

# CARACTERIZACIÓN TOXINOLÓGICA DEL VENENO DE *Bothrops atrox* DE PUERTO AYACUCHO, EDO. AMAZONAS (VENEZUELA) Y SU NEUTRALIZACIÓN POR UN ANTIVENENO VENEZOLANO

Toxinological Characterization of the *Bothrops atrox* Venom from Puerto Ayacucho, Amazonas State (Venezuela) and its Neutralization Capability by Venezuelan Antivenom

Carmen Teresa Duque-Zerpa<sup>1, 2\*</sup>, Irma Fernández<sup>2</sup>, Alba Vargas<sup>2</sup>, Juan Carlos López-Johnsthor<sup>2</sup> y Héctor Scannone-Tempone<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Servicio de Análisis Toxicológico (SATOX), Facultad de Farmacia, Universidad Central de Venezuela.

<sup>2</sup>Unidad de Biotecnología, Facultad de Farmacia, Universidad Central de Venezuela. \* ctduque@gmail.com

## RESUMEN

*Bothrops atrox* es reconocida por la Organización Mundial de la Salud (OMS) como una de las serpientes suramericanas, que comúnmente causa incapacidad física o muerte. En Venezuela, esta especie se localiza en los estados Amazonas, Bolívar y Delta Amacuro siendo responsable de un cuadro fisiopatológico caracterizado por edema, hemorragia, necrosis, incoagulabilidad sanguínea y hemólisis. Para el tratamiento del envenenamiento por esta especie, en Venezuela se produce un antiveneno polivalente desde hace más de 30 años, sin embargo, no se ha estudiado su capacidad neutralizante contra las actividades letal, hemorrágica, edematizante, defibrinante, coagulante y hemolítica indirecta inducidas por esta especie como recomienda la OMS. Este estudio planteó la caracterización de las actividades tóxicas del veneno total de *B. atrox* (Puerto Ayacucho-Edo. Amazonas) y la valoración del potencial neutralizante del antiveneno venezolano sobre estas actividades, empleando pruebas de incubación previa de veneno-antiveneno. El veneno evaluado indujo actividades hemorrágica, edematizante, letal, defibrinante, coagulante y hemolítica indirecta, evidenciando un perfil toxinológico similar al descrito para especímenes de *B. atrox* de otras localidades de Sur América, aunque con algunas variaciones cuantitativas, las que pudieran relacionarse principalmente a la variabilidad bioquímica y/o en la concentración de los constituyentes con actividad tóxica presentes en el veneno. En la evaluación del antiveneno se observó que éste neutralizó totalmente las actividades letal, hemorrágica, coagulante y defibrinante, pero solo parcialmente las actividades edematizante (63%) y hemolítica

indirecta (65%), evidenciando que el antiveneno venezolano contiene un título de anticuerpos teóricamente efectivo para la neutralización de las actividades tóxicas inducidas por el veneno total de *B. atrox* de Puerto Ayacucho (Edo. Amazonas).

**Palabras clave:** *Bothrops atrox*, antiveneno, neutralización, caracterización toxinológica.

## ABSTRACT

*Bothrops atrox* is recognized by the World Health Organization (WHO) as one of the south american snakes which commonly cause physical disability or death. In Venezuela, this specie is localized in the States of Amazonas, Bolivar and Delta Amacuro and it is responsible for a physiopathological picture characterized by edema, hemorrhage, necrosis, blood uncoagulability and hemolysis. In Venezuela, there is a polyvalent antivenom available which has been directly used in clinical cases for longer than 30 years, however, its neutralizing capability against lethal, hemorrhagic, edema-forming, defibrinating, coagulating and indirect hemolytic activities has not been studied yet, as it is recommended by WHO; this assay sets the characterization of the toxic activities of the total venom from *B. atrox* (Puerto Ayacucho–Amazonas State) and assess the neutralizing potential of the Venezuelan antivenom over these activities, using venom-antivenom previous incubation tests. The evaluated venom induced hemorrhagic, edema-forming, lethal, defibrinating, coagulating and indirect hemolytic activities, showing a similar toxinological profile to the one described for *B. atrox* species located at different places in South America, although showing some quantitative variations which could be related mainly to the biochemical variability and/or in the concentration of the constituents with toxic activity present in the

venom. During the evaluation of the antivenom, it was observed that this antivenom totally neutralized the following activities lethal, hemorrhagic, coagulating and defibrinating, however, it partially neutralized either edema-forming (63%) or indirect hemolytic (65%) activities, making evident that the Venezuelan antivenom has effective antibodies titles for the neutralization of toxic activities induced by the total venom of *B. atrox* from Puerto Ayacucho (Amazonas State).

