

## Caracterización toxinológica del veneno de *Bothrops sanctaecrucis*

K. Lobo-López<sup>1,2\*</sup>, M.E. Martínez<sup>2</sup>, M. Gritti<sup>2</sup> y M.E. Peichoto<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Universidad Católica Boliviana San Pablo (UCB). Santa Cruz de la Sierra. Bolivia

<sup>2</sup>Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Instituto Nacional de Medicina Tropical (INMeT)-ANLIS “Dr. Carlos G Malbrán”. Puerto Iguazú. Misiones. Argentina.

\**kevin.lope@ucb.edu.bo*

**Palabras clave:** Antiveneno, Ofidismo, Proteasas, Viperidae.

### INTRODUCCIÓN

El ofidismo en Bolivia se encuentra muy poco estudiado. La poca información disponible evidencia que estos casos se presentan principalmente en zonas rurales (Chippaux y Postigo, 2014). Sin embargo, no se conoce el género/especie mayoritariamente responsable de tales casos. Debido a que la mayoría de los accidentes ofídicos en Sudamérica son causados por el género *Bothrops*, de la familia Viperidae (Sant’Ana Malaque y Gutiérrez, 2015), es probable que este género sea uno de los principales responsables de los accidentes ofídicos en Bolivia. *Bothrops sanctaecrucis* es la única serpiente de su género endémica de Bolivia, pero es escasa la información existente sobre ella, tanto en lo que se refiere a sus límites de distribución, su veneno y sobre el cuadro clínico del envenenamiento causado en las víctimas de su mordedura (Gómez-Murillo et al., 2020). Si bien su estado de conservación ha sido evaluado por entidades internacionales, el libro rojo de la fauna silvestre de Bolivia la clasifica como “casi en peligro” debido a que las personas suelen cazarla por miedo y compulsión. Añadiendo a este conflicto está el hecho de que, en el único estudio sobre accidentes ofídicos que menciona esta especie, se determinó que es la que se encuentra con mayor frecuencia y la principal causante de mordeduras en el Chapare,

una zona rural del departamento de Cochabamba (Nieto-Ariza et al., 2022). Considerando que el estudio del veneno de *B. sanctaecrucis* puede ayudar a vislumbrar su real importancia sanitaria en Bolivia, en este trabajo se realizó una caracterización de su contenido proteico y actividades enzimáticas como una primera aproximación toxinológica de esta secreción glandular. Asimismo, se evaluó su inmunorreactividad cruzada con antivenenos botrópicos (bivalente y tetravalente) disponibles en Argentina.

### MATERIALES Y MÉTODOS

**Veneno:** Un pool de veneno fue obtenido a partir de 3 ejemplares adultos de *B. sanctaecrucis* mantenidos en cautiverio en el Zoológico Municipal de Fauna Sudamericana Noel Kempff Mercado y el serpentario privado de “Potrerillo del Güendá.”

**Perfil electroforético:** Se determinó mediante SDS-PAGE siguiendo el método de Laemmli (1970). Los geles fueron teñidos tal como descrito por Blum et al. (1987).

**Actividad proteolítica:** Se evaluó la actividad del veneno sobre los siguientes sustratos: caseína mediante un método previamente descrito (Wang y Huang, 2002), colágeno mediante un ensayo zimográfico (Barbaro et al., 2005), sustrato



MEC3F  
2024

específico de trombina (S-2238) siguiendo el método de Antunes et al. (2010), fibrinógeno y fibrina tal como descrito en una metodología previa (Peichoto et al., 2007; Quintana et al., 2017).

**Actividad fosfolipasa A<sub>2</sub>:** Se evaluó la presencia de este tipo de enzimas mediante un ensayo de hemólisis radial (Gutiérrez et al., 1988) seguido de un ensayo zimográfico (Campos et al., 2012).

**Actividad hialuronidasa:** Fue evaluada tal como descrita por Antunes et al. (2010).

**Inmunoreactividad cruzada:** Se evaluó mediante la técnica de *western blotting* utilizando antivenenos botrópicos bivalente y tetravalente disponibles en Argentina (Antunes et al., 2010).

