



# Estudio comparativo de las actividades enzimáticas del veneno de la serpiente *Bothrops colombiensis* de tres regiones geográficas de Venezuela

Comparative study of the enzymatic activities of *Bothrops colombiensis* snake venom from three geographical regions in Venezuela

CARMEN T. DUQUE ZERPA<sup>\*,\*\*1</sup>, ÁNGEL G.A. FLORES PEREIRA<sup>\*\*2</sup>, REINALDO GUEVARA<sup>\*3</sup>, ALBA M. VARGAS<sup>\*\*4</sup>

## Resumen

*Bothrops colombiensis* es una especie de serpiente venenosa de importancia médica en Venezuela. El envenenamiento por esta especie implica el desarrollo de coagulopatías, miotoxicidad y hemorragias, consecuencia de la presencia en sus venenos de una mezcla de enzimas hidrolíticas como fosfolipasas  $A_2$ , serino y metaloproteasas. Sin embargo, estudios previos han demostrado una importante variabilidad bioquímica, inter e intraespecie entre los venenos de serpiente, factor asociado a las características ontogenéticas y a la localización geográfica de los ejemplares, siendo necesaria su caracterización. Este estudio evaluó comparativamente los venenos de especímenes de *B. colombiensis*, colectados en Barlovento, Maracay y Paracotos, mediante el análisis de sus perfiles electroforéticos y sus actividades: procoagulante, hemolítica indirecta y proteolítica sobre fibrinógeno, BAEE (N-benzoil-L-arginina etil éster) y gelatina, además del reconocimiento antigénico por el antiveneno comercial venezolano empleando el método de Ouchterlony. Los resultados evidenciaron una importante variabilidad intraespecie, la cual se relacionó a los constituyentes más relevantes del género *Bothrops* (proteasas y fosfolipasas  $A_2$ ) y fue más marcada entre los venenos de las regiones más cercanas. El ensayo de Ouchterlony mostró en todos los casos reactividad inmunológica cruzada, aunque con variaciones en los perfiles de reconocimiento. Los datos obtenidos permitirán ampliar la información disponible en la literatura sobre la variabilidad geográfica de los venenos de la especie *B. colombiensis*, aspecto de relevancia para la comprensión y el manejo de sus envenenamientos e incluso la producción de antivenenos, al contribuir con la selección controlada de los venenos que constituirán los inóculos de producción y venenos de referencia.

**Palabras clave:** *Bothrops colombiensis*, variabilidad intraespecie, actividades enzimáticas, antiveneno

## Abstract

*Bothrops colombiensis* is a species of venomous snake of medical importance in Venezuela. Envenomation by this species involves the development of coagulopathies, myotoxicity and hemorrhages, a consequence of the presence in its venoms of a mixture of hydrolytic enzymes such as phospholipases  $A_2$ , serine and metalloproteases. However, previous studies have demonstrated an important biochemical inter and intraspecies variability among snake venoms, a factor associated with the ontogenetic characteristics and the geographical location of the specimens, making their characterization necessary. This study comparatively evaluated the venoms of *B. colombiensis* specimens, collected in Barlovento, Maracay and Paracotos, analyzing their electrophoretic profiles and their activities: procoagulant, indirect hemolytic and proteolytic on fibrinogen, BAEE (N-benzoyl-L-arginine ethyl ester) and gelatin, in addition to the antigenic recognition by the Venezuelan commercial antivenom using the Ouchterlony assay. The results showed an important intraspecies variability related to the most relevant constituents of the genus *Bothrops* (proteases and phospholipases  $A_2$ ) and were more marked among the venoms from the closest regions. The Ouchterlony assay showed immunological cross-reactivity in all cases, although with variations in the recognition profiles. The data obtained will allow expanding the information available in the literature on the geographical variability of the venoms of the *B. colombiensis* species, an aspect of relevance for the knowledge and management of its envenomation and even the production of antivenoms, by contributing to the controlled selection of the venoms that will constitute the production inoculums and reference venoms.

**Keywords:** *Bothrops colombiensis*, intraspecies variability, enzymatic activities, antivenom

\*Servicio de Análisis Toxicológico (SATOX), Facultad de Farmacia, Universidad Central de Venezuela. \*\*Unidad de Biotecnología, Facultad de Farmacia, Universidad Central de Venezuela. Correspondencia: ctduque@gmail.com

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

<sup>1</sup>[0000-0002-5899-3944](https://orcid.org/0000-0002-5899-3944)

<sup>2</sup>[0000-0002-3285-4452](https://orcid.org/0000-0002-3285-4452)

<sup>3</sup>[0000-0001-8953-3644](https://orcid.org/0000-0001-8953-3644)

DOI: [10.54305/RFFUCV.2023.86.1-2.18](https://doi.org/10.54305/RFFUCV.2023.86.1-2.18)

Disponible: [http://saber.ucv.ve/ojs/index.php/rev\\_ff](http://saber.ucv.ve/ojs/index.php/rev_ff)

Recepción: 14/11/2023

Aprobación: 28/11/2023

Rev. Fac. Farmacia 86 (3): 205-217, 2023

## Introducción

El envenenamiento por mordedura de serpiente es considerado un riesgo de salud ocupacional, así como una enfermedad tropical desatendida, que afecta principalmente trabajadores agrícolas de áreas rurales en países en desarrollo (Rengifo y col., 2019). En Venezuela, se reconoce una incidencia anual de 5700 casos (De Sousa y col., 2013) y se considera que el 90% de estos son originados por serpientes del género *Bothrops*. Dentro de este género *B. colombiensis*, distribuida al norte del río Orinoco, es una de las principales responsables (Rengifo y col., 2019).

