evaluado degradó la cadena β a bajas concentraciones (0,16 µg), mientras que en el caso de las cadenas α y κ la degradación se inició con 0,31 µg y fue total con 2,5 µg del veneno (Figura 4).

REACTIVIDAD INMUNOLÓGICA (WESTERN BLOT)

La transferencia de las bandas proteicas del veneno, desde el gel de poliacrilamida a la membrana de nitrocelulosa se confirmó con la tinción de rojo Ponceau (Figura 5A). Completado el Western blot se observó una reactividad intensa para las proteínas de alta masa molecular (> 60 kDa), el reconocimiento parcial de ciertas proteínas con una masa entre los ~20-28 y 41-47 kDa y el muy débil reconocimiento de grupos entre los 30,9-33,3 kDa (Figura 5B).

Discusión

El perfil electroforético del veneno de *B. venezuelensis* en presencia de inhibidores de proteasas evidenció la presencia de bandas distribuidas entre los ~6-200 kDa (Figura 1).

Esto sugiere la presencia en el veneno de constituyentes tipo fosfodiesterasas (94-140 kDa), L aminoácido oxidasas (85-150 kDa), hialuronidasas (~73 kDa), serino proteasas (27-64 kDa), PLA₂ (13-18 kDa) y las diferentes clases de metaloproteasas: PI (20-30 kDa), PII (30-60 kDa) y PIII (60-100 kDa), entre otras (Núñez y col., 2009; Calvete y col., 2011), con predominancia de serino y/o metaloproteasas de las clases PI y PII (Figura 1).

Por otra parte, la degradación de proteínas observada al comparar los perfiles electroforéticos en presencia y ausencia de los inhibidores de proteasas, evidencia la elevada actividad autocatalítica de las proteasas presentes en el veneno evaluado la cual, de acuerdo a la masa molecular de las

Tabla II. Comparación de las actividades letal, hemorrágica, coagulante y hemolítica indirecta del veneno de *B. venezuelensis* (Macizo del Turimiquire. Edo. Monagas) con reportes previos para este género en Venezuela

Especie (Procedencia)	Actividad fibrinolítica (mm ² /g)	Referencia
<i>B. atrox.</i> (Serranía del Cuao. Edo. Amazonas)	5,1 ± 0,70	Salazar y col., 2007
<i>B. atrox.</i> (Parguasa. Edo. Bolívar)	10 ± 1,10	Salazar y col., 2007
<i>B. atrox.</i> (Pto. Ayacucho. Edo. Amazonas)	NE	Duque y col., 2014
<i>B. colombiensis.</i> (El Guapo. Edo. Miranda)	14 ± 2,10	Girón y col., 2008
<i>B. colombiensis</i> (Caucagua. Edo. Miranda)	29 ± 3,10	Girón y col., 2008
<i>B. colombiensis</i> (Paracotos. Edo. Miranda)	NE	Duque y Vargas, 2015
<i>B. Isabelae</i> (Edo. Trujillo)	50 ± 3,90	Rodríguez-Acosta y col., 2010
<i>B. venezuelensis.</i> (Región Central. Cordillera de la Costa)	OM	Sánchez y col., 2014
<i>B. venezuelensis.</i> (Edo. Aragua)	7,3 ± 3,4	Girón y col., 2018
<i>B. venezuelensis</i> (Baruta. Edo. Miranda)	30,1 ± 8,9	Girón y col., 2018
<i>B. venezuelensis</i> (La Boyera. Edo. Miranda)	9,5 ± 4,9	Girón y col., 2018
<i>B. venezuelensis</i> (Lagunetica. Edo. Miranda)	33,7 ± 1,84	Girón y col., 2018
<i>B. venezuelensis*</i>	19,47 ± 3,75	Este estudio

NE: no evaluado. OM: otra metodología. *Los resultados representan la media ± desviación estándar (n= 3, P<0,05)