**Key words:** *Bothrops atrox*, antivenom, neutralization, toxicological characterization.

## INTRODUCCIÓN

*Bothrops atrox* es reconocida por la Organización Mundial de la Salud (OMS) como una de las serpientes de Sur América, que comúnmente causa incapacidad física o muerte [37, 43]. En Venezuela, esta especie está restringida geográficamente a los bosques tropicales de los estados Bolívar, Amazonas y Delta Amacuro [24, 33] y de hecho, estudios epidemiológicos recientes indican a los estados Amazonas y Delta Amacuro como áreas epidemiológicas importantes, siendo incluso clasificados como regiones de muy alta endemicidad [9].

El envenenamiento por esta especie produce un cuadro fisiopatológico caracterizado por el desarrollo de edema, hemorragia, necrosis, incoagulabilidad sanguínea y hemólisis, aunque esta última solo se ha reportado en un porcentaje muy reducido de los pacientes (1%) [17]. Estos eventos dependen de la severidad del accidente y pueden llevar al desarrollo de complicaciones como falla cardíaca, edema de pulmón o insuficiencia renal aguda, lo cual hace necesario que la víctima reciba una pronta y muy efectiva atención médica [3, 12, 35].

Para el tratamiento de los envenenamientos ocasionados por esta especie, el único recurso terapéutico producido en Venezuela es el antiveneno polivalente desarrollado por el Centro de Biotecnología de la Facultad de Farmacia de la Universidad Central de Venezuela (UCV). Este antiveneno es elaborado a partir de una mezcla de veneno crudo de los géneros *Bothrops* y *Crotalus* y presenta, de acuerdo a los productores, un título de neutralización equivalente a 2 mg/mL de veneno *botrópico* y 1,5 mg/mL de veneno *crofálico*, título estimado sobre la neutralización de la letalidad de venenos empleados en su producción. Sin embargo, estudios previos han reportado que, la neutralización de la letalidad no garantiza la neutralización de otras actividades tóxicas inducidas por los venenos [13, 32], lo cual es consecuencia de la reconocida variabilidad bioquímica y/o en la concentración de los constituyentes de los venenos o por la presencia de venenos crudos con proteínas altamente antigénicas pero no tóxicas, factores que pueden diluir el título de anticuerpos de los antivenenos contra muchas toxinas clínicamente relevantes [13, 14, 21, 30, 32]. Con estas consideraciones, la OMS recomienda titular los antivenenos contra cada una de las actividades importantes presentes en los venenos [35, 43], evaluaciones que deben dirigirse contra

todas las principales poblaciones de serpientes de importancia médica, con especial énfasis en aquellas regiones con una alta incidencia de envenenamiento ofídico, de manera de garantizar el suministro de un producto efectivo que contribuya al mejoramiento del complejo cuadro clínico observado en estos accidentes [3, 17, 32, 43]. El objetivo del presente estudio fue caracterizar toxinológicamente el veneno de *Bothrops atrox* de Puerto Ayacucho (Edo. Amazonas), además de estudiar la neutralización de sus diferentes actividades tóxicas con el antiveneno venezolano.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Veneno

Se utilizó una mezcla de veneno cristalizado, obtenido a partir del ordeño manual de seis individuos adultos (3 machos y 3 hembras) de *Bothrops atrox* recolectados en la localidad de Puerto Ayacucho, municipio Antures (Comunidad Coromoto de Cuao) en el estado Amazonas y mantenidos en cautiverio en el serpentario de la Facultad de Farmacia de la UCV. Dicho veneno fue conservado en refrigeración a 4°C, en un desecador (Duran®, Mod. Tam, Alemania) al vacío con CaCl<sub>2</sub> hasta su evaluación.

### Antiveneno

Se empleó el antiveneno polivalente venezolano (Lote 120), disponible en presentación líquida. Este antiveneno está constituido por fragmentos F(ab')<sub>2</sub> de inmunoglobulinas, obtenidas por la inmunización de caballos (*Equus caballus*) con una mezcla de venenos de *B. colombiensis*, *B. venezuelensis*, *B. atrox* (El Paují-Edo. Bolívar), *C. durissus cumanensis* y *C. durissus ruruima*.

### 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.

### Determinación de la dosis letal cincuenta (DL<sub>50</sub>)

La DL<sub>50</sub> se determinó de acuerdo al método de Spearman-Kärber [43]. Alícuotas de 0,2 mL de soluciones del veneno conteniendo entre 16 y 800 µg/mL en NaCl al 0,85% fueron inyectadas por vía intraperitoneal a grupos de cuatro ratones por dosis, con pesos entre 18 y 20 g, luego de 48 h se registró el número de animales muertos por dosis evaluada.

### Determinación de la actividad hemorrágica

Alícuotas de 0,1 mL de soluciones del veneno conteniendo entre 25 y 200 µg/mL en NaCl al 0,85% fueron inyectadas por vía intradérmica en la región abdominal a grupos de

cuatro ratones por dosis, con pesos entre 22 y 24 g. 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 induce un área hemorrágica de 10 mm de diámetro [18].

