

ISSN 0120-4157

Biomédica

Revista del Instituto Nacional de Salud

PUBLICACIÓN ANTICIPADA EN LINEA

El Comité Editorial de *Biomédica* ya aprobó para publicación este manuscrito, teniendo en cuenta los conceptos de los pares académicos que lo evaluaron. Se publica anticipadamente en versión pdf en forma provisional con base en la última versión electrónica del manuscrito pero sin que aún haya sido diagramado ni se le haya hecho la corrección de estilo.

Siéntase libre de descargar, usar, distribuir y citar esta versión preliminar tal y como lo indicamos pero, por favor, recuerde que la versión impresa final y en formato pdf pueden ser diferentes.

Citación provisional:

Nina-Cueva O, Olazabal-Chambilla D, Quispe-Arpasi J, Alzamora-Sánchez

A, Gomes-Helena M, Huanchuire-Vega S. Caracterización bioquímica del veneno de la serpiente *Bothrops roedingeri* Mertens, 1942 y sus actividades edematogénica, hemorrágica y miotóxica. *Biomédica*. 2020;40(4).

Recibido: 09-10-19

Aceptado: 26-06-20

Publicación en línea: 03-07-20

Caracterización bioquímica del veneno de la serpiente *Bothrops roedingeri* Mertens, 1942 y sus actividades edematogénica, hemorrágica y miotóxica

Biochemical characterization of *Bothrops roedingeri* Mertens, 1942 snake venom and its edematogenic, hemorrhagic and myotoxic activities

Caracterización del veneno de la serpiente *Bothrops roedingeri*

Oswaldo Nina-Cueva ¹, Derly Olazabal-Chambilla ¹, Jair Quispe-Arpasi ¹; Adell Alzamora-Sánchez ¹, Mauricio Gomes-Helena ²; Salomón Huancahuire-Vega ¹

¹ Laboratorio de Investigación en Biología Molecular, Escuela de Medicina, Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad Peruana Unión, Lima, Perú

² Laboratorio de Química de Proteínas, Departamento de Bioquímica, Instituto de Biología, Universidad Estatal de Campinas, Sao Paulo, Brasil

Correspondencia:

Salomón Huancahuire-Vega, Departamento de Ciencias Básicas, Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad Peruana Unión, Carretera Central Km 19 Ñaña, Lima, Perú.

Teléfono (511) 01 6186300 - anexo: 2046

salomonhuancahuire@upeu.edu.pe

Contribución de los autores:

Oswaldo Nina-Cueva, Derly Olazabal-Chambilla, Jair Quispe-Arpasi y Adell

Alzamora-Sánchez: obtención de resultados de actividades tóxicas.

Mauricio Gomes-Helena: caracterización bioquímica.

Salomón Huanchuire-Vega: concepción y diseño del estudio.

Todos los autores participaron en la redacción del artículo.

Introducción. El envenenamiento por mordedura de serpiente es considerado por la OMS una enfermedad tropical desatendida, actualmente los venenos de serpientes *Bothrops* se vienen estudiado intensamente, en contraste con el veneno de la serpiente *Bothrops roedingeri*, de la cual hay escaso conocimiento.

Objetivos. Caracterizar bioquímicamente el veneno total de la serpiente *B. roedingeri* y evaluar sus acciones miotóxica, edematogénica y hemorrágica.

Materiales y métodos. Se realizó la caracterización enzimática del veneno de *B. roedingeri* a través de la determinación de las actividades fosfolipasa A₂, proteolítica, fibrinogenolítica y electroforesis SDS-PAGE y la caracterización tóxica del veneno determinando la Dosis Hemorrágica Mínima (DHM), Dosis Edematogénica Mínima (DEM) y los efectos miotóxicos local y sistémico.

Resultados. El veneno total de *B. roedingeri* mostró actividad PLA₂ de 3.45 ± 0.11 nmoles/min, actividad proteolítica de 0.145 ± 0.009 nmoles/min y un índice de coagulación del fibrinógeno de 6.67 ± 1.33 segundos. Por otro lado, este veneno produjo una DHM de 24.5 µg, DEM de 15.6 µg y un pronunciado efecto miotóxico local que fue evidenciado por la elevación de los niveles plasmáticos de creatino kinasa (CK) después de la inoculación por vía intramuscular. No mostró miotoxicidad sistémica.

Conclusiones. El veneno de *B. roedingeri* presenta acción hemorrágica, edematogénica y miotóxica locales. Enzimáticamente, tiene alta actividad PLA₂ la que sería responsable de los efectos miotóxico y edematogénico, también presenta actividad proteolítica y esta podría afectar la coagulación a través de su capacidad para degradar el fibrinógeno y a través de las metaloproteasas generar hemorragia.

Palabras clave: *Bothrops*; venenos de serpiente; mordeduras de serpientes; enfermedades desatendidas.