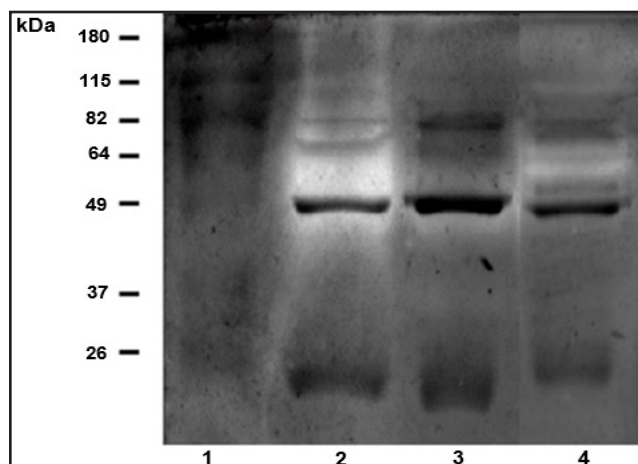


Figura 3. Actividad proteolítica sobre gelatina del veneno de *Bothrops venezuelensis* (Macizo del Turimiquire. Estado Monagas) y modulación de la actividad en presencia de inhibidores de proteasas. Carril 1: Marcador de masa molecular (Invitrogen® Cat. 10748-010). Carril 2: 6 µg veneno de *B. venezuelensis*. Carril 3: 6 µg veneno de *B. colombiensis* vs. 20 mM EDTA-Na₂. Carril 4: 6 µg veneno de *B. colombiensis* vs. 12 mM PMSF. Tinción: azul de coomasie R-250. La evaluación se realizó por duplicado.

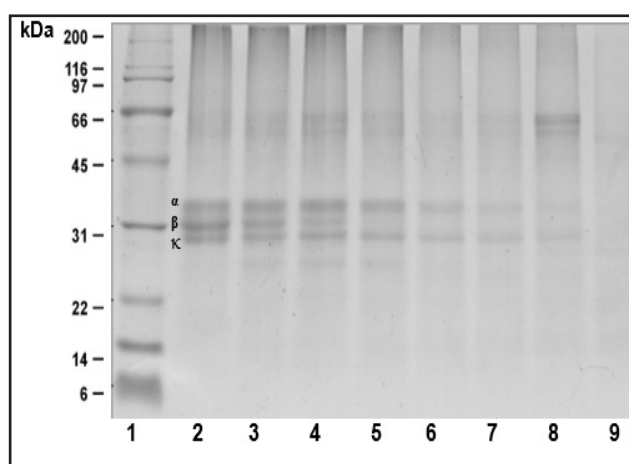


Figura 4. Actividad proteolítica del veneno de *Bothrops venezuelensis* (Macizo del Turimiquire. Estado Monagas) sobre caseína. Carril: 1. Marcador de masa molecular (BIO-RAD®. Cat. 161-0317). Carril 2: 100 µg caseína. Carriles 3-9: caseína (100 µg) vs. concentraciones seriadas del veneno (3: 0,04 µg. 4: 0,08 µg. 5: 0,16 µg. 6: 0,31 µg. 7: 0,63 µg. 8: 1,25 µg. 9: 2,5 µg). Tinción: azul de coomasie R-250. La evaluación se realizó por duplicado.