#### **Determinación de la actividad edematizante**

Alícuotas de 50  $\mu$ L de soluciones del veneno conteniendo entre 5 y 160  $\mu$ g/mL en NaCl al 0,85% fueron inyectadas a grupos de cuatro ratones por dosis, con pesos entre 22 y 24 g, en la almohadilla plantar de una de sus extremidades traseras. La almohadilla plantar de la extremidad contra lateral, se inyectó con 50  $\mu$ L 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, Zurich). Los resultados se expresaron como dosis edematizante mínima (DEM) definida como la cantidad de veneno que induce un edema del 30% [18].

#### **Determinación de la actividad desfibrinante**

La actividad desfibrinante se estimó por la inducción de incoagulabilidad en la sangre de ratones, alícuotas de 0,2 mL de soluciones del veneno conteniendo entre 3 y 50  $\mu$ g/mL de NaCl al 0,85% fueron inyectadas por vía intravenosa a grupos de cuatro ratones por dosis, con pesos entre 22 y 24 g. Un grupo adicional de cuatro ratones se inyectó con 0,2 mL del vehículo y se empleó como control. Luego de una hora los animales se anestesiaron con éter y se extrajeron 200  $\mu$ L 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 en todos los animales tratados [18].

#### **Determinación de la actividad coagulante**

La actividad coagulante fue evaluada empleando plasma humano citratado (9:1) como sustrato, éste se distribuyó a razón de 0,2 mL en tubos de ensayo de plástico, se incubaron en baño María (Gallenkamp®, Model 2, London, Reino Unido) a 37°C. durante 3 minutos (min) y se adicionó 0,1 mL de soluciones del veneno conteniendo entre 6 y 100  $\mu$ g/mL en NaCl al 0,85% (4 tubos por tratamiento) y se midió el tiempo de coagulación del plasma con la ayuda de un cronómetro (Casio®, HS-5, Japón). Los resultados se expresaron como dosis coagulante mínima (DCM) definida como la menor cantidad de veneno que induce la coagulación del plasma en 1 min [18].

#### **Determinación de la actividad hemolítica indirecta**

La actividad hemolítica indirecta se evaluó empleando placas de agar-sangre-yema de huevo (1% agar, 0,1 mM  $\text{CaCl}_2$ , 0,33% de yema de huevo y 1,2% de eritrocitos), en las cuales se realizaron pozos de 3 mm de diámetro y se adicionaron 15  $\mu$ L de soluciones del veneno conteniendo entre 30 y 500  $\mu$ g/mL en NaCl al 0,85%. Las placas se incubaron en estufa (Thelco®, Model 2, EUA) a 37°C durante 24 h. y se midió el diámetro de los halos de hemólisis desarrollados. Los resultados se expresaron como dosis hemolítica indirecta mínima (DHIM), definida como la cantidad de veneno que induce un halo hemolítico de 20 mm de diámetro [18].

#### **Evaluación de la capacidad neutralizante del antiveneno**

Para la evaluación de la capacidad neutralizante del antiveneno se prepararon mezclas veneno/antiveneno, constituidas por una cantidad constante del veneno o dosis reto y diluciones seriadas del antiveneno de acuerdo al siguiente esquema:

- Neutralización de la actividad letal: 4DL50/33 a 168  $\mu$ L antiveneno
- Neutralización de la actividad hemorrágica: 10DHM/1,5 a 50  $\mu$ L antiveneno
- Neutralización de la actividad edematizante: 6DEM/2 a 7  $\mu$ L antiveneno
- Neutralización de la actividad desfibrinante: 2DDM/1 a 10  $\mu$ L antiveneno
- Neutralización de la actividad coagulante: 2DCM/1 a 4  $\mu$ L antiveneno
- Neutralización de la actividad Hemolítica Indirecta: 1DHIM/0,19 a 6 $\mu$ L antiveneno

Las mezclas veneno/antiveneno y los controles constituidos por veneno (dosis reto), antiveneno y vehículo, se incubaron en baño María (Gallenkamp®, Model 2, London, Reino Unido) a 37°C durante 30 min. y se centrifugaron a 1240 g durante 10 min. (Centrífuga Sorval®, GLC-1, China). Los sobrenadante obtenidos fueron evaluados, para determinar si había efecto residual de toxicidad del veneno, en los sistemas experimentales empleados en la caracterización del veneno y referidos previamente. Los resultados para la neutralización de las actividades letal, hemorrágica, edematizante y hemolítica indirecta se expresaron como dosis efectiva cincuenta ( $DE_{50}$ ), definida como el volumen de antiveneno que neutraliza en 50% el efecto desarrollado por el control de veneno [18, 43]. En el caso de la neutralización de las actividades desfibrinante y coagulante, los resultados se expresaron como dosis efectiva (DE) definida para la actividad desfibrinante como el menor volumen de antiveneno que neutralizó el efecto desfibrinante en todos los animales tratados y para el efecto coagulante como aquella dosis que triplica el tiempo de coagulación del plasma al que se agregó veneno solo (dosis reto) [18].