**Actividad coagulante y su neutralización con antivenenos botrópicos de Argentina:** Se usó el ensayo de recalcificación de plasma humano de acuerdo a una metodología descrita previamente (Chanhome et al., 2022).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

**Perfil proteico del veneno:** Se denotó una distribución de bandas mayoritariamente en el rango de ~20 a 75 kDa. La banda de mayor intensidad, con una masa cercana a 20 kDa (correspondiente a un 55% en el ensayo densitométrico aproximadamente), es probablemente una metaloproteinasa de clase P-I. También se observaron bandas en el rango de las metaloproteinasas de la clase P-II y P-III, aunque estas últimas fueron de menor intensidad. En SDS-PAGE-Tricina se obtuvo un patrón de bandas similares, pero con una mejor resolución para las bandas  $\leq 15$  kDa, específicamente compatibles con masas moleculares de PLA<sub>2</sub>, desintegrinas y miotoxinas-no-PLA<sub>2</sub>.

**Actividad proteolítica:** La actividad específica sobre caseína fue de 47,65 U/mg, muy superior a la reportada para otros venenos botrópicos, como por ejemplo el de *B. jararaca* con un valor de 0,51 U/mg (Antunes et al., 2010). La actividad

específica sobre el sustrato S-2238 fue de 625,55  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ , considerablemente mayor a aquellas reportadas para venenos individuales de *B. jararaca* (Menezes et al., 2006). Por zimografía se detectó una banda con actividad gelatinolítica a ~28,5 kDa, correspondiente al rango de masas de las metaloproteinasas de tipo P-II. El veneno fue también capaz de degradar tanto al fibrinógeno como a la fibrina, observándose en el primer caso la degradación de la cadena A $\alpha$  a partir de los 5 min y de la cadena B $\beta$  a partir de los 30 min. En el caso de fibrina se observó principalmente la degradación del monómero  $\beta$  a partir de los 30 min de incubación con el veneno.

**Actividad fosfolipasa A<sub>2</sub>:** Mediante hemólisis radial indirecta se pudieron observar halos hemolíticos, cuyos diámetros fueron dependientes de la dosis de veneno aplicada en cada pocillo del agar. Por zimografía se constató una banda hidrolítica entre 8,5 y 12 kDa con menor actividad que el control positivo (veneno de *B. diporus*).

**Actividad hialuronidasa:** Se comprobó la dependencia de esta actividad con el tiempo de incubación y la dosis de veneno usada en el ensayo, obteniéndose una baja actividad específica (0,443  $\mu\text{g}/\text{min}/\text{mg}$ ), lo cual estaría indicando una baja capacidad de dispersión de las toxinas del veneno en los tejidos de la víctima.

**Inmunoreactividad cruzada:** la mayoría de las bandas más intensas observadas en el perfil electroforético del veneno de *B. sanctaecrucis* fueron identificadas tanto por el antiveneno tetravalente y bivalente, con la excepción de una banda en el rango de las metaloproteinasas-PI (~25 kDa). La cual fue la principal diferencia entre ambos antivenenos al exhibir una mayor intensidad con el antiveneno tetravalente que con el bivalente.

**Actividad coagulante y su neutralización con antivenenos botrópicos de Argentina:** El veneno de *B. sanctaecrucis* exhibió una dosis mínima coagulante de 26 ng. En el ensayo de neutralización se obtuvieron dosis efectivas de 15,1 nL y 30,7 nL para los antivenenos tetravalente y bivalente,



MEC3F  
2024

respectivamente. Esto sugiere que el antiveneno tetravalente fue elaborado utilizando venenos de mayor similitud al de *B. sanctaerucis*.

## CONCLUSIONES

El veneno de *B. sanctaerucis* está constituido por enzimas hemotóxicas y/o que degradan componentes del tejido conectivo. Presenta reactividad immunoquímica cruzada con los dos antivenenos botrópicos producidos por el INPB-ANLIS Malbrán de Argentina. Ambos antivenenos son capaces de neutralizar una de sus principales acciones tóxicas. Estos hallazgos proporcionan una guía para el abordaje clínico en caso de envenenamiento por esta especie.

## AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue realizado en el marco del proyecto de tesina en Ingeniería en Biotecnología (UCB) de K. Lobo-López. Un especial agradecimiento al Zoológico Municipal de Fauna Sudamericana Noel Kempff Mercado de Bolivia y a las fuentes de financiamiento para este proyecto: INMeT-ANLIS Malbrán, CONICET (PIP 11220200102782CO), y la Agencia I+D+i (PICT-2020-SERIEA-02027) de Argentina.