El envenenamiento por las serpientes de este género implica el desarrollo de un cuadro clínico que incluye dolor, edema, coagulopatías, hemorragias, mionecrosis y/o falla renal aguda (Rengifo y col., 2019; Rodríguez-Acosta y col., 2000), eventos que son la consecuencia de la presencia en los venenos de una mezcla de constituyentes que incluyen metaloproteasas, fosfolipasas A<sub>2</sub>, L-aminoácido oxidasas, serinoproteasas y desintegrinas, entre otros (Calvete y col., 2009). Sin embargo, la expresión de dichos constituyentes en estos venenos puede variar, a nivel inter e intraespecie, dependiendo de la edad, sexo, dieta, filogenia e incluso la localización geográfica de los ejemplares, lo cual puede influir en la expresión del cuadro clínico tras el envenenamiento (Girón y col., 2008; Sousa y col., 2013) y en la capacidad neutralizante de los antivenenos. Esto implica la necesidad de caracterizar los venenos de importancia médica, de manera de disponer de datos experimentales que permitan la preparación de inóculos de producción de antivenenos y colecciones de venenos de referencia que cubran efectivamente

la variabilidad intraespecie (WHO, 2017). Este estudio evaluó comparativamente las actividades enzimáticas del veneno de la serpiente *Bothrops colombiensis*, de tres regiones geográficas de Venezuela y su reconocimiento antigénico por un antiveneno comercial venezolano. Adicionalmente los resultados se discutieron con reportes previos para otros venenos botrópicos, para estimar la toxicidad potencial de los venenos evaluados.

## Materiales y métodos

### VENENO

Los venenos se obtuvieron por el ordeño manual de especímenes adultos de *B. colombiensis* procedentes de Barlovento, estado Miranda (3 individuos); Maracay, estado Aragua (2 individuos) y Paracotos, estado Miranda (5 individuos), mantenidos en el serpentario de la Unidad de Biotecnología, Facultad de Farmacia, Universidad Central de Venezuela. Los venenos se cristalizaron por evaporación y se almacenaron, hasta su evaluación, a 4 °C en un desecador al vacío con CaCl<sub>2</sub> como agente desecante.

### ANTIVENENO

Se empleó el antiveneno polivalente producido en la Facultad de Farmacia de la Universidad Central de Venezuela (Lote 171). Su presentación es líquida y está constituido por fragmentos F(ab')<sub>2</sub> de inmunoglobulinas equinas, obtenidas con venenos de los géneros *Bothrops*, *Porthidium* y *Crotalus*. El inserto del producto refiere que cada mililitro neutraliza al menos 2 mg de veneno de *B. colombiensis* y 1,5 mg de veneno de *C. durissus cumanensis*.

## PERFIL ELECTROFORÉTICO

Las proteínas presentes en 30  $\mu\text{g}$  de los venenos se disolvieron en una mezcla comercial de inhibidores de proteasas (4:1) (Sigma® Cat. P-2714) y se evaluaron empleando electroforesis en geles de poliacrilamida (12,5%) con SDS (duodecilsulfato sódico) (SDS-PAGE), según el método de Laemmli (1970).

## DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD HEMOLÍTICA INDIRECTA

Se evaluó por la estimación cuantitativa a 540 nm, de la hemoglobina liberada tras la incubación de dosis seriadas de los venenos (1-20  $\mu\text{g}$ /0,1 mL de PBS pH7,2) con un sustrato constituido por: 10% eritrocitos humanos lavados, 6,4% yema de huevo y 1 mM  $\text{CaCl}_2$ , durante 2 horas a 37°C. Los resultados se expresaron como dosis hemolítica indirecta media ( $\text{DHI}_{50}$ ), definida como la cantidad de veneno ( $\mu\text{g}$ ) que induce un 50% de hemólisis (Condrea y col., 1964).

## DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD COAGULANTE

Alícuotas de 0,2 mL de plasma humano citratado (9:1), se distribuyeron en tubos de ensayo de plástico y se incubaron en baño María a 37°C durante 3 min. Post incubación se adicionó al plasma, a razón de 4 tubos por dosis, 0,1 mL de soluciones con dosis seriadas de los venenos en el rango de 0,6-12  $\mu\text{g}$  en NaCl 0,85% y empleando un cronómetro se determinó el tiempo de coagulación del plasma. Los controles incluyeron soluciones de trombina 5 U/mL y NaCl 0,85%. 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

Dosis seriadas de los venenos entre los 0,03-1  $\mu\text{g}$  en buffer Tris-HCl 0,02M pH 7,5 se incubaron con 100  $\mu\text{g}$  de fibrinógeno (Sigma®) en baño María a 37°C durante 30 min. La reacción se detuvo por la adicción a cada mezcla de 100  $\mu\text{L}$  de una solución de  $\beta$ -mercapto-etanol 3,2% y la incubación en baño de agua hirviendo durante 5 min. La degradación del sustrato fue expuesta por análisis electroforético (SDS-PAGE 12,5%) con tinción de los geles con Azul de Coomassie R 250 (Gay y col., 2005).

## DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ESTERÁSICA

Alícuotas de 2,9 mL de una solución del sustrato BAEE (N-benzoil-L-arginina etil éster) (Sigma®), 0,25 mM en buffer fosfato 0,0667 M pH 7, se incubaron con 0,1 mL de soluciones con dosis seriadas de los venenos en el rango de 25-200  $\mu\text{g}$  en HCl 0,001 N y se registraron los cambios en la absorbancia de las mezclas a 253 nm cada 6 min. durante un lapso de 0,5 horas. Los resultados se expresaron como actividad específica (U/mg), definida como los micromoles de sustrato hidrolizados en un minuto/mg de veneno (Tu y col., 1965).

## DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD PROTEOLÍTICA SOBRE GELATINA

Las proteínas presentes en 8  $\mu\text{g}$  de los venenos se disolvieron en buffer de muestra con SDS y se corrieron en geles de poliacrilamida-SDS al 12,5% copolimerizados con 1% de gelatina (Merck®). Posteriormente los geles se incubaron con una solución de tritón X-100 al 2,5% durante 1 hora, se lavaron con agua

destilada durante 10 min con cambios consecutivos del solvente y se incubaron con buffer de zimografía (20 mM Tris-HCl pH 7,4, 0,15 M NaCl, 5 mM CaCl<sub>2</sub>) durante 24 horas. Las zonas de degradación en los geles fueron expuestas por la tinción con Azul de Coomassie R 250 (Terra y col., 2009).