Introduction: Snake bite envenoming is considered by WHO a neglected tropical disease, currently *Bothrops* snake venoms are studied intensively, in contrast to *Bothrops roedingeri* snake venom for which knowledge is scarce.

Objectives: Biochemically characterize the total venom from *B. roedingeri* snake and evaluate its myotoxic, edematogenic and hemorrhagic actions.

Materials and methods: Enzymatic characterization from *B. roedingeri* venom was performed through determination of the phospholipase A₂, proteolytic, fibrinogenolytic activities, SDS-PAGE electrophoresis as well as, the venom's toxicity characterization by determining the Minimum Hemorrhagic Dose (MHD), the Minimum Edema Dose (MED) and the local and systemic myotoxic effects.

Results: The venom of *B. roedingeri* showed PLA₂ activity of 3.45 ± 0.11 nmoles/min, proteolytic activity of 0.145 ± 0.009 nmoles/min and fibrinogen coagulation index of 6.67 ± 1.33 seconds. On the other hand, this venom produced a MHD of 24.5 µg, MED of 15.6 µg and a pronounced local myotoxic effect that was evidenced by the elevation of plasma creatine kinase (CK) levels after intramuscular inoculation. The venom showed no systemic myotoxicity.

Conclusions: *B. roedingeri* venom has local hemorrhagic, edematogenic and myotoxic action. Enzymatically, it has high PLA₂ activity which would be responsible for the myotoxic and edematogenic effects, it also has proteolytic activity and this could affect coagulation through its ability to degrade fibrinogen and through the metalloproteases to cause bleeding.

Keywords: *Bothrops*; snake venoms; snake bites; neglected diseases.

En junio del 2017 la OMS clasificó el envenenamiento por mordedura de serpiente en la categoría A de las enfermedades tropicales desatendidas, la cual afecta a 2,7 millones de personas cada año, la mayoría viven en algunos de los lugares más remotos, pobremente desarrollados y comunidades tropicales políticamente marginadas (1). En América Latina y el Caribe, estadísticas hospitalarias indican que al menos 70 000 casos de mordeduras de serpiente ocurren por año, aunque es probable que el número real de envenenamientos sea mayor debido al no registro en muchas regiones rurales (2). En el Perú son reportados más de dos mil casos de ofidismo anualmente y las serpientes del género *Bothrops* representan la fauna de ofidios de interés médico, ya que son responsables de la mayoría de los casos de mordeduras de serpientes (70 – 80%) que ocurren en el país (3).

Bothrops roedingeri, llamada "jergón de la costa", pertenece a la familia Viperidae subfamilia Crotalinae (4), es reconocida como la especie de jergón más pequeña, está distribuida alrededor de toda la costa sur y sierra del Perú, a lo largo de las montañas hasta las lomas costeras, teniendo registros desde el departamento de La Libertad hasta el sur del departamento de Arequipa (5). La invasión de su hábitat natural por parte de la población humana está en constante aumento, representando un riesgo para la misma. Por ello esta especie juega un rol clave en los accidentes ofídicos en las planicies costeras del país (5).

Las manifestaciones generales del envenenamiento bothrópico son reacciones inflamatorias severas, con daños complejos en el tejido donde se inculó el veneno, disturbios hemostáticos drásticos, hemorragia, edema, mionecrosis, dermonecrosis, pudiendo complicarse con daños sistémicos llegando en

algunos casos a generar insuficiencia renal aguda. Estas manifestaciones son el resultado de la acción de diferentes componentes presentes en el veneno (6,7).

La composición del veneno, así como las propiedades biológicas de varias especies *Bothrops* presentes en el territorio peruano ya es conocida, incluyendo *B. atrox*, *B. barnetti*, *B. newidi*, *B. brazili*, *B. andianus*, etc. (8,9). Sin embargo, aún no se han descrito las características ni la composición del veneno de *B. roedingeri*.

El desarrollo de la proteómica y la caracterización farmacológica de los venenos ha permitido clasificar a las principales familias de toxinas patogénicas que componen el veneno de las especies *Bothrops*. Así, se ha determinado la presencia de fosfolipasas A₂ (PLA_{2s}), que se encuentran entre las principales proteínas tóxicas del veneno bothrópico, causantes de las características clínicas más notorias en las víctimas envenenadas, además se ha determinado la presencia de metaloproteasas de veneno zinc-dependientes, componentes más abundantes de estos venenos y causantes del efecto hemorrágico, serino-proteasas con actividad semejante a la trombina que producen alteraciones en la coagulación y L-aminooxidasas (10,11).

Es de importancia médica conocer las características enzimáticas del veneno, así como las propiedades farmacológicas de serpientes endémicas del Perú, como es el caso de *B. roedingeri*, de la cual se tiene muy poca información (12). En este reporte presentamos la caracterización bioquímica y enzimática del veneno de *B. roedingeri* así como la caracterización cuantitativa de los efectos hemorrágico, edematogénico y miotóxico, para entender mejor cómo este veneno ejerce su toxicidad.