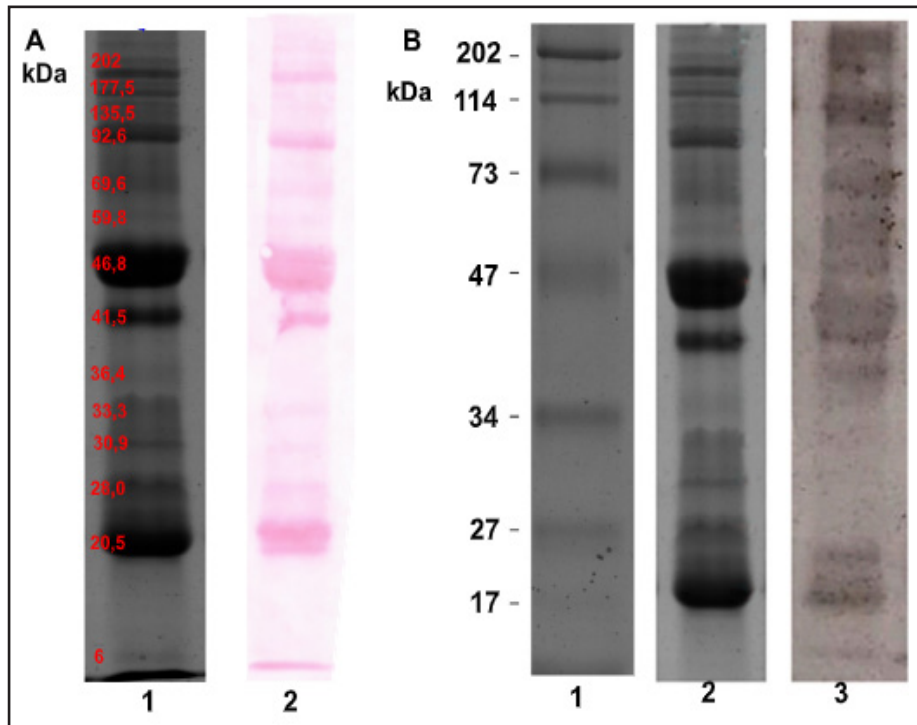


Figura 5. Inmuno-reconocimiento del veneno de *Bothrops venezuelensis* (Macizo del Turimiquire, estado Monagas) por un antiveneno comercial venezolano. A. Evaluación de la transferencia de proteínas. 1: Electroforesis del veneno/inhibidores de proteasas (Sigma® Cat. P-2714) (4:1). 2: Membrana de nitrocelulosa post transferencia teñida con rojo Ponceau. B. Western-blot. 1: Marcadores de masa molecular (BIO-RAD®. Cat.161-0318). 2: Electroforesis del veneno/inhibidores de proteasas (Sigma® Cat. P-2714) (4:1). 3: Bandas de inmuno-precipitación veneno-antiveneno. 40 µg veneno/antiveneno polivalente venezolano Lote 171 (1/250). Anticuerpo secundario: anti IgG de caballo (1/1000) (Santa Cruz Biotechnology Lote A0711). Revelado: 4-cloro- α -naftol/di amino benzamida (DBA). La evaluación fue realizada por duplicado.

bandas degradadas, podría estar asociada principalmente a la catálisis de PLA₂, serino y/o metaloproteasas (PI, PII y/o PIII). La expresión de esta actividad autocatalítica, bajo las condiciones de disolución de la electroforesis convencional ha sido reportada con otros venenos de este género como *B. colombiensis* (Duque y Vargas, 2015) e implica la necesidad de incluir en estas determinaciones los inhibidores de proteasas, de manera de poder realizar estimaciones y comparaciones adecuadas del contenido proteico de los mismos.

La caracterización del veneno de *B. venezuelensis* evidenció el desarrollo de actividades: letal, hemorrágica, hemolítica indirecta y coagulante, lo cual coincide con

el perfil característico de los venenos del género *Bothrops* en Venezuela (Salazar y col., 2007; Girón y col., 2008; Duque y col., 2014; Sánchez y col., 2014; Duque y Vargas, 2015; Girón y col., 2018), aunque al comparar con estudios previos para este género resaltan importantes variaciones cuantitativas (Tabla I).

En el caso de la actividad letal el veneno objeto de este estudio exhibió uno de los mayores índices de letalidad, en comparación con los venenos de *B. atrox* del estado Amazonas (Serranía del Cuao) (Salazar y col., 2007), *B. isabellae* del estado Trujillo (Rodríguez-Acosta y col., 2010), *B. colombiensis* del estado Miranda (El Guapo y Caucagua) e incluso al comparar con la

mayoría de sus homólogos listados en la Tabla I (Girón y col., 2008; 2018).