### Análisis estadístico

Para la determinaci6n de la dosis hemorrágica, edematizante, hemolítica indirecta, coagulante y la neutralizaci6n de éstas, se construyeron gráficas dosis-respuesta, a partir de las cuales se calculó la ecuaci6n de la recta y los valores de "r<sup>2</sup>", considerándose regresiones significativas a un intervalo de confianza del 95% (P<0,05). Los resultados se estimaron a partir de la ecuaci6n de la recta y se expresaron como la media aritmética ± la desviaci6n estándar de tres evaluaciones independientes, empleando estadística descriptiva.

### RESULTADOS Y DISCUSI6N

En Venezuela, el accidente por mordedura de serpiente constituye un problema salud pública, expertos señalan una incidencia de 7000 accidentes al ańo, con una mortalidad entre 0,1 y 0,2 fallecidos por cada 100.000 habitantes [14], siendo una de las regiones más afectadas el estado Amazonas [9], área geográfica donde predomina la especie *Bothrops atrox* [14]. Estudios epidemiológicos señalan que el género *Bothrops* es responsable de un 70 a 80% de los casos reportados [9, 35] e induce un cuadro clínico que se caracteriza por el desarrollo de edema, necrosis, coagulopatías y hemorragias locales y sistémicas, que en los casos más graves pueden conducir a la incapacidad física o a la muerte de la víctima [9, 14, 35]. Estos aspectos, elevada incidencia y severidad del accidente, hacen necesario identificar y caracterizar bioquímica y fisiopatológicamente los venenos de importancia médica, así como incrementar los controles de calidad sobre los antivenenos, de manera de garantizar una mejor atenci6n clínica y terapéutica a las víctimas del accidente ofídico [9, 14].

La caracterizaci6n del veneno de *B. atrox* de Puerto Ayacucho evidenció que, éste indujo actividades letal, hemorrágica, desfibrinante, edematizante, coagulante *in vitro* y hemolítica indirecta (TABLA I). Estos resultados demuestran un perfil toxinol6gico similar al descrito para esta especie en Sur América, aunque con algunas variaciones cuantitativas (TABLA II), entre estas: el veneno objeto de este estudio es más edematizante y hemorrágico que el veneno de especímenes del Perú [20, 36], más desfibrinante que algunos homólogos de Brasil y Perú [11], más hemolítico que el veneno de especímenes de Brasil y algunos de Colombia [26, 40] y menos procoagulante que sus homólogos de Brasil, Colombia y Perú [4, 5, 11, 29, 36, 40], pero con un índice de letalidad dentro de lo usualmente reportado para esta especie [11, 26, 31, 34, 36, 39, 40, 41]. Sin embargo, al comparar con estudios recientes de letalidad y hemorragia, para venenos de *B. atrox* procedentes de Serranía del Cuao (Edo. Amazonas) y Parguasa (Edo. Bolívar) en Venezuela, se aprecia una mayor letalidad para el veneno objeto de este estudio y una menor capacidad hemorrágica sólo en comparaci6n con su homólogo del estado Bolívar [34, 41]. Estas diferencias cuantitativas pudieran relacionarse, además de la implícita variaci6n experimental, con la

TABLA I  
PERFIL TOXINOL6GICO DEL VENENO TOTAL  
DE *Bothrops atrox* DE PUERTO AYACUCHO  
(EDO. AMAZONAS)

Actividad Biológica	Dosis Veneno
Letalidad (DL <sub>50</sub> )	3,07 ± 0,52 mg/kg
Hemorrágica (DDM)	5,28 ± 0,37 µg
Edematizante (DEM)	0,84 ± 0,16 µg
Desfibrinante (DDM)	5 µg
Coagulante (DCM)	7,66 ± 0,48 µg
Hemolítica Indirecta (DHIM)	2,75 ± 0,36 µg

DL<sub>50</sub>: dosis letal cincuenta vía IP. DHM: dosis hemorrágica mínima. DEM: dosis edematizante mínima. DDM: dosis desfibrinante mínima. DCM: dosis coagulante mínima. DHIM: dosis hemolítica indirecta mínima.

variabilidad bioquímica y/o en la concentraci6n de los constituyentes tóxicos presentes en los venenos, de acuerdo a sus características ontogénicas y de localizaci6n geográfica [1, 7, 20, 29, 31, 34, 40]. Esta variabilidad en los venenos limita la capacidad neutralizante de los antivenenos y hace necesaria la inclusi6n de venenos antigénicamente representativos en la preparaci6n de los inóculos, de manera de cubrir la diversidad de espectros de constituyentes tóxicos presentes en ellos [14, 21, 22, 39], así mismo determina como aspecto prioritario la necesidad de investigaci6n sobre el potencial tóxico de las especies de importancia médica y la capacidad neutralizante de la inmunoterapia disponible con especial énfasis contra aquellas especies no incluidas en los inóculos [4, 7, 9, 14, 28, 43].

En la evaluaci6n del antiveneno venezolano, los resultados obtenidos indican que éste fue totalmente efectivo en la neutralizaci6n de las actividades letal, hemorrágica, desfibrinante y coagulante del veneno de *B. atrox*, mientras que las actividades edematizante y hemolítica indirecta fueron neutralizadas en un 63 y 65%, respectivamente (TABLA III).