Materiales y métodos

Veneno

El veneno fue cedido por el Laboratorio de Química de Proteínas del Instituto de Biología de la Universidad Estatal de Campinas (UNICAMP, Sao Paulo, Brasil) a cargo del profesor Sergio Marangoni. Fue obtenido de un “pool” de venenos de serpientes adultas *B. roedingeri* de ambos sexos y mantenido a 4 °C hasta su uso siendo diluido en tampón fosfato 0.1 M, pH 7.2 (PBS).

Animales

Se utilizaron ratones albinos *Mus musculus* juveniles machos de la cepa BALB/c (18 – 20 g), cepa usada ampliamente en estudios toxicológicos/farmacológicos, los cuales fueron mantenidos en el Bioterio de la Escuela de Medicina Humana de la Universidad Peruana Unión (UPeU, Lima, Perú). Los mismos fueron alojados en ambientes con temperatura controlada y alimentados con agua y comida *ad libitum*. El estudio fue aprobado por el Comité de Investigación y Ética de la Universidad Peruana Unión.

Actividad fosfolipasa A₂ (PLA₂)

La determinación de la actividad PLA₂ se realizó siguiendo la metodología de Holzer y Mackessy modificado para microplacas de 96 pozos (13). El ensayo contuvo 200 µl de tampón (Tris-HCl 10 mM, CaCl₂ 10mM y NaCl 100 mM pH 8), 20 µl del sustrato cromogénico ácido 4-nitro-(3-octanoiloxi) benzoico y 20 µl de agua o veneno total (VT) *B. roedingeri*. Después de la adición del veneno la mezcla fue incubada por 40 minutos a 37 °C y las absorbancias fueron leídas a intervalos de 10 minutos. La actividad enzimática expresada como velocidad inicial (Vo) se calculó después de 20 minutos de reacción. El ensayo se realizó en triplicado, monitoreando la formación del producto ácido 4-nitro-(3 hidrox)

benzóico (cromóforo) a 425 nm en un lector de microplacas VersaMax 190 (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA).

Actividad proteolítica

La actividad proteolítica se midió utilizando el sustrato N-benzoil-L-arginina-*p*-nitroanilida (BapNA) modificado para microplacas de 96 pozos. La mezcla de ensayo contuvo 45 μ l de tampón (Tris-HCl 10 mM, pH 8.0, CaCl₂ 10 mM, NaCl 100 mM), 180 μ l de sustrato, 15 μ l de agua y 5 μ l de VT *B. roedingeri*. Después de la adición de la muestra, la mezcla se incubó durante 40 minutos a 37 °C, leyendo las absorbancias a intervalos de 10 minutos a 410 nm. La actividad enzimática, expresada como velocidad inicial de la reacción (V_0), se calculó en función de la cantidad de *p*-nitroanilina liberada (14).

Electroforesis SDS-PAGE

Electroforesis se realizó siguiendo la metodología de Gallagher (15). Las placas de poliacrilamida fueron preparadas de forma discontinua con un gel de concentración de 5 % y gel de corrida de 12,5 %. Ambos geles recibieron SDS 20%. La corrida se realizó en sistema doble de mini placas SE 250 Mighty Small II. Los marcadores de masa molecular (fosforilasa B - 97 kDa, albumina sérica bovina - 66 kDa, ovoalbúmina - 45 kDa, anhidrasa carbónica - 30 kDa, inhibidor de tripsina de soya - 20 kDa y lisozima - 14 kDa. Sigma-Aldrich Co.) y la muestra de VT fueron disueltos en tampón Tris-HCl, 0,075 M, pH 6.8; 10 % de glicerol; 4 % de SDS y 0.001 % de bromofenol. La corrida se realizó a 30 mA. Los geles fueron coloreados con solución azul de Coomassie 0.05 % y el exceso de colorante removido en ácido acético 7 %.

Actividad fibrinogenolítica

La acción fibrinogenolítica se determinó mezclando 20 μ l de VT con 900 μ l de solución de fibrinógeno (2mg/ml) en tampón Tris-HCl 10 mM, pH 7.4 conteniendo CaCl_2 10 mM y NaCl 100 mM a 37 °C. La coagulación se expresa como Índice de coagulación (IC) obtenido de la ecuación $\text{IC} = t^{-1} \times 100$ donde t^{-1} es el inverso del tiempo en segundos. Una unidad de actividad de coagulación de fibrinógeno se definió arbitrariamente como la cantidad de enzima capaz de coagular la solución de fibrinógeno en un minuto (16).