En la evaluación de la actividad hemorrágica, la DHM estimada para el veneno evaluado es notablemente inferior a la reportada para otras especies de importancia médica en Venezuela como *B. atrox* (Girón y col., 2008; Rodríguez-Acosta y col., 2010; Duque y col., 2014), *B. colombiensis* (Girón y col., 2008; Duque y Vargas, 2015) y adicionalmente pudiera considerarse análoga solo a la reportada para venenos homólogos del estado Miranda (Girón y col., 2018) (Tabla I). Esta elevada actividad hemorrágica, sugiere una importante concentración de enzimas tipo metaloproteasas en el veneno evaluado, grupos capaces de inducir la disrupción enzimática de los constituyentes de la membrana basal y de la matriz extracelular que rodea las células endoteliales de los capilares y las vénulas y que adicionalmente se han relacionado a la rápida extensión de los componentes del veneno del área de inyección a la circulación sistémica, aspecto que adquiere un rol clave en la patogénesis de las complicaciones locales y sistémicas resultantes de estos envenenamientos (Anai y col., 2002) y podría implicar que tras el envenenamiento con la especie estudiada los signos de intoxicación sistémica pudieran expresarse rápidamente y de forma más severa durante las primeras horas del envenenamiento en comparación con otros venenos de este género en Venezuela.

En el caso de la actividad hemolítica indirecta, al comparar con estudios previos, se puede referir que esta es una de las actividades menos estudiadas en los venenos venezolanos, a pesar de ser un indicador de enzimas tipo PLA₂ calcio dependientes. Adicionalmente al comparar

la DHM obtenida para el veneno de *B. venezuelensis*, con los estudios en la Tabla I, se puede referir que esta es aproximadamente cuatro veces menor a la reportada para el veneno de *B. atrox* (Pto. Ayacucho, estado Amazonas) (Duque y col., 2014), el cual de acuerdo con sus autores es al menos cinco veces más hemolítico que el de algunos homólogos de Colombia y Brasil. Esto sugiere la presencia de una elevada concentración de enzimas tipo PLA₂ en el veneno evaluado y permite referir que el accidente causado por especímenes de *B. venezuelensis* (Serranía del Turimiquire, estado Monagas) podría involucrar una importante actividad miotóxica (local y/o sistémica), así como un relevante efecto edematizante, los cuales se debe esperar sean potenciados por la elevada actividad hemorrágica del veneno, efectos que en conjunto podrían incrementar el riesgo de compromiso local en las víctimas.

En cuanto a la actividad coagulante del veneno en estudio, esta es notablemente inferior a la reportada en evaluaciones previas con venenos homólogos (Tabla I) (Girón y col., 2008). Sin embargo, no se debe subestimar esta menor actividad ya que esta es similar a la descrita para otras especies del género *Bothrops*, como *B. atrox* (Tabla I) (Duque y col., 2014) y sugiere la presencia en el veneno evaluado de activadores del factor X y/o protrombina (Girón y col., 2008; Sousa y col., 2018).

Adicionalmente el veneno evaluado indujo la degradación directa del fibrinógeno y la fibrina. En el caso de la actividad fibrinogenolítica al comparar con estudios previos realizados con venenos de homólogos del estado Miranda (Girón y col., 2018) o *B. Isabelae* (Rodríguez-Acosta y col., 2010) se puede referir un patrón de degradación similar, caracterizado

por su efecto selectivo sobre la cadena α del fibrinógeno. En cuanto a la actividad fibrinolítica se puede referir un elevado potencial fibrinolítico para el veneno objeto de este estudio en comparación con lo reportado en evaluaciones con venenos de *B. atrox* (Amazonas y Bolívar) (Salazar y col., 2007), *B. colombiensis* (El Guapo, estado Miranda) e incluso venenos homólogos de los estados Miranda (La Boyera) y Aragua (Tabla II) (Girón y col., 2018).