La óptima neutralizaci6n de las actividades letal, hemorrágica, desfibrinante y coagulante coincide con lo reportado en estudios previos, los cuales señalan que estas actividades suelen ser efectivamente neutralizadas por los antivenenos [16, 28, 30] y sugiere un elevado título de anticuerpos contra las toxinas responsables de estas actividades, lo cual pudiera ser consecuencia de la elevada antigenicidad de las toxinas responsables, potencial conferido por su elevada masa molecular, como es el caso de las metaloproteasas con una masa entre 20-100 KDa (enzimas con actividades hemorrágica, fibrinogenolítica, fibrinolítica, activadoras de protrombina y del factor X de la coagulaci6n, inhibidoras de la agregaci6n plaquetaria) [8, 21, 23, 38], las serino proteasas con un rango entre 26-67 KDa (inductoras de la agregaci6n plaquetaria, activadoras de los factores X, XII, V, II de la coagulaci6n, fibrinogenolíticas y fibrinolíticas) [21, 38] o las L-amino ácido oxidasas con una masa molecular de 100-150 KDa (influyen la agregaci6n plaquetaria e inducen hemorragia) [21, 27, 38],



**TABLA II**  
**COMPARACIÓN TOXINOLÓGICA DEL VENENO DE *Bothrops atrox* DE PUERTO AYACUCHO (EDO. AMAZONAS)**  
**CON VENENOS DE LA MISMA ESPECIE DE OTRAS LOCALIDADES DE VENEZUELA Y SUR AMÉRICA**

DL <sub>50</sub> (IP) (mg/kg)	DHM (µg/ratón)	DEM (µg/ratón)	DDM (µg/ratón)	DCM (µg)	DHIM (µg)	Procedencia del veneno
5,60	2,9	1,2	10	DM	NE	Brasil [20]
4,95	0,74	NE	NE	NE	15**	Brasil [25]
NE	NE	NE	NE	2,3	NE	Brasil [40]
2,72 ± 4,28	0,3-1,8	DM	NE	1-2,5	17,3-19,9**	Colombia [26]
3,05-3,42	1,7-4,3	DM	1,6-1,9	NE	3,2-9**	Colombia [34]
3,89	2,4 ± 0,3	1,1 ± 0,2	5	0,3	3,1 ± 0,04**	Colombia [41]
3,55	6,45 ± 0,43	2,95 ± 1,11	2,5	3,65 ± 0,02	NE	Perú [36]
NE	7,20	NE	NE	NE	NE	Perú [20]
2,79-3,96	4,10 ± 0,64	NE	8	4,5 ± 0,60	NE	Perú [11]
NE	NE	NE	NE	2,1-2,7	NE	Perú [4]
4	2,7 ± 0,4	NE	NE	NE	NE	Venezuela (Parguasa) [34, 41]
8,3	4,02 ± 0,50	NE	NE	NE	NE	Venezuela (Serranía del Cuao) [34, 41]
3,07 ± 0,52	5,28 ± 0,37	0,84 ± 0,16	5	7,66 ± 0,48	2,75 ± 0,36*	Venezuela (Este estudio)

DL<sub>50</sub>: dosis letal cincuenta, vía IP. DHM: dosis hemorrágica mínima. DEM: dosis edematizante mínima. DDM: dosis desfibrinante mínima. DCM: dosis coagulante mínima. DHIM: dosis hemolítica indirecta mínima. NE: no evaluado. DM: diferente metodología. \*24/\*\*20 horas de incubación a 37°C.

**TABLA III**  
**NEUTRALIZACIÓN DE LAS ACTIVIDADES TÓXICAS**  
**DEL VENENO DE *Bothrops atrox* DE PUERTO AYACUCHO**  
**(EDO. AMAZONAS) POR EL ANTIVENENO POLIVALENTE**  
**VENEZOLANO**

Actividad Neutralizada	Dosis Reto	Dosis Antiveneno
Letalidad	304 µg	1/3224 ± 389 mL/µg †
Hemorrágica	50 µg	5,77 ± 1,10 µL*
Edematizante	4,8 µg	5,44 ± 1,08 µL*
Desfibrinante	10 µg	5 µL°
Coagulante	16 µg	2,32 ± 0,29 µL‡
Hemolítica Indirecta	3 µg	3,90 ± 0,18 µL*

†DE<sub>50</sub>: µg de veneno neutralizado por un mL de antiveneno. \*DE<sub>50</sub>: µL de antiveneno que neutralizó el 50% del efecto inducido por el control de veneno. °DE: µL de antiveneno que neutralizó el efecto desfibrinante del veneno. ‡DE: µL de antiveneno que prolongó tres veces el tiempo de coagulación obtenido para el control de veneno. (DE<sub>50</sub>: Dosis efectiva cincuenta. DE: Dosis efectiva.)

entre otras. Por otra parte, no se debe descartar la posible reactividad inmunológica cruzada, ya que estudios previos con venenos bothrópicos (*B. atrox*, *B. cotiara*, *B. alternatus*, *B. erythromelas*, *B. jararaca*, *B. jararacussu*, *B. moojeni*, *B. neuwiedi*, *B. pradoi* y *B. brazili*), empleando técnicas de Western Blot y antivenenos especie específica, han evidenciado que antígenos con una masa molecular sobre los 20/30 KDa muestran en general alta reactividad cruzada [25, 42].