Dosis hemorrágica mínima (DHM)

La DHM se define como la cantidad mínima de veneno (en μ g de peso seco) que, al ser inyectada por vía intradérmica en ratones, produce una lesión hemorrágica de 10 mm de diámetro, dos horas después de ser aplicada. Alícuotas de 0.1 ml de PBS conteniendo 20, 50 y 100 μ g de veneno se inyectaron por vía intradérmica en la piel dorsal afeitada de cada uno de los ratones (n=4). Los controles recibieron únicamente solución de PBS. Dos horas después los animales fueron sacrificados con Halotano y la piel removida cuidadosamente. En seguida se midió el diámetro de las lesiones en la superficie interna de la piel en dos direcciones en ángulo recto con ayuda de pinzas y fondo de iluminación. La DHM se calculó utilizando ecuaciones de regresión que relacionan las dosis de veneno con los diámetros medios de las lesiones hemorrágicas (17).

Dosis edematogénica mínima (DEM)

Se define como DEM a la cantidad de veneno que induce un 30% de edema, respecto al control. El ensayo se realizó utilizando el método propuesto por Damico *et al.*, (18). Se prepararon 3 dosis de VT *B. roedingeri* (10, 20 y 50 μ g

en 50 µl de PBS). Se inoculó cada solución en la almohadilla plantar del miembro posterior derecho de cuatro ratones albinos, respectivamente. En la almohadilla plantar del miembro izquierdo se inocularon 50 µl de solución PBS. Dos horas después el volumen de la pata se evaluó con un pletismometro. La actividad edematogénica es expresada como el porcentaje de aumento de volumen de la pata derecha en comparación con la pata izquierda (control). La fórmula para calcular el porcentaje de edema es: $[(\frac{T_x \times 100}{T_0}) - 100]$, donde T_x es el edema (volumen) medido y T_0 es el volumen de la pata previo inoculación del veneno.

Actividad miotóxica local y sistémica

Grupos de 4 ratones recibieron inyección intramuscular (músculo gastrocnemio) o intravenosa (vena caudal) de 20 µg de VT para verificar su acción local o sistémica, respectivamente. Los grupos control recibieron PBS. Posteriormente, en diferentes intervalos de tiempo (1, 3, 6, 9 y 24 horas), se recogieron muestras de sangre de la cola en capilares heparinizados y el plasma fue extraído para la determinación de los niveles plasmáticos de creatina kinasa (CK). Esta actividad se determinó mediante un ensayo cinético. La actividad CK se expresó en U/L donde una unidad es definida como la fosforilación de 1 µmol de creatina/min a 25 °C (19).

Análisis estadístico

Los ensayos enzimáticos fueron realizados en triplicado, se calcularon la media y desviación estándar. En la determinación de DHM, DEM se construyeron gráficos dosis-respuesta con curvas de regresión lineal. Los resultados fueron analizados a través de software de análisis de datos y gráficos Origin 2018.

Resultados

El veneno total de *B. roedingeri* fue caracterizado a través de sus actividades enzimáticas PLA₂, proteolítica, fibrinogenolítica y su perfil electroforético. El valor de la actividad PLA₂ en una concentración de sustrato 10 mM es 3.45 ± 0.11 nmoles/min. Por otro lado, el VT mostró una actividad proteolítica sobre el sustrato BApNa con una V_o de 0.145 ± 0.009 nmoles/min, 40 minutos después de iniciada la reacción. La figura 1 muestra el perfil de masa molecular de los componentes del veneno total de *B. roedingeri* (10 µg) en condiciones no reducidas. La pista 2 evidencia la presencia de varias bandas electroforéticas con distintas masas moleculares relativas en relación a los marcadores de masa molecular, entre las que sobresalen bandas de ~65, ~40, ~35, ~28 y ~19 KDa.

El VT de *B. roedingeri* presentó acción fibrinogenolítica evidenciado a través del índice de coagulación del fibrinógeno con un valor de 6.67 ± 1.33 segundos. Adicionalmente se evaluaron las acciones tóxicas del veneno en estudio a través de las actividades hemorrágica, edematogénica y miotóxica *in vivo* en ratones. La actividad hemorrágica fue evidenciada macroscópicamente por la presencia de halos hemorrágicos en la dermis de la región lumbar de ratones (zona de inoculación del veneno). La DHM determinada fue de 24.5 µg, cantidad de veneno capaz de inducir un halo hemorrágico de 10 mm de diámetro en un tiempo de 2 horas. La figura 2 muestra la determinación de la DHM evidenciando una actividad hemorrágica proporcional a la dosis aplicada. Por otro lado, la administración del veneno de *B. roedingeri* indujo la formación de edema dosis-dependiente, evidenciada macroscópicamente por el aumento del volumen del miembro posterior derecho con respecto al control (miembro

posterior izquierdo). Similarmente, se determinó que 15.6 µg de veneno son capaces de inducir 30% de edema respecto al control (DEM figura 3).