La mayoría de las enzimas responsables por estas actividades han sido clasificadas como α , β o γ fibrinógenasas, según la cadena del fibrinógeno/fibrina sobre la cual actúen más rápidamente e incluyen enzimas tipo: 1) Metaloproteasas dependientes de zinc, capaces de hidrolizar rápidamente la cadena $A\alpha$ del fibrinógeno (Gay y col., 2005), 2) serino proteasas, que incluyen enzimas tipo trombina (degradan las cadenas α y/o β) y las 3) fibrino(gen)olíticas, para las que se ha descrito usualmente actividad tipo β -fibrinogenasa (León y col., 2011). En el caso particular de *B. venezuelensis* no se han identificado las enzimas responsables por las actividades fibrino(gen)olítica, sin embargo, estudios previos empleando inhibidores de serino proteasas refieren que estas actividades son dependientes de enzimas tipo metaloproteasas (Girón y col., 2018).

Por otra parte, el veneno en estudio mostró actividad sobre BAEE, gelatina y caseína. En cuanto a la degradación del BAEE, este efecto se ha reportado en estudios previos con venenos homólogos (López y col., 1999; Girón y col., 2018), sin embargo, la magnitud determinada en el veneno objeto de este estudio es 1,32 veces menor a la reportada por López y col. (1999) y 4,21 veces menor a lo reportado por Girón y col. (2018). Adicionalmente se

puede referir que las enzimas responsables por este efecto corresponden a serino proteasas con actividad hemostática, asociada principalmente a activadores del factor V, fibrinogenolítica, fibrinolítica y/o liberadores de quinina, entre otros (Tu y col., 1965). Todo esto, permite sugerir que existe una importante variabilidad bioquímica en la constitución de serino proteasas en venenos *B. venezuelensis* y adicionalmente el resultado obtenido coincide con la menor actividad coagulante del veneno evaluado en comparación con sus homólogos (Tabla I) (Girón y col., 2018).

En el caso de la actividad proteolítica sobre gelatina, los resultados obtenidos sugieren que esta actividad está asociada a metaloproteasas tipo PII y PIII, además de serino proteasas. Esta actividad ha sido reportada en estudios previos con otras especies de este género en Venezuela, entre estos *B. isabellae* o *B. colombiensis*, para los que se ha reportado que es un efecto asociado a metaloproteasas (Rodríguez-Acosta y col., 2010; Sánchez y col., 2014), mientras que otros estudios con especímenes de *B. venezuelensis*, del centro de la Cordillera de la Costa, reportaron la ausencia de actividad gelatinasa en el lote de veneno empleado y sus fracciones (Sánchez y col., 2014).

En el caso de la actividad proteolítica sobre caseína, la degradación total de las tres cadenas del sustrato, coinciden con reportes previos para venenos *B. venezuelensis* de los estados Aragua y Miranda (Lagunética) (Girón y col., 2018), sin embargo para estos los autores evidenciaron dos patrones de degradación diferentes al observado en este estudio, lo cual sugiere variaciones cuali y/o cuantitativas en los grupos enzimáticos responsables por este efecto (metalo y serino proteasas) (Gay y col., 2005).

En la evaluación de la reactividad inmunológica entre el veneno de *B. venezuelensis* y el antiveneno venezolano, el Western blot mostró la presencia en el antiveneno de anticuerpos capaces de reconocer principalmente antígenos de alta masa molecular (> 60 kDa) como L-aminoácido oxidasas y algunos grupos de serino y metaloproteasas de la clase PIII, entre otros. Además, sugiere una débil a nula presencia de anticuerpos capaces de reconocer proteínas como PLA₂, serino proteasas de baja masa molecular y/o metaloproteasas de las clases PI y PII. Estos resultados coinciden con observaciones realizadas en estudios previos con venenos del género *Bothrops*, para los cuales empleando Western blot y antivenómica se reportó que antivenenos comerciales de Brasil y Costa Rica presentaron alta inmunogenicidad para metaloproteasas del tipo PIII (Núñez y col., 2009; Calvete y col., 2011; Sousa y col., 2013), mientras que algunas serino proteasas, metaloproteasas tipo PI e incluso PLA₂ solo fueron parcialmente reconocidas (Núñez y col., 2009; Calvete y col., 2011). Esto se ha atribuido a la influencia de la masa molecular sobre la inmunogenicidad (constituyentes > 30 kDa son altamente inmunogénicos) (León y col., 2011); así como a la ausencia de epítopes en común, por ejemplo en el caso de las metaloproteasas se ha propuesto que estos pudieran restringirse a dominios específicos de las clases PII (tipo desintegrina) o PIII (rico en cisteína) (Sousa y col., 2013), mientras que las PI y las PLA₂ son consideradas toxinas pobremente inmunogénicas, lo cual también pudiera relacionarse a un elevado polimorfismo. (Núñez y col., 2009; Calvete y col., 2011; Sousa y col., 2013).