La efectiva neutralización de las actividades hemorrágica, desfibrinante y coagulante *in vitro*, es un hallazgo de relevancia clínica, ya que verifica la presencia de un elevado título de anticuerpos contra los constituyentes del veneno responsables del inicio y mantenimiento de hemorragias locales y/o sistémicas, responsables de afectar órganos esenciales (pulmón, corazón, riñón), inducir choque, potenciar el edema y la necrosis de los tejidos, aspectos clínicos relacionados a los síntomas clásicos del accidente bothrópico severo [35].

La menor neutralización de los efectos edematizante y hemolítico indirecto, sugiere un menor título de anticuerpos contra los constituyentes del veneno responsables por estos efectos y refleja una situación contraria a lo esperado, ya que las enzimas principalmente implicadas las fosfolipasas A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>), tienen una masa molecular estimada entre 14-18 KDa por lo que deberían inducir una efectiva respuesta antigénica en los caballos [38, 42]. Sin embargo esta menor neutralización coincide con lo reportado en estudios previos, los cuales refieren que antígenos en venenos bothrópicos (*B. alternatus*, *B. atrox*, *B. cotiara*, *B. erythromelas*, *B. jararaca*, *B. jararacussu*, *B. moojeni*, *B. neuwiedi* y *B. pradoi*) con una masa entre 14-18 KDa presentan escasa reactividad cruzada [25], así como con estudios proteómicos recientes en los que tras evaluar la neutralización de venenos de especímenes de *B. atrox* de Colombia, Brasil, Perú, Ecuador y Venezuela con antivenenos comerciales de Brasil, Costa Rica y Venezuela se refirió que estas enzimas son escasamente reconocidas por los antivenenos, sugiriendo un elevado polimorfismo para este grupo enzimático [6, 28]. Aunque en el caso particular de la neutralización parcial de la actividad edematizante, no se debería descartar la presencia de toxinas edematizantes con una masa molecular tan baja que no promuevan una efectiva respuesta inmune en los caballos [21], como se ha evidenciado en el veneno de *C. durissus durissus*, en el cual se han identificado constituyentes menores de 6 KDa capaces de inducir edema [2]. Adicionalmente la limitada neutralización de esta actividad, motiva a proponer la necesidad de caracterizar farmacológica e inmunológicamente el edema mediado por el veneno evaluado, de manera de mejorar la terapia antiofídica existente o proponer agentes que permitan complementar la acción del antiveneno, lo cual es clínicamente relevante cuando se consideran los intervalos de tiempo para la administración del antiveneno en casos reales de envenenamiento y los efectos fisiopatológicos derivados, como el incremento del riesgo de desarrollo de necrosis local [10, 12, 13].

En el caso de la menor neutralización de la actividad hemolítica indirecta, este resultado podría considerarse de menor relevancia clínica, principalmente por la baja incidencia de este efecto *in vivo* el cual de acuerdo a algunos estudios epidemiológicos es de tan sólo un 1% [17]. Adicionalmente es necesario resaltar, que aunque las PLA<sub>2</sub> son consideradas uno de los constituyentes más tóxicos de los venenos y se relacionen con el desarrollo de necrosis, edema, alteraciones en la coagulación, entre otros efectos [15, 17, 19, 27] estudios previos sugieren que varias de estas actividades son dirigidas por dominios diferentes de estas enzimas [15, 19, 27], por lo que los resultados obtenidos en la neutralización de esta actividad no deben ser extrapolados a la neutralización de otros efectos mediados por estas enzimas, como la neutralización de la actividad necrosante la cual no pudo ser evaluada en este estudio.