Los estudios realizados para determinar *in vivo* el efecto miotóxico local del veneno total (20 µg) fueron realizados en ratones inoculados con el veneno por vía intramuscular. El daño muscular fue evaluado por el aumento de los niveles de CK plasmática. Los resultados evidencian que los niveles de CK plasmática aumentan drásticamente en las primeras 3 a 6 horas de la inoculación, superando las 1000 U/L de CK. Los niveles de CK plasmático vuelven a sus valores normales 24 horas después del inicio del análisis (figura 4). Por otro lado, el veneno no mostró actividad miotóxica significativa cuando fue inoculado por vía endovenosa, los niveles de CK plasmático en los diferentes intervalos de tiempo son muy semejantes a los controles, evidenciando la falta de actividad miotóxica sistémica (figura 5). Las actividades tóxicas del veneno de *B. roedingeri* fueron comparadas con otros venenos bothrópicos que habitan en el Perú (cuadro 1).

Discusión

Las manifestaciones biológicas de los diferentes efectos tóxicos/farmacológicos que interfieren en los procesos fisiológicos normales de las presas/víctimas están correlacionadas con la abundancia de las diferentes familias de toxinas cuyas múltiples isoformas actúan de forma sinérgica potenciando su toxicidad (20). En este estudio realizamos la caracterización bioquímica y enzimática del veneno de la serpiente *B. roedingeri* así como la caracterización cuantitativa de los efectos hemorrágico, edematogénico, fibrinogenolítico y miotóxico.

El veneno mostró alta actividad PLA₂ similar a la mostrada por otros venenos bothrópicos cuya actividad enzimática fue medida usando el mismo sustrato

(8,21,22). Las PLA_{2s} presentan masas moleculares ~14 kDa las cuales en su estado nativo tienden a encontrarse en estado dimérico. La figura 1 muestra la presencia de una banda proteica notoria de ~28 kDa lo que evidencia la presencia de estas enzimas en el veneno de esta serpiente. Por otro lado, el veneno mostró acción proteolítica frente al sustrato BA ρ NA evidenciando así actividad proteolítica serinoproteasa. Estas proteínas de veneno presentan masas moleculares entre 30 – 35 kDa (23). y estarían presentes en el veneno *B. roedingeri* de acuerdo al perfil electroforético (figura 1). Se sabe que las serinoproteasas de veneno afectan el sistema de coagulación al quebrar el fibrinógeno en sus fibrinopéptidos promoviendo la coagulación, por lo que también son llamadas trombinas-like (16,23). Este efecto pro coagulante también fue observado en el veneno de *B. roedingeri*, así como en otros venenos bothrópicos que habitan en Perú (cuadro 1).

La actividad hemorrágica de los venenos bothrópicos varía de acuerdo a la región, ontogenia y específicamente al tipo de especie (24). Como ejemplos endémicos de la selva peruana está la serpiente *B. brazili*, cuya determinación de la DHM, efectuada tanto en veneno crudo como en proteína aislada, evidenció valores de 3.71 y 6.61 μ g, respectivamente (25,26). Por otro lado, la serpiente *B. atrox*, utilizando la misma metodología, mostró valores de 4.10 ± 0.64 μ g en veneno total (25,27). El valor de la DHM de *B. roedingeri* fue 24.5 μ g, (figura 2), valor que demuestra actividad moderada cuando es comparada a las DHM de estas especies botrópicas (cuadro 1).

Se sabe que los responsables en gran parte del efecto hemorrágico del envenenamiento ofídico son las metaloproteasas dependientes de zinc, siendo estas, componentes abundantes en los venenos de las serpientes botrópicas,

las cuales se subdividen en las clases P-I, P-II y P-III distinguidas por su estructura y por sus masas moleculares de 20-30, 30-60 y 60-100 kDa, respectivamente (28). De acuerdo al perfil electrofóretico mostrado en la figura 1 el veneno de *B. roedingeri* tendría mayoritariamente presencia de las clases P-I y P-III (masas moleculares relativas de ~28 y ~66 kDa.). Ha sido demostrado que estas clases de metaloproteasas son capaces de degradar el colágeno tipo IV y la laminina en la lámina basal de la microvasculatura, además quiebran la barrera endotelial incrementando la permeabilidad vascular (29).

La inflamación es una característica local importante del envenenamiento por serpientes botrópicas, se caracteriza por un edema local prominente, dolor e hinchazón extensa (30), por ello se evaluó la respuesta inflamatoria local producida por el veneno total de *B. roedingeri* a través de la formación de edema de pata en ratones. Los resultados muestran que el veneno induce edema pronunciado (figura 3) de comportamiento similar a otros venenos bothrópicos (cuadro 1), incluyendo *B. brazili*, *B. barnetti*, *B. atrox* y *B. rhombeatus* (25,31). La exudación de fluidos y proteínas plasmáticas que conducen a la formación del edema es producida por diferentes mediadores los cuales actúan aumentando la permeabilidad microvascular, entre ellos se encuentran principalmente PLA_{2s} y metaloproteasas, sin embargo, serinoproteasas y lectinas también pueden contribuir para las propiedades edematogénicas del veneno total (30).