Conclusiones

Los resultados de este estudio exponen por primera vez el potencial tóxico del veneno de *B. venezuelensis* de la región oriental venezolana, este se caracterizó por sus elevados efectos letal, hemorrágico y hemolítico indirecto. La discusión comparativa de estos dos últimos parámetros y la caracterización bioquímica sugieren una importante variabilidad intra-especie en la constitución de serino y metaloproteasas. Adicionalmente la limitada reactividad cruzada evidenciada entre el antiveneno venezolano y ciertos constituyentes del veneno de *B. venezuelensis*, que pudieran incluir PLA₂ y grupos con actividades hemostáticas responsable de los efectos más característicos del veneno, advierten sobre la necesidad de evaluar el potencial neutralizante del antiveneno venezolano contra estas actividades, tal como lo recomienda la Organización Mundial de la Salud (WHO, 2017).

Agradecimiento

Bioterio del Instituto de Biomedicina, Facultad de Medicina, Universidad Central de Venezuela. Fondo Nacional de Ciencia y Tecnología (FONACIT) ente que financió el estudio, a través del Proyecto PEII N° 2012000783.

Conflicto de interés

No existe conflicto de interés entre los autores del estudio.

Referencias bibliográficas

- Anai K, Sugiti M, Yoshida E, Maruyama, M. 2002. Neutralization of a snake venom hemorrhagic metalloproteinase prevents coagulopathy after subcutaneous injection *Bothrops jararaca* of venom in rats. *Toxicon* 40: 63-68.