## CONCLUSIONES

El veneno de *Bothrops atrox* (Pto. Ayacucho, Edo. Amazonas) indujo un perfil toxinológico similar al de sus homólogos suramericanos, con algunas variaciones cuantitativas posiblemente dependientes de la variabilidad intra-especie. El antiveneno polivalente venezolano contiene un título de anticuerpos teóricamente adecuado para ser empleado en la neutralización de las actividades inducidas por este veneno, aunque la evidencia de una menor neutralización de la actividad edematizante hace necesario caracterizar bioquímica, fisiopatológica e inmunológicamente los factores responsables, para mejorar la terapia antiofídica existente y proponer agentes terapéuticos que permitan complementar la acción del antiveneno.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] 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.
- [2] BARBOSA, A.; DO AMARAL, R.; TEIXEIRA, C.; HYSLOP, S.; COGO, J. Pharmacological characterization of mouse hind paw oedema induced by *Bothrops insularis* (jararaca ilhoa) snake venom. **Toxicon**. 42: 515-523. 2003.
- [3] BOECHAT, A.; PAIVA, C.; FRANCA, F.; DOS-SANTOS, M. Heparin-antivenom association: differential neutralization effectiveness in *Bothrops atrox* and *Bothrops erythromelas* envenoming. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**. 43 (1): 7-14. 2001.
- [4] BOGARIN, G.; MORAIS, J.; KAZUKO, I.; STEPHANO, M.; MARCELINO, J.; KEIKO, A.; GUIDOLIN, R.; ROJAS, G.; GONDO, H.; GUTIÉRREZ, J. M. Neutralization of crotaline snake venoms from Central and South America by antivenoms produced in Brazil and Costa Rica. **Toxicon**. 38: 1429-1441. 2000.
- [5] BOGARIN, G.; ROMERO, M.; ROJAS, G.; LUTSCH, C.; CASADEMONT, M.; LANG, R.; GUTIÉRREZ, J.M. 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. M.; LOMONTE, B.; ANGULO, Y.; GUTIÉRREZ, J. M.; CHALKIDIS, H.; MOURÃO, R.; FURTADO, M.; MOURA DA SILVA, A. M. 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] CINTRA, A.; DE TONI, L.; SARTIM, M.; FRANCO, J.; CAETANO, R.; MURAKAMI, M.; SAMPAIO, S. Batroxase, a new metalloproteinase from *B. atrox* snake venom with strong fibrinolytic activity. **Toxicon**. 60 70–82. 2012.
- [9] 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.
- [10] FERREIRA, M.; MOURA, A.; MOTA, I. Neutralization of different activities of venoms from nine species of *Bothrops* snakes by *Bothrops jararaca* antivenom. **Toxicon**. 30: 1591-1602. 1992.
- [11] GARCÍA, P.; YARLEQUÉ, A.; BONILLA, C.; PESSAH, S. Características bioquímicas y evaluación preclínica de un antiveneno botrópico liofilizado contra el veneno de la serpiente *Bothrops atrox*. **Rev. Peru Med. Exp. Salud Púb.** 25(4): 386-90. 2008.
- [12] 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.
- [13] GUTIÉRREZ, J.M.; 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.
- [14] GUTIÉRREZ, J.M; LEÓN, G.; LOMONTE, B.; ANGULO, Y. Antivenoms for snakebite envenomings. **Inflam. Allergy Drug Targets**. 10 (5): 369-380. 2011.
- [15] GUTIÉRREZ, J. M.; LOMONTE, B. Phospholipases A<sub>2</sub>: Unveiling the secrets of a functionally versatile group of snake venom toxins. **Toxicon**. 62: 27–39. 2013.
- [16] GUTIÉRREZ, J.; LEÓN, G.; ROJAS, G.; LOMONTE, B.; RUCAVADO, A.; CHAVES, F. Neutralization of local tissue damage induced by *Bothrops asper* (Terciopelo) snake venom. **Toxicon**. 36: 1529-1538. 1998.
- [17] HAAD, J. Accidentes humanos por las serpientes de los géneros *Bothrops* y *Lachesis*. **Mem. Inst. Butantan**. 44/45: 403-423. 1980/1981.
- [18] 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.
- [19] KANASHIRO, M.; ESCOCARD, R.; PETRETSKI, J.; PRATES, M.; ALVES, E.; MACHADO, O.; DIAS, W.; KIPNIS, T. Biochemical and biological properties of phospholipases A<sub>2</sub> from *Bothrops atrox* snake venom. **Biochem. Pharmacol**. 64 (7): 1179-1186. 2002.
- [20] LAING, G.; YARLEQUE, A.; MARCELO, A.; RODRIGUEZ, E.; WARRELL, D.; THEAKSTON, R. Pre-clinical testing of three South American antivenoms against the venoms of five medically-important Peruvian snake venoms. **Toxicon**. 44: 103-106. 2004.
- [21] LEÓN, G.; SÁNCHEZ, L.; HERNÁNDEZ, A.; VILLALTA, M.; HERRERA, M.; SEGURA, A.; ESTRADA, R.; GUTIÉRREZ, J. M. Immune response towards snake venoms. **Inflam. Allergy Drug Targets**. 10(5): 1-18. 2011.