#### RECONOCIMIENTO ANTIGÉNICO DE LOS VENENOS DE *BOTHROPS COLOMBIENSIS* POR UN ANTIVENENO COMERCIAL VENEZOLANO

Se empleó el método de doble inmunodifusión o de Ouchterlony (Hornbeck, 2017). En placas de Petri de plástico (6 cm diámetro) se adicionaron 5 mL de una solución al 1% agarosa en PBS pH 7,2. Solidificado el gel se abrieron pozos de 4-5 mm de diámetro, formando un patrón hexagonal con un pozo central. En el pozo central se incorporaron 20  $\mu$ L del antiveneno y en su periferia 20  $\mu$ L de soluciones con dosis seriadas del veneno en el rango de 5-80  $\mu$ g en PBS pH 7,2; las placas se incubaron en cámara húmeda a temperatura ambiente durante 24 horas y finalmente se lavaron con cambios consecutivos de PBS diluido (1:4), empleando agitación leve durante 24 horas. La formación de los inmunocomplejos se evidenció por la tinción de los geles con Azul de Coomassie R 250.

#### Análisis estadístico

Los resultados de las actividades: coagulante, hemolítica indirecta y esterásica se expresaron como la media  $\pm$  la desviación estándar de tres evaluaciones independientes. La comparación de promedios se realizó por análisis de varianza de una vía. Todos los análisis estadísticos se realizaron a un intervalo

de confianza del 95%. Para el análisis de los geles de electroforesis se empleó el programa Image Lab 5.2.1 (BioRad. USA).

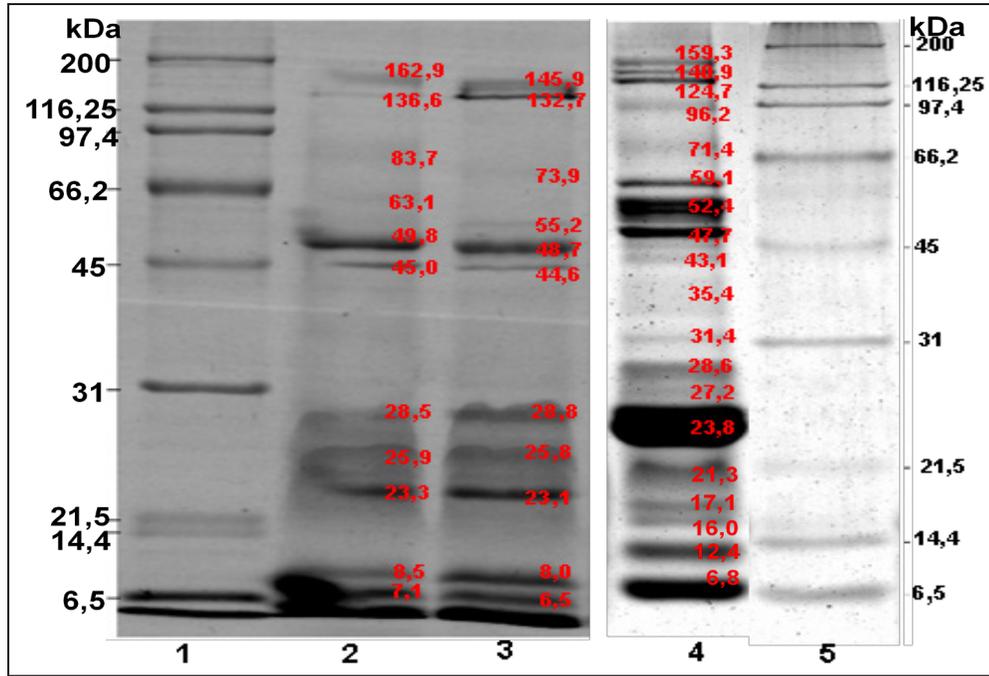
## Resultados

#### PERFIL ELECTROFORÉTICO

Los perfiles electroforéticos mostraron una distribución de bandas proteicas en los rangos de 6,5-145,9; 7,1-162,9 y 6,8-159,3 kDa para los venenos de Barlovento, Maracay y Paracotos, respectivamente (Figura 1). Al comparar los perfiles entre sí en el veneno de Paracotos se observaron diferencias marcadas, destacando la presencia de un mayor número de bandas (~19 vs ~11 en los venenos de Barlovento y Maracay), además de una elevada intensidad para las bandas con masas de 6,8; 12,4; 23,8 y entre los 47,7-59,1 kDa (Figura 1). En el caso de los venenos de Barlovento y Maracay se observó una composición de bandas proteicas con importantes similitudes, esencialmente para los grupos de baja (6,5-8,5 kDa) y media (23-50 kDa) masa molecular, así como ligeras diferencias en el rango de 63-83,7 kDa, donde se apreciaron 2 bandas tenues en el veneno de Maracay y solo 1 en su homólogo de Barlovento, así como entre los 132,7-146 kDa donde se observó una mayor densidad de bandas proteicas para este último veneno (Figura 1).

#### DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD HEMOLÍTICA INDIRECTA

Todos los venenos indujeron actividad hemolítica indirecta con diferencias significativas entre sus DHI<sub>50</sub> ( $p < 0,05$ ). El veneno de *B. colombiensis* de Paracotos presentó la menor DHI<sub>50</sub>, exhibiendo la mayor actividad, mientras que sus



**Figura 1.** Perfiles electroforéticos de los venenos de *Bothrops colombiensis*. 30  $\mu$ g de cada veneno disueltos en inhibidores de proteasas (4:1) (Sigma® Cat. P-2714), se corrieron en geles de poliacrilamida (12,5%) con SDS. Carriles 1 y 5: Marcador de masa molecular (BIO-RAD®. Cat. 161-0318). Carriles 2-4: Venenos de *B. colombiensis*: 2: Maracay, estado Aragua. 3: Barlovento, estado Miranda. 4: Paracotos, estado Miranda. Tinción: Azul de Coomassie R 250. La evaluación se realizó por duplicado

homólogos de Barlovento y Maracay presentaron 1,26 y 2,86 veces menos actividad, respectivamente (Tabla I).