- Calvete J, Sanz L, Pérez A, Borges A, Vargas A, Lomonte B, Angulo Y, Gutiérrez JM, Chalkidis H, Mourão R, Fatima M, Moura-Da-Silva A. 2011. 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: 510-527.
- De Sousa L, Bastouri-Carrasco J, Matos M, Borges A, Bónoli S, Vásquez-Suárez A, Guerrero B, Rodríguez-Acosta A. 2013. Epidemiología del ofidismo en Venezuela (1996-2004). *Invest Clín* 54 (2): 123-137.
- Duque-Zerpa CT, Fernández I, Vargas A, López JC, Scannone H. 2014. Caracterización toxinológica del veneno de *Bothrops atrox* de Puerto Ayacucho, Edo. Amazonas (Venezuela) y su neutralización por un antiveneno venezolano. *Rev Científ FCV-LUZ* 24 (4): 355-362.
- Duque-Zerpa CT, Vargas A. 2015. Caracterización toxinológica del veneno de la serpiente *Bothrops colombiensis* de Paracotos, estado Miranda, Venezuela. *Rev Científ FCV-LUZ* 25: 239-247.
- Gay C, Leiva L, Teibler P, Acosta de Pérez O. 2005. Proteolytic, edematogenic and myotoxic activities of a hemorrhagic metalloproteinase isolated from *Bothrops alternatus* venom. *Toxicon* 46: 546-554.
- Girón ME, Padrón V, Ramos MI, Sánchez E, Guerrero B, García A, Uzcátegui N, Navarrete LF, Rodríguez-Acosta A. 2018. Intraspecies geographical variability in the South American tigrá mariposa (*Bothrops venezuelensis* Sandner 1952) snake venom activities. *Toxicon* 144: 23-33.
- Girón ME, Salazar A, Aguilar I, Pérez J, Sánchez E, Arocha-Piñango C, Rodríguez-Acosta A, Guerrero B. 2008. Hemorrhagic, coagulant and fibrinolytic activities of crude venom and fractions from mapanare (*Bothrops colombiensis*) snakes. *Comp Biochem Physiology C* 147: 113-121.
- Laemmli U. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
- León G, Sánchez L, Hernández A, Villalta M, Herrera M, Segura A, Estrada R, Gutiérrez JM. 2011. Immune response towards snake venoms. *Inflammation Allergy Drug Targets* 10: 1-18.
- López JC, Vargas A, Scannone H, Fernández I. 1999. Estudio cromatográfico, electroforético y enzimático del veneno total y fracción I de la serpiente venezolana *B. venezuelensis* (Tigrá Mariposa). *Rev Científ FCV-LUZ* 9: 314-320.
- Marsh N, Arocha-Piñango C. 1972. Evaluation of the fibrin plate method for estimating plasminogen activators. *Thromb Diath Haemorrh* 28:75-88.
- Mendoza JS, Berrio V, Gómez D. 2012. Reptilia, Squamata, Viperidae, *Bothrops venezuelensis* Leybold, 1873: Distribution extension and first country record. *Check List* 8: 310-312.
- Núñez V, Cid P, Sanz L, De la Torre P, Angulo Y, Lomonte B, Gutiérrez JM, Calvete J. 2009. 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: 57-78.
- Rengifo C, Rodríguez-Acosta A, Navarrete LF. 2019. Serpientes, venenos y tratamiento médico en Venezuela. 2da. Ed. Amazon Publisher pp. 120-272.
- Rodríguez-Acosta A, Sánchez E, Márquez A, Carvajal Z, Salazar A M, Girón ME, Estrella A, Gil A, Guerrero B. 2010. Hemostatic properties of Venezuelan *Bothrops* snake venoms with special reference to *Bothrops isabelae* venom. *Toxicon* 56: 926-935.
- Salazar AM, Rodríguez-Acosta A, Girón ME, Aguilar I, Guerrero B. 2007. A comparative analysis of the clotting and fibrinolytic activities of the mapanare (*Bothrops atrox*) (Serpentes: Viperidae) snake venom from different geographical areas in Venezuela. *Thromb Res* 120:95-104.
- Sánchez E, Girón ME, Uzcátegui N, Guerrero B, Saucedo M, Cuevas E, Rodríguez-Acosta A. 2014. Biochemical and biological characterization of lancehead (*Bothrops venezuelensis* Sandner 1952) snake venom from the Venezuelan Central Coastal range. *Bol. Malariol. Salud Ambient* 49: 138-149.
- Sousa L, Nicolau C, Peixoto P, Bernardoni J, Oliveira S, Portes-Junior J, Mourão R, Lima-Dos-Santos I, Sano-Martins I, Chalkidis H, Valente R, Moura-Da-Silva A. 2013. Comparison of phylogeny, venom composition and neutralization by antivenom in diverse species of *Bothrops* complex. *PLoS Negl Trop Dis* 7: e2442.
- Sousa L, Zdenek C, Dobson J, Brouw B, Coimbra F, Gillett A, Del-Rei T, Chalkidis H, Sant'anna S, Teixeira-Da-Rocha M, Grego K, Travaglia C, Moura Da Silva A, Fry B. 2018. Coagulotoxicity of *Bothrops* (Lancehead Pit-Vipers) venoms from Brazil: Differential biochemistry and antivenom efficacy resulting from prey-driven venom variation. *Toxins* 10: 411.

- Terra R, Pinto A, Guimaraes J, Fox J. 2009. Proteomic profiling of snake venom metalloproteinases (SVMPs): Insights into venom-induced pathology. *Toxicon* 54: 836-844.
- Tu A, James G, Chua A. 1965. Some biochemical evidence in support of the classification of venomous snake. *Toxicon* 3: 8-5.
- WHO, 2017. Guidelines for the production, control, and regulation of snake antivenom immunoglobulins. WHO, Geneva. Online: <https://www.medbox.org/dl/5e148832db60a2044c2d4b8a>