- [22] LOMONTE, B. Venenos de serpiente: de la investigación al tratamiento. **Acta Méd. Costarric**. 54 (2): 86-96. 2012.
- [23] MARKLAND, F.; SWENSON, S. Snake venom metalloproteinases. **Toxicon**. 62: 3–18. 2013.
- [24] MOLINA, C.; SEÑARIS, C.; RIVAS, G. Los reptiles del Delta del Orinoco, Venezuela. **Memoria de la Fundación La Salle de Ciencias Naturales**. 159-160: 235-264. 2004.
- [25] MOURA, A.; IMPERIO, M.; NISHIKAWA, A.; BRODSKYN, C.; DOS SANTOS, M.; FURTADO, M.; DIAS, W.; MOTA, I. Antigenic cross-reactivity of venoms obtained from snakes of genus *Bothrops*. **Toxicon**. 28 (2): 181-188. 1990.
- [26] MUNIS, E.; WANY, M.; ESTEVÃO-ACOSTA, M.; BUHRNHEIM, O.; CHÁVEZ-OLÓRTEGUI, C. Neutralizing potency of horse antithrotopropic Brazilian antivenom against *Bothrops* snake venom from the Amazonian rain forest. **Toxicon**. 38: 1859-1863. 2000.
- [27] NGET-HONG, T.; SHIN-YEE, F. Snake Venom L-amino acid oxidases and their potential biomedical applications. **Malaysian J. Biochem. Molec. Biol**. 16 (1): 1-10. 2008.
- [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] ORTIZ, C.; LAZO, F.; BELLIDO, C.; GONZALES, E.; YARLEQUÉ, A. Variaciones en las actividades enzimáticas del veneno de la serpiente *Bothrops atrox* "Jergón", de tres zonas geográficas del Perú. **Rev. Perú Med. Exp. Salud Pub.** 29 (2):198-205. 2012.
- [30] OTERO, R.; NÚÑEZ, V.; OSORIO, R.; GUTIÉRREZ, J.M.; GIRALDO, C.; POSADA, L. Ability of six latin american antivenoms to neutralize the venom of Mapana equis (*Bothrops atrox*) from Antioquia y Chocó (Colombia). **Toxicon.** 33: 809-815. 1995.
- [31] OTERO, R.; NÚÑEZ, V.; OSORIO, R.; VALDERRAMA, R.; GIRALDO, C. Efectos farmacológicos y enzimáticos de los venenos de serpientes de Antioquia y Choco (Colombia). **Toxicon.** 30: 611-620. 1992.
- [32] QUEIROZ, G.; PESSOA, L.; PORTARO, F.; FURTADO, M.; TAMBOURGI, D. Interspecific variation in venom composition and toxicity of Brazilian snakes from *Bothrops* genus. **Toxicon.** 52: 842-851. 2008.
- [33] RIVAS, G.; MOLINA, C.; UGUETO, G.; BARROS, T.; BARRIOS-AMORÓ, C.; KOK, P. Reptiles of Venezuela: an up dated and commented checklist. 2012. ZOOTAXA. Magnolia Press. Anckland, Nueva Zelanda. On line: [http://www.academia.edu/1459595/Reptiles\\_of\\_Venezuela\\_an\\_up\\_dated\\_and\\_commented\\_checklist](http://www.academia.edu/1459595/Reptiles_of_Venezuela_an_up_dated_and_commented_checklist). 13/05/2013.
- [34] RODRÍGUEZ-ACOSTA, A.; SÁNCHEZ, E.; MÁRQUEZ, A.; CARVAJAL, Z.; SALAZAR, A.; 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.
- [35] 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.
- [36] ROJAS, E.; QUESADA, L.; ARCE, V.; LOMONTE, B., ROJAS, G.; GUTIÉRREZ, J. M. Neutralization of four Peruvian *Bothrops* sp. snake venoms by polyvalent antivenoms produced in Perú and Costa Rica: preclinical assessment. **Acta Tróp.** 93: 85-95. 2005.
- [37] ROJAS, R.; RAMÍREZ, R.; COBOS, M.; CASTRO, J. Análisis electroforético de proteínas del veneno de *Bothrops atrox* "jergón" (Ofidia: Viperidae) de distintas zonas geográficas de la Amazonia Peruana. **ECIPERÚ.** 8 (2): 226-229. 2011.
- [38] SAJEVIC, T.; LEONARDI, A.; KRIZAJ, I. Haemostatically active proteins in snake venoms. **Toxicon.** 57: 627-645. 2011.
- [39] 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.
- [40] SALDARRIAGA, 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.
- [41] SALAZAR, A.; RODRÍGUEZ-ACOSTA, A.; GIRÓN, M.; AGUILAR, I.; GUERRERO, B. A comparative analysis of the clotting and fibrinolytic activities of the snake venom (*Bothrops atrox*) from different geographical áreas in Venezuela. **Thrombosis Res.** 120: 95-104. 2007.
- [42] SANDOVAL, G.; MENDOZA, J.; ROLDÁN, W.; ESPINOZA, Y.; SOLIS, H.; YARLEQUÉ, A. Inmunogenicidad del veneno de *Bothrops atrox* (Ophidia: Viperidae) y su evaluación por métodos inmunoenzimáticos. **Rev. Perú. Biol.** 18 (3): 335-341. 2011.
- [43] WORLD HEALTH ORGANIZATION. Guidelines for the production, control and regulation of antivenom immunoglobulins. 2010. WHO. Geneva. On line: [www.who.int/bloodproducts/snakeantivenoms](http://www.who.int/bloodproducts/snakeantivenoms). 13/05/2013.