**Tabla I.**  
Actividades hemolíticas indirecta, coagulante y esterásica de los venenos de *B. colombiensis*

Actividad	Venenos: Procedencia		
	Barlovento	Maracay	Paracotos
<b>Hemolítica indirecta</b> (DHI <sub>50</sub> : $\mu$ g)	2,58 ± 0,23*	5,87 ± 0,23	2,05 ± 0,53*
<b>Coagulante</b> (DCM: $\mu$ g)	1,95 ± 0,16*	0,99 ± 0,12*	1,32 ± 0,24*
<b>Esterásica</b> (U/mg)	263,28 ± 21,30*	338,90 ± 20,24*	298,80 ± 35,20*

DHI<sub>50</sub>: dosis hemolítica indirecta media. DCM: dosis coagulante mínima. Los resultados representan la media  $\pm$  desviación estándar (n: 3). \*Resultados con diferencia estadísticamente significativa ( $p < 0,05$ )

#### DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD COAGULANTE

Los venenos indujeron la coagulación directa del plasma humano, con diferencias significativas entre sus DCM ( $p < 0,05$ ). El veneno de *B. colombiensis* de Maracay presentó la menor DCM, exhibiendo la mayor actividad, mientras que sus homólogos de Paracotos y Barlovento fueron 1,33 y 1,97 veces menos procoagulantes, respectivamente (Tabla I).

#### DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ESTERÁSICA

Todos los venenos indujeron la degradación del BAEE, con diferencias significativas entre sí ( $p < 0,05$ ). El veneno de *B. colombiensis* de Barlovento mostró la menor actividad ( $263,28 \pm 21,30$  U/mg) y el de Maracay la mayor ( $338,90 \pm 20,24$  U/mg) (Tabla I).

#### DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD FIBRINOGENOLÍTICA

Los venenos indujeron la degradación parcial del fibrinógeno, glicoproteína dimérica conformada por tres cadenas polipeptídica: alfa ( $\alpha$ ), beta ( $\beta$ ) y gamma ( $\gamma$ ). El análisis densitométrico de los geles evidenció en todos los casos que el efecto fue selectivo sobre las cadenas  $\alpha$  y  $\beta$ , aunque se observaron diferencias intraespecíficas (Figura 2 A-C): con el veneno de Barlovento, la degradación de la cadena  $\alpha$  se inició con  $0,03 \mu\text{g}$  y fue completa con  $1 \mu\text{g}$ ; sobre la cadena  $\beta$  el efecto fue parcial y se inició con  $0,5 \mu\text{g}$  (Figura 2A). Con el veneno de los especímenes de Maracay la degradación de ambas cadenas se inició con  $0,03 \mu\text{g}$ , pero solo la cadena  $\alpha$  fue totalmente degradada ( $1 \mu\text{g}$ ) (Figura 2B). Mientras que con el veneno de los ejemplares de Paracotos la degradación de ambas cadenas fue simultánea, se inició con  $0,03 \mu\text{g}$  y fue total con  $0,5 \mu\text{g}$  de veneno (Figura 2C).

#### DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD PROTEOLÍTICA SOBRE GELATINA

Todos los venenos indujeron el desarrollo de bandas de degradación en el zimograma (Figura 3), para el veneno de *B. colombiensis* de Barlovento estas se observaron en el rango de  $\sim 45,3$ - $64,5$  kDa; mientras que para sus homólogos de Maracay y Paracotos las bandas se localizaron  $\sim 64,5$  y  $45,3$  kDa, respectivamente.