La contribución de metaloproteasas de la clase P-I al efecto inflamatorio del veneno fue demostrado por Torres-Huaco *et al.*, (32) cuando la toxina BmHF-1 aislada de *B. marajoensis* produjo edema en el mismo modelo animal con una

DEM de 10.27 µg. Por otro lado, las PLA_{2s} de veneno también muestran un rol importante en los procesos inflamatorios proporcionando los precursores de las sustancias lipídicas pro inflamatorias derivados del ácido araquidónico (33).

Adicionalmente, del veneno en estudio fue aislada la PLA₂ BrTX-I, una toxina catalíticamente activa, la cual produjo edema de pata y aumentó los niveles séricos de IL-1, IL-6 y TNF-α en ratones, citocinas involucradas en la regulación de la respuesta inmune y la inflamación (12).

La miotoxicidad es definida como la habilidad de las toxinas para inducir necrosis en la musculatura esquelética *in vivo*, a partir de la inoculación intramuscular o *in vitro*, a través de la incubación con músculos esqueléticos diferenciados y es evidenciada por la capacidad de aumentar los niveles plasmáticos de CK (19). Los componentes del veneno bothrópico responsables de la acción miotóxica son las PLA_{2s} y las metaloproteasas hemorrágicas (34), ambas acciones presentadas por el veneno *B. roedingeri*. La falta de oxígeno debido a la hemorragia producida por las metaloproteasas es considerada la causa de la mionecrosis (35), por otro lado, las PLA_{2s} miotóxicas están entre los principales factores responsables de la necrosis de la musculatura esquelética observada en casos de envenenamiento por serpientes y se sabe que este evento ocurre debido a la unión de estas miotoxinas a la membrana plasmática de las fibras musculares, llevando a alteraciones en su permeabilidad (19).

El veneno total de *B. roedingeri* aumentó drásticamente los niveles de CK plasmáticos después de ser inyectados en el músculo *gastrocnemio* de ratones (figura 4). Este aumento de CK evidencia daño muscular severo en las fibras musculares inoculadas con las toxinas, dejando notorio su efecto miotóxico

local. Contrariamente, cuando fue administrado por vía intravenosa, los niveles de CK plasmático tuvieron valores semejantes al control, evidenciando la falta de miotoxicidad sistémica (figura 5). La miotoxicidad local es característica del veneno de las serpientes Viperidae, cuyas PLA_{2s} afectan predominantemente los músculos localizados en la región donde el veneno fue inyectado (8,12,33). Estas miotoxinas se caracterizan por inducir daño muscular localizado, de acción rápida y poca miotoxicidad adicional ocurre después del daño inicial, probablemente no tienen especificidad, ya que se unen a diferentes tipos celulares musculares y no musculares en el lugar de la inyección y podrían ser rápidamente secuestradas por los tejidos no permitiendo que estas alcancen tejidos distantes al lugar de la inoculación (19).

En conclusión, los resultados descritos aquí muestran que el veneno de *B. roedingeri* presenta acción hemorrágica, edematogénica y miotóxica local. Enzimáticamente, el veneno tiene alta actividad PLA₂ y esta actividad sería la responsable de los efectos miotóxico e inflamatorio. El veneno también es moderadamente proteolítico y esta acción podría afectar la coagulación a través de su capacidad para degradar el fibrinógeno y a través de las metaloproteasas generar hemorragia y miotoxicidad. Estudios de neutralización futuros con sueros antiofídicos disponibles en el país contribuirán a los avances en la terapia y dilucidación del mecanismo de envenenamiento de esta serpiente de importancia médica en el Perú.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener conflicto de intereses.

Financiación

Este trabajo de investigación fue financiado por la Facultad de Ciencias de la Salud de la Universidad Peruana Unión.

Referencias

1. **Chippaux JP.** Snakebite envenomation turns again into a neglected tropical disease! *J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis.* 2017;23:1-2.
<https://doi.org/10.1186/s40409-017-0127-6>
2. **Gutiérrez JM.** Reducing the impact of snakebite envenoming in latin America and the Caribbean: Achievements and challenges ahead. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2014;108:530-7.
<https://doi.org/10.1093/trstmh/tru102>
3. Ministerio de Salud.. Número de casos de ofidismo según departamentos, Perú, 2014-2019. Fecha de consulta: 9 agosto del 2019. Disponible en:
<https://www.dge.gob.pe/portal/docs/vigilancia/sala/2019/SE46/ofidismo.pdf>
4. **Carrasco PA, Mattoni CI, Leynaud GC, Scrocchi GJ.** Morphology, phylogeny and taxonomy of South American bothropoid pitvipers (Serpentes, Viperidae). *Zool Scr.* 2012;41:109-24.
<https://doi.org/10.1111/j.1463-6409.2011.00511.x>
5. **Navarrete ZM, Silva SW, Vargas ME.** Las serpientes venenosas de importancia en la salud publica del Perú. *Revista Electrónica de Veterinaria.* 2010;XI:1-17.
6. **Warrell DA.** Snake bite. *Lancet.* 2010;375:77-88.
[https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(09\)61754-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(09)61754-2)
7. **Means R, Cabrera J, Moreno X, Amini R.** Remote South American