## BIBLIOGRAFÍA

- Antunes, T. C., Yamashita, K. M., Barbaro, K. C., Saiki, M. & Santoro, M. L. (2010). Comparative analysis of newborn and adult *Bothrops jararaca* snake venoms. *Toxicon*, 56(8), 1443–1458. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2010.08.011>
- Barbaro, K. C., Knysak, I., Martins, R., Hogan, C. & Winkel, K. (2005). Enzymatic characterization, antigenic cross-reactivity and neutralization of dermonecrotic activity of five *Loxosceles spider* venoms of medical importance in the Americas. *Toxicon*, 45(4), 489–499. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2004.12.009>
- Blum, H., Beier, H. & Gross, H. J. (1987). Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. In *Electrophoresis* (Vol. 8).
- Campos, L. B., Pucca, M. B., Roncolato, E. C., Netto, J. C. & Barbosa, J. E. (2012). Analysis of Phospholipase A2, L-Amino Acid Oxidase, and Proteinase Enzymatic Activities of the *Lachesis muta rhombeata* Venom. In *J BIOCHEM MOLECULAR TOXICOLOGY* (Vol. 00, Issue 0). Wiley Periodicals, Inc.
- Chanhome, L., Khaw, O., Reamtong, O., Vasaruchapong, T., Laoungbua, P., Tawan, T., Suntrarachun, S., Sitprija, S., Kumkate, S. & Chaiyabutr, N. (2022). Biochemical and proteomic analyses of venom from a new pit viper, *Protobothrops kelomohy*. *Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases*, 28. <https://doi.org/10.1590/1678-9199-JVATITD-2021-0080>
- Chippaux, J. P. & Postigo, J. R. (2014). Appraisal of snakebite incidence and mortality in Bolivia. *Toxicon*, 84, 28–35. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2014.03.007>
- Gómez-Murillo, P., Arellano-Martín, I. & García-Antón, P. (2020). Registro adicional de *Bothrops sanctaerucis* (Serpentes: Viperidae) en la provincia Chapare, Bolivia. *Boletín de La Asociación Herpetológica Española*, 31(1). <http://www.reptile-database.org>
- Gutiérrez, J. M., Avila, C., Rojas, E. & Cerdas, L. (1988). An alternative in vitro method for testing the potency of the polyvalent antivenom produced in Costa Rica. *Toxicon*, 26(4), 411–413. [https://doi.org/10.1016/0041-0101\(88\)90010-4](https://doi.org/10.1016/0041-0101(88)90010-4)



MEC3F  
2024

- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259), 680–685.
- Menezes, M. C., Furtado, M. F., Travaglia-Cardoso, S. R., Camargo, A. C. M. & Serrano, S. M. T. (2006). Sex-based individual variation of snake venom proteome among eighteen *Bothrops jararaca* siblings. *Toxicon*, 47(3), 304–312. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2005.11.007>
- Nieto-Ariza, B., León, R. & Huber Villca-Corani, &. (2022). Conflicto entre personas y serpientes en la Amazonía Boliviana: educando para la convivencia a través del Proyecto Pucarara. *Boletín Chileno de Herpetología*, 9, 24–28. <http://www.boletindeherpetologia.com/uploads/3/2/2/9/32291217/4.nietoarizaetal2022-.pdf>
- Peichoto, M. E., Teibler, P., Mackessy, S. P., Leiva, L., Acosta, O., Gonçalves, L. R. C., Tanaka-Azevedo, A. M. & Santoro, M. L. (2007). Purification and characterization of patagonfibrase, a metalloproteinase showing  $\alpha$ -fibrinogenolytic and hemorrhagic activities, from *Philodryas patagoniensis* snake venom. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*, 1770(5), 810–819. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2006.12.014>
- Quintana, M. A., Sciani, J. M., Auada, A. V. V., Martínez, M. M., Sánchez, M. N., Santoro, M. L., Fan, H. W. & Peichoto, M. E. (2017). Stinging caterpillars from the genera *Podalia*, *Leucanella* and *Lonomia* in Misiones, Argentina: A preliminary comparative approach to understand their toxicity. *Comparative Biochemistry and Physiology Part - C: Toxicology and Pharmacology*, 202, 55–62. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2017.07.007>
- Sant’Ana Malaque, C. M. & Gutiérrez, J. M. (2015). Snakebite Envenomation in Central and South America. In *Critical Care Toxicology* (pp. 1–22). Springer International Publishing. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-20790-2\\_146-1](https://doi.org/10.1007/978-3-319-20790-2_146-1)
- Wang, W.-J. & Huang, T.-F. (2002). *Purification and Characterization of a Novel Metalloproteinase, Acurhagin, from Agkistrodon acutus Venom.*