#### RECONOCIMIENTO ANTIGÉNICO DE LOS VENENOS POR UN ANTIVENENO COMERCIAL VENEZOLANO

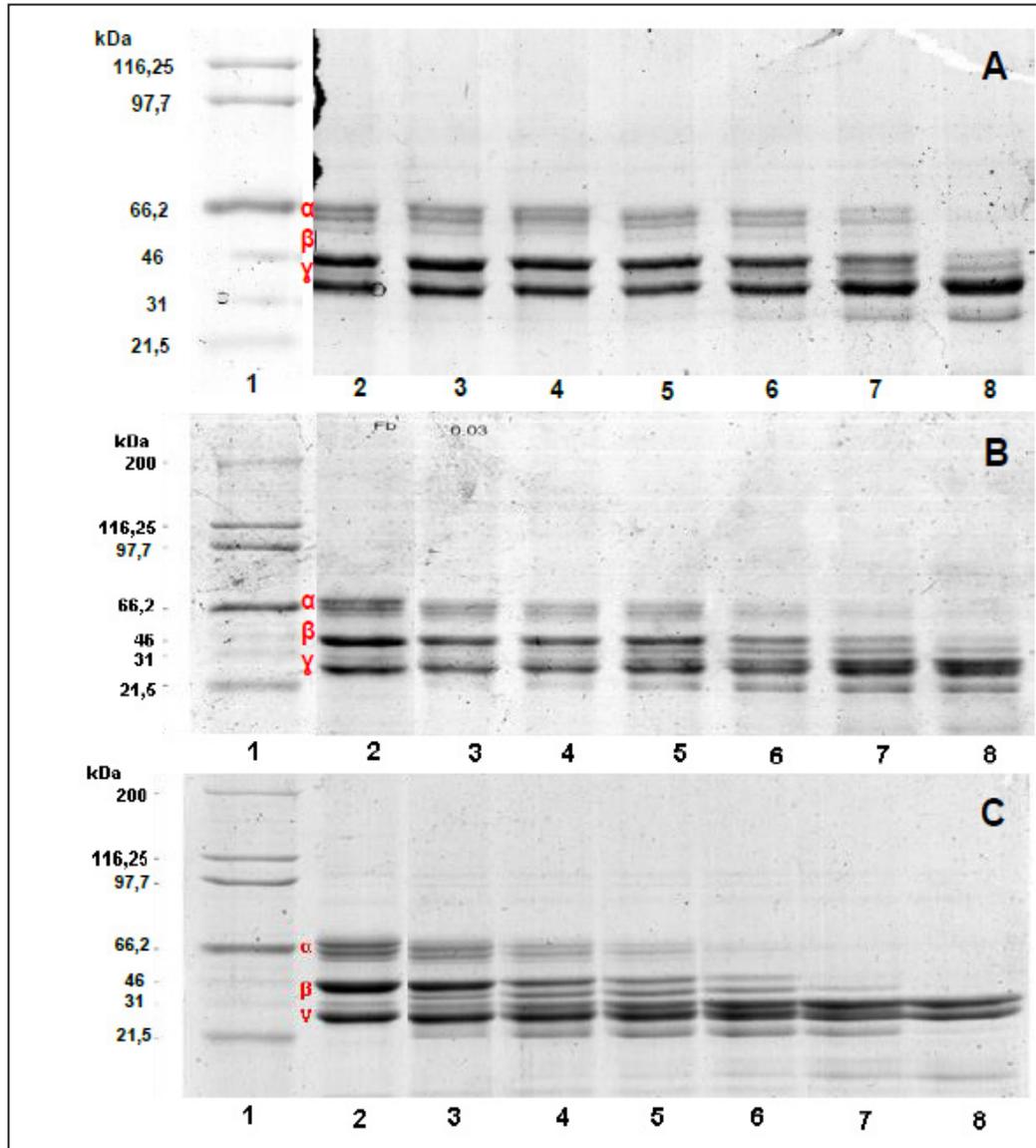
Al enfrentar los venenos en estudio al antiveneno polivalente venezolano, en todos los casos se observó la presencia de bandas de precipitina en los geles de

agarosa, sin embargo, al comparar estos entre sí destacaron variaciones asociadas principalmente a la intensidad de las bandas (Figura 4). En este caso, resaltó particularmente la menor intensidad en las bandas de reconocimiento para el veneno de *B. colombiensis* de Barlovento, en comparación a lo observado para sus homólogos (Figura 4).

### Discusión

La variación bioquímica en la composición de los venenos de serpientes es un factor asociado a las características ontogénicas y a la distribución geográfica de los ejemplares, el cual dependiendo de su magnitud e implicaciones bioquímicas es responsable de variaciones en el cuadro clínico evidenciado en las víctimas y en la potencia neutralizante de los antivenenos (Calvete y col., 2009; Rodríguez-Acosta y col., 2010; Duque Zerpa y col., 2014 y 2022; Girón y col., 2013b, 2018). Esto hace imprescindible la caracterización de los venenos de ofidios de importancia médica (WHO, 2017) como es el caso *B. colombiensis*, especie endémica venezolana, con una presencia predominante en el territorio nacional que abarca zonas densamente pobladas como los estados Aragua y Miranda (Rodríguez-Acosta y col., 2000; Calvete y col., 2009), donde los venenos de esta especie han sido escasamente estudiados con base en su variabilidad intraespecífica y antigenicidad.

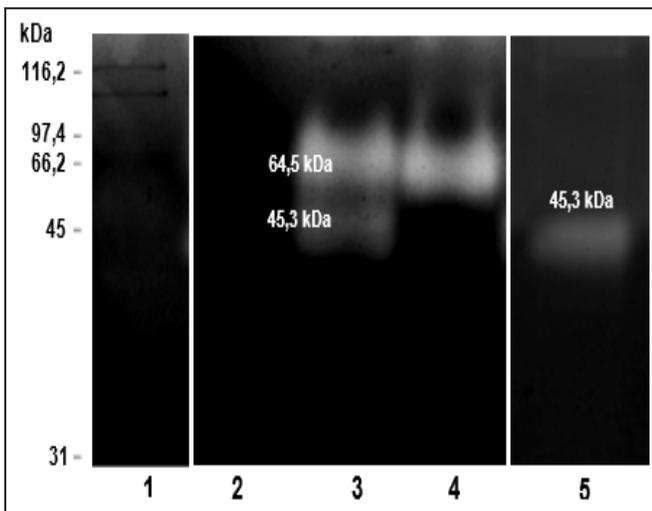
En este estudio, el análisis electroforético de los venenos evidenció un rango de distribución de proteínas relativamente similar entre los  $\sim 6$ - $163$  kDa, lo cual sugiere la presencia en los venenos de constituyentes tipo fosfodiesterasas (94-



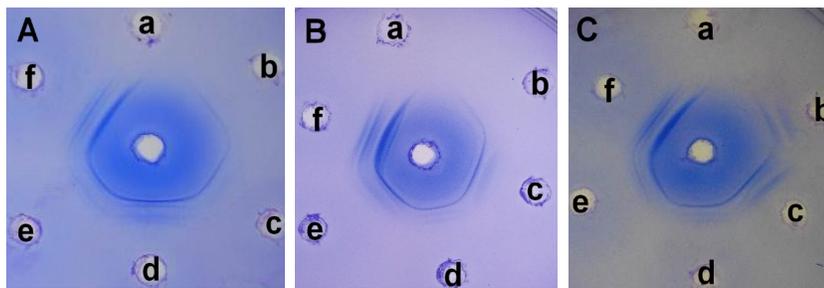
**Figura 2.** Actividad fibrinogenolítica de los venenos de *Bothrops colombiensis*. A: Barlovento, estado Miranda. B: Maracay, estado Aragua. C: Paracotos, estado Miranda. Carriles: 1. Marcador de masa molecular (BIO-RAD®. Cat. 161-0317). Carril 2: 100 µg de fibrinógeno. 3 al 8: fibrinógeno (100 µg) vs. concentraciones seriadas de veneno (3: 0,03 µg, 4: 0,06 µg, 5: 0,125 µg, 6: 0,25 µg, 7: 0,5 µg, 8: 1 µg). Tinción: Azul de Coomassie R 250. Las evaluaciones se realizaron por duplicado