- snakebite with extensive myonecrosis. Clin Pract Cases Emerg Med. 2017;25:47-9. <https://doi.org/10.5811/cpcem.2016.11.31220>
8. **Huancahuire-Vega S, Ponce-Soto LA, Martins-de-Souza D, Marangoni S.** Structural and functional characterization of brazilitoxins II and III (BbTX-II and -III), two myotoxins from the venom of *Bothrops brazili* snake. Toxicon. 2009;54:818-27. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2009.06.008>
 9. **Guerra-Duarte C, Lopes-Peixoto J, Fonseca-de-Souza BR, Stransky S, Oliveira D, Schneider FS, et al.** Partial *in vitro* analysis of toxic and antigenic activities of eleven Peruvian pitviper snake venoms. Toxicon. 2015;108:84-96. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2015.09.007>
 10. **Tasoulis T, Isbister GK.** A review and database of snake venom proteomes. Toxins (Basel). 2017;9:290:1-23. <https://doi.org/10.3390/toxins9090290>
 11. **Kohlhoff M, Borges MH, Yarleque A, Cabezas C, Richardson M, Sanchez EF.** Exploring the proteomes of the venoms of the Peruvian pit vipers *Bothrops atrox*, *B. barnetti* and *B. pictus*. J Proteomics. 2012;75:2181-95. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2012.01.020>
 12. **Gomes Heleno MA, Baldasso PA, Ponce-Soto LA, Marangoni S.** Biochemical characterization and pharmacological properties of new basic PLABrTX-I isolated from *Bothrops roedingeri* (Roedinger's Lancehead) mertens, 1942, snake venom. Biomed Res Int. 2013;591470:1-13. <https://doi.org/10.1155/2013/591470>
 13. **Holzer M, Mackessy SP.** An aqueous endpoint assay of snake venom phospholipase A2. Toxicon. 1996;34:1149–55.

[https://doi.org/10.1016/0041-0101\(96\)00057-8](https://doi.org/10.1016/0041-0101(96)00057-8)

14. **Erlanger BF, Kokowsky N, Cohen W.** The preparation and properties of two new chromogenic substrates of trypsin. Arch Biochem Biophys. 1961;95:271-8. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(61\)90145-x](https://doi.org/10.1016/0003-9861(61)90145-x)
15. **Gallagher SR.** One-dimensional SDS gel electrophoresis of proteins. Curr Protoc Protein Sci. 2012. <https://doi.org/10.1002/0471140864.ps1001s68>
16. **Vilca-Quispe A, Ponce-Soto LA, Winck FV, Marangoni S.** Isolation and characterization of a new serine protease with thrombin-like activity (TLBm) from the venom of the snake *Bothrops marajoensis*. Toxicon. 2010;55:745–53. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2009.11.006>
17. **Theakston RD, Reid HA.** Development of simple standard assay procedures for the characterization of snake venom. Bull World Health Organ. 1983;61:949-56.
18. **Damico DCS, Cruz Höfling MA, Cintra M, Leonardo MB, Calgarotto AK, Silva SL, et al.** Pharmacological study of edema and myonecrosis in mice induced by venom of the bushmaster snake (*Lachesis muta muta*) and its basic Asp49 phospholipase A2 (LmTX-I). Protein J. 2008;27:384-91. <https://doi.org/10.1007/s10930-008-9148-x>
19. **Gutiérrez JM, Ponce-Soto LA, Marangoni S, Lomonte B.** Systemic and local myotoxicity induced by snake venom group II phospholipases A2: comparison between crotoxin, crotoxin B and a Lys49 PLA2 homologue. Toxicon. 2008;51:80-92. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2007.08.007>
20. **Gutiérrez JM, Calvete JJ, Habib AG, Harrison RA, Williams DJ, Warrell DA.** Snakebite envenoming. Nat Rev Dis Prim. 2017;3:17063:1-

20. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2017.63>
21. **Huancahuire-Vega S, Ponce-Soto LA, Martins-De-Souza D, Marangoni S.** Biochemical and pharmacological characterization of PhTX-I a new myotoxic phospholipase A 2 isolated from *Porthidium hyoprora* snake venom. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol.* 2011;154:108-119. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2011.03.013>
22. **Calgarotto AK, Damico DC, Ponce-Soto LA, Baldasso PA, Da Silva SL, Souza GH, et al.** Biological and biochemical characterization of new basic phospholipase A2 BmTX-I isolated from *Bothrops moojeni* snake venom. *Toxicon.* 2008;51:1509-19. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2008.03.030>
23. **Amorim FG, Menaldo DL, Carone SEI, Silva TA, Sartim MA, Pauw E De, et al.** New insights on moojase, a thrombin-like serine protease from *Bothrops moojeni* snake venom. *Toxins.* 2018;10;1-19. <https://doi.org/10.3390/toxins10120500>
24. **Escalante T, Rucavado A, Herrera C.** Hemorrhage Caused by snake venom Metalloproteinases: A journey of discovery and understanding. *Toxins.* 2016,8,93:1-19. <https://doi.org/10.3390/toxins8040093>
25. **Rojas E, Quesada L, Arce V, Lomonte B, Rojas G, Gutiérrez JM.** Neutralization of four Peruvian *Bothrops* sp. snake venoms by polyvalent antivenoms produced in Perú and Costa Rica: Preclinical assessment. *Acta Trop.* 2005;93:85-95. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2004.09.008>
26. **Kayano AM, Simões-Silva R, Medeiros PSM, Maltarollo VG, Honorio KM, Oliveira E, et al.** BbMP-1, a new metalloproteinase isolated from

- Bothrops brazili* snake venom with in vitro antiplasmodial properties. *Toxicon*. 2015;106:30-41. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2015.09.005>
27. **García PJ, Yarlequé A, Bonilla-ferreyra C, Pessah S, Vivas D, Sandoval GA, et al.** Características bioquímicas y evaluación preclínica de un antiveneno botrópico liofilizado contra el veneno de la serpiente *Bothrops atrox*. *Rev Peru Med Exp Salud Publica*. 2008;25:386-90.
28. **Markland JrFS, Swenson S.** Snake venom metalloproteinases. *Toxicon*. 2013;62:3-18. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2012.09.004>
29. **Herrera C, Voisin M-B, Escalante T, Rucavado A, Nourshargh S, María Gutiérrez J, et al.** Effects of PI and PIII Snake Venom Haemorrhagic Metalloproteinases on the Microvasculature: A Confocal Microscopy Study on the Mouse Cremaster Muscle. *PLoS One*. 2016;11:168643:1-17. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0168643>
30. **Teixeira C, Cury Y, Moreira V, Picolob G, Chaves F.** Inflammation induced by *Bothrops asper* venom. *Toxicon*. 2009;54:988–97. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2009.03.019>
31. **Rengifo-Rios AM, Muñoz-Gómez LM, Cabezas-Fajardo FA, Guerrero-Vargas JA.** Edematic and coagulant effects caused by the venom of *Bothrops rhombeatus* neutralized by the ethanolic extract of *Piper auritum*. *J Ethnopharmacol*. 2019;242:112046:1-7. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2019.112046>
32. **Torres-Huaco DF, Ponce-Soto LA, Martins-de-Souza D, Marangoni S.** Purification and characterization of a new weak hemorrhagic Metalloproteinase BmHF-1 from *Bothrops marajoensis* Snake Venom. *Protein J*. 2010; 29:407-16. <https://doi.org/10.1007/s10930-010-9267-z>

33. **Huancahuire-Vega S, Ponce-Soto LA, Marangoni S.** PhTX-II a basic myotoxic phospholipase A₂ from *Porthidium hyoprora* snake venom, pharmacological characterization and amino acid sequence by mass spectrometry. *Toxins (Basel)*. 2014;6:3077-97.
<https://doi.org/10.3390/toxins6113077>
34. **Gutiérrez JM, Escalante T, Hernández R, Gastaldello S, Saravia-Otten P, Rucavado A.** Why is skeletal muscle regeneration impaired after myonecrosis induced by viperid snake venoms? *Toxins*. 2018;10:1-21. <https://doi.org/10.3390/toxins10050182>
35. **Gutiérrez JM, Rucavado A.** Snake venom metalloproteinases: their role in the pathogenesis of local tissue damage. *Biochimie*. 2000;82:841–50.
[https://doi.org/10.1016/s0300-9084\(00\)01163-9](https://doi.org/10.1016/s0300-9084(00)01163-9)

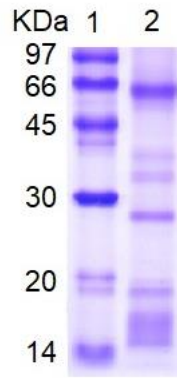


Figura 1. Electroforesis SDS-PAGE del veneno total (VT) de *B. roedingeri*. (1) Marcadores de masa molecular, (2) VT.