140 kDa), L aminoácido oxidasas (85-150 kDa), hialuronidasas (~73 kDa), serino proteasas (25-70 kDa), fosfolipasas A<sub>2</sub> (12-18 kDa), metaloproteasas de las clases PI (20-30 kDa), PII (30-60 kDa) y PIII (60-100 kDa) e incluso péptidos, como las desintegrinas (6,6-10 kDa: *B. punctatus*, *B. atrox*, *B. colombiensis*) (Calvete y col., 2009; Sánchez y col., 2009; León y col.,

2011). Adicionalmente la comparación cuali/cuantitativa de los perfiles electroforéticos reflejó variaciones intraespecíficas, las cuales fueron más marcadas para el veneno de *B. colombiensis* de Paracotos. En este caso, destacó la presencia de bandas proteicas en los rangos de 12-21, 31-43 y 59-124 kDa, ausentes en los otros venenos evaluados, así como la muy



**Figura 3.** Actividad proteolítica sobre gelatina de los venenos de *Bothrops colombiensis*. Carril 1: Marcador de masa molecular (Biorad® Cat. Cat. 161-0317). Carril 2: Control negativo. Carriles 3-5: Venenos de *B. colombiensis* (8 µg). 3: Barlovento, estado Miranda. 4: Maracay, estado Aragua. 5: Paracotos, estado Miranda. Tinción: Azul de Coomassie R 250. La evaluación se realizó por duplicado



**Figura 4.** Reconocimiento antigénico de los venenos de *Bothrops colombiensis* por el antiveneno comercial venezolano. A: Barlovento, estado Miranda. B: Maracay, estado Aragua. C: Paracotos, estado Miranda. Se enfrentaron concentraciones seriadas de los venenos en 20 µL de PBS pH 7,2 (a: 0 µg; b: 2,5 µg; c: 5 µg; d: 10 µg; e: 20 µg; f: 40 µg), con 20 µL del antiveneno (pozo central). Tinción: Azul de Coomassie R 250. La evaluación se realizó por duplicado

elevada intensidad de bandas de baja y media masa molecular. Estos resultados sugieren variaciones, posiblemente relacionadas a desintegrinas y enzimas tipo fosfolipasas A<sub>2</sub>, serino y metaloproteasas, grupos responsables principalmente de las actividades necrosante, edematizante, procoagulante y hemorrágica (Sánchez y col., 2009). Los venenos de Barlovento y Maracay

presentaron perfiles electroforéticos con una importante similitud, la cual se asoció esencialmente a los grupos de bandas más abundantes (~6,5-8,5; 23-28,8 y 44,6-50 kDa), sin embargo, la gran mayoría de estas fueron más intensas en el veneno de Barlovento lo cual permite sugerir una posible concentración mayor de proteasas y quizás desintegrinas en este veneno.

La evaluación de los efectos enzimáticos mostró que todos los venenos indujeron actividades hemolítica indirecta, procoagulante, fibrinogenolítica, esterásica y gelatinolítica, con relevantes variaciones intraespecíficas. En el estudio de la actividad hemolítica indirecta las diferencias observadas (Paracotos > Barlovento > Maracay), sugieren variaciones en la constitución de enzimas

fosfolipasas A<sub>2</sub> (Asp 49: calcio dependiente) (León y col., 2011), esta variabilidad en este grupo enzimático ha sido frecuentemente reportada y se ha relacionado a la expresión de isoformas en estos venenos (Sousa y col., 2022). Adicionalmente al comparar con estudios previos, la magnitud de las DHI<sub>50</sub> estimadas coincide con lo reportado para especímenes de *B. atrox* (Amazonas, Ucayali y Junín)

del Perú (Ortiz y col., 2012), mientras que al comparar con reportes para *B. venezuelensis* (Caripe, estado Monagas, Venezuela) (6,14 ± 1,49 µg) (Guevara y col., 2015) los venenos de Barlovento y Paracotos mostraron mayor actividad, esto sugiere una relevante concentración de enzimas tipo fosfolipasas A<sub>2</sub> en los venenos objeto de este estudio. Esta

familia de enzimas se considera uno de los constituyentes más tóxicos de los venenos de serpiente y en el caso del género *Bothrops* se han relacionado a los efectos edematizante, mionecrótico, anticoagulante y la degranulación de mastocitos (León y col., 2011; Sousa y col., 2022).

En la evaluación de la actividad coagulante los venenos presentaron diferencias significativas entre sus DCM, esto sugiere variaciones en la constitución de las enzimas responsables. Estas enzimas han sido caracterizadas como serino proteasas con actividad tipo trombina y metaloproteasas activadoras del factor X y/o protrombina, las cuales contribuyen a la defibrinogenación y al consumo de otros factores de coagulación (Sajevic y col., 2011). Por otra parte, el factor de variabilidad entre las DCM obtenidas (1,95: 1: 1,32/Barlovento: Maracay: Paracotos), no coincide con lo observado en los perfiles electroforéticos (media y alta masa molecular) donde los venenos de Maracay y Barlovento mostraron una marcada similitud y el homólogo de Paracotos presentó casi el doble de bandas proteicas, esto pone de manifiesto las limitaciones del modelo electroforético para el adecuado análisis comparativo de los venenos.

En cuanto a la magnitud del potencial coagulante, al comparar con reportes previos para este género en Venezuela (Tabla II), se observó que las DCM de los venenos de *B. colombiensis* fueron inferiores a lo reportado para venenos de especímenes de *B. atrox* (estado Amazonas) (Duque y col., 2014) o *B. venezuelensis* de los estados Miranda (Baruta y La Boyera) (Girón y col., 2018) y Monagas (Duque y col., 2022), lo cual refleja un mayor potencial procoagulante en los venenos objeto de este estudio.

En el caso de la actividad fibrinogenolítica los resultados obtenidos sugieren la presencia en los venenos de  $\alpha$  y  $\beta$  fibrinógenasas, mientras que las variaciones observadas en los perfiles de degradación (Paracotos > Maracay > Barlovento) sugieren diferencias en la constitución de las enzimas responsables.

Las fibrinogenasas aisladas y purificadas de los venenos de vipéridos, se han caracterizado como: 1) serino proteasas, correspondientes a enzimas tipo trombina, las cuales degradan las cadenas  $\alpha$  y/o  $\beta$  del fibrinógeno induciendo la coagulación y 2) fibrino(ge)líticas, que incluyen (a) metaloproteasas, las cuales hidrolizan las cadenas  $\alpha$  y  $\beta$  del fibrinógeno (con preferencia o exclusividad por la cadena  $\alpha$ ) y (b) serino proteasas, con preferencia por la cadena  $\beta$  (Gay y col., 2005; Sajevic y col., 2011). En el caso de *B. colombiensis*, Girón y col., 2013a,b, aislaron y caracterizaron dos metaloproteasas (Colombienasa 1 y 2) con actividad  $\alpha$ ,  $\beta$ , e incluso  $\gamma$ -fibrinógenasa para la Colombienasa 2 en venenos procedentes de Caucagua (estado Miranda). Este efecto aunado al relevante potencial procoagulante sobre el plasma humano, referido previamente, va a potenciar el efecto defibrinante de estos venenos.

La evaluación de la actividad esterásica mostró diferencias intraespecíficas (Maracay > Paracotos > Barlovento), que sugieren variaciones en el perfil de enzimas responsables. Dichas enzimas se han relacionado a serino proteasas con actividad hemostática, asociada principalmente a activadores del factor V, fibrino(ge)lítica y/o liberadores de quininas (Tu y col., 1965). Adicionalmente, al comparar los resultados obtenidos con lo reportado en estudio previos para este género (Tabla II), se puede referir para los

**Tabla II.**

Comparación de las actividades coagulante y esterásica de los venenos de *B. colombiensis* con reportes previos para este género en Venezuela

Especie (procedencia)	DCM ( $\mu\text{g}$ )	Actividad esterásica (U/mg)	Referencia
<i>B. atrox</i> (Pto. Ayacucho. Edo. Amazonas)	7,66 $\pm$ 0,48	NE	Duque y col., 2014
<i>B. venezuelensis</i> (Región Capital)	NE	209	López y col., 1999
<i>B. venezuelensis</i> (Edo. Aragua)	0,6 $\pm$ 0,06	1960,67 $\pm$ 42,8	Girón y col., 2018
<i>B. venezuelensis</i> (Baruta. Edo. Miranda)	2,1 $\pm$ 0,39	900 $\pm$ 10	Girón y col., 2018
<i>B. venezuelensis</i> (La Boyera. Edo. Miranda)	4,8 $\pm$ 0,47	805,5 $\pm$ 67,3	Girón y col., 2018
<i>B. venezuelensis</i> (Lagunetica. Edo. Miranda)	1,9 $\pm$ 0,57	922,19 $\pm$ 58,5	Girón y col., 2018
<i>B. venezuelensis</i> (Edo. Monagas)	7,83 $\pm$ 0,45	158,87 $\pm$ 18,65	Duque y col., 2022
<i>B. colombiensis</i> (Barlovento. Edo. Miranda)	1,95 $\pm$ 0,16	263,28 $\pm$ 21,30	<b>Este estudio</b>
<i>B. colombiensis</i> (Paracotos. Edo. Miranda)	1,32 $\pm$ 0,24	298,8 $\pm$ 35,20	<b>Este estudio</b>
<i>B. colombiensis</i> (Maracay. Edo. Aragua)	0,99 $\pm$ 0,12	338,90 $\pm$ 20,24	<b>Este estudio</b>

DCM: dosis coagulante mínima. U/mg: actividad específica (micromoles de sustrato hidrolizados por minuto/mg de veneno).  
NE: no evaluada, Edo: estado

venenos evaluados una mayor actividad esterásica en comparación con los venenos de *B. venezuelensis* de la región Capital y el estado Monagas (López y col., 1999; Duque y col., 2022) y menor en comparación con lo reportado para especímenes de los estados Aragua y Miranda (Girón y col., 2018).

En el caso de la actividad proteolítica sobre gelatina el veneno de *B. colombiensis* de Barlovento mostró la mayor actividad, en comparación con sus homólogos e incluso con lo reportado por Sánchez y col. (2015), en la evaluación del potencial

antitrombótico y anticoagulante del veneno de *B. colombiensis* (Barlovento, estado Miranda), lo cual sugiere variaciones en la constitución de las enzimas responsables. Estas, considerando que la gelatina es un producto de desnaturalización del colágeno, se han relacionado a metaloproteasas capaces de degradar la matriz extracelular (León y col., 2011; Sajevic y col., 2011). En consecuencia, los resultados obtenidos sugieren variaciones en la expresión de metaloproteasas PII y PIII en los venenos evaluados, que implican la expresión de ambos grupos en el veneno de *B. colombiensis* de Barlovento, así como la

ausencia o la presencia de niveles no detectables, bajo las condiciones de este estudio, de los grupos PII y PIII en los venenos de Maracay y Paracotos, respectivamente. Esto pudiera adicionalmente dar indicios sobre el potencial hemorrágico de estos venenos: Barlovento > Maracay > Paracotos, con base en el efecto reconocido para estas enzimas (PIII > PII > PI) (Sajevic y col., 2011).

Finalmente, el ensayo de doble inmunodifusión u Ouchterlony evidenció reactividad inmunológica cruzada, aunque destacaron diferencias en los perfiles de reconocimiento antígeno-anticuerpo consecuencia de la variabilidad antigénica entre los venenos. No obstante, aunque el método de Ouchterlony no permite discernir los antígenos reconocidos, la menor reactividad frente al veneno de los ejemplares procedentes de Barlovento (veneno con elevado potencial hemolítico indirecto, gelatinolítico y menor efecto procoagulante), aunado a estudios proteómicos y Western blot que refieren el reconocimiento parcial de serino proteasas, metaloproteasas PI y fosfolipasas A<sub>2</sub> y la escasa antigénicidad de las desintegrinas (Calvete y col., 2009; Sousa y col., 2013, 2022; Duque y col., 2022), implica la necesidad de estudiar el potencial neutralizante del antiveneno venezolano sobre las principales actividades inducidas por los venenos en estudio.

## Conclusiones

Los resultados obtenidos evidencian una importante variabilidad intraespecie en los venenos evaluados, siendo esta más marcada entre especímenes de áreas geográficas cercanas (Barlovento y Paracotos, estado Miranda ~74 Km) y

se relacionó esencialmente a proteasas y fosfolipasas A<sub>2</sub>, grupos responsables por los efectos más relevantes del envenenamiento botrópico como mionecrosis, edema, coagulopatías y hemorragias. Esta elevada variabilidad intraespecie, aunada al relevante potencial procoagulante, hemolítico indirecto y proteolítico de los venenos evaluados, implica la necesidad de estudiar el potencial neutralizante del antiveneno venezolano.

Estos hallazgos permiten insistir en la necesidad de caracterizar los venenos de importancia médica, con énfasis en aquellas especies que presentan una muy amplia distribución geográfica y abarcan regiones densamente pobladas, como *B. colombiensis* o *B. venezuelensis*, entre otras, lo cual en Venezuela solo ha sido abordado parcialmente.

## Conflicto de interés

Los autores declaran que no existe conflicto de interés.

## Referencias Bibliográficas

- Calvete J, Borges A, Segura A, Flores-Díaz M, Alape-Girón A, Gutiérrez JM, Diez N, De Sousa L, Kiriakos D, Sánchez E, Faks J, Escolano J, Libia Sanz. 2009. Snake venomomics and antivenomics 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.
- Condrea E, Devries A, Mager J. 1964. Hemolysis and splitting of human erythrocyte phospholipids by snake venom. *Biochim Biophys Acta* 84: 60-73.
- 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, Pineda ME, Navarrete LF, Vargas AM. 2022. Caracterización toxinológica, bioquímica e inmunológica del veneno de la serpiente *Bothrops venezuelensis* (Macizo del Turimiquire, estado Monagas, Venezuela). *Rev Fac Farmacia* 85 (1 y 2): 67-79.
- 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, 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.
- Girón ME, Guerrero B, Salazar AM, Sánchez EE, Álvarez M, Rodríguez-Acosta A. 2013a. Functional characterization of fibrinolytic metalloproteinases (colombienases) isolated from *Bothrops colombiensis* venom. *Toxicon* 74:116-26.
- Girón ME, Rodríguez-Acosta A, Salazar AM, Sánchez EE, Galán J, Ibarra C, Guerrero B. 2013b. Isolation and characterization of two new non-hemorrhagic metalloproteinases with fibrinogenolytic activity from the mapanare (*Bothrops colombiensis*) venom. *Arch Toxicol* 87 (1): 197-208.
- Guevara R; Duque C; Pineda M; Vargas A. Evaluación de las actividades enzimáticas de dos venenos botrópicos con alta incidencia en los accidentes ofídicos en Venezuela. LXV Convención Anual de ASOVAC, Venezuela, 2015.
- Hornbeck P. 2017. Double-immunodiffusion assay for detecting specific antibodies (Ouchterlony). *Curr Protoc Immunol* 116: 2.3.1-2.3.4.
- 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. *Inflamm 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 *Bothrops venezuelensis* (Tigra Mariposa). *Rev Científ FCV-LU* 9: 314-320.
- Ortiz C, Lazo F, Bellido C, Gonzales E, Yarlequé A. 2012. Variaciones en las actividades enzimáticas del veneno de la serpiente *Bothrops atrox* "jergón", de tres zonas geográficas del Perú. *Rev Peru Med Exp Salud Pública* 29 (2):198-205.
- 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, Uzcátegui W, Azuaje R, Aguilar I, Girón ME. 2000. Análisis clínico y epidemiológico de los accidentes por mordeduras de serpientes del género *Bothrops* en Venezuela. *Rev Cubana Med Trop* 52 (2): 90-94.
- 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.
- Sajevic T, Leonardi A, Krizaj I. 2011. Haemostatically active proteins in snake venoms. *Toxicon* 57 (5): 627-645.
- Sánchez E, Rodríguez-Acosta A, Palomar R, Lucena S, Bashir S, Soto J, Pérez J. 2009. Colombistatin: a disintegrin isolated from the venom of the South American snake (*Bothrops colombiensis*) that effectively inhibits platelet aggregation and SK-Mel-28 cell adhesion. *Arch Toxicol* 83: 271-279.
- Sánchez E, Girón ME, Guerrero B, Uzcátegui N, Rodríguez-Acosta A. 2015. Biological and biochemical characterization of the Neotropical Macagua (*Bothrops colombiensis*) snake venom from Barlovento region, Miranda state, Venezuela. *Rev Cubana Med Trop* 67 (2): 213-230.
- 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, Freitas A, Cardoso B, Del-Rei T, Mendes V, Oréfice D, Rocha M, Prezoto B, Moura-da-Silva, A. 2022. Diversity of Phospholipases A<sub>2</sub> from *Bothrops atrox* Snake Venom: Adaptive Advantages for Snakes Compromising Treatments

- for Snakebite Patients. 14 (543): 1-24.
- 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>. 10-4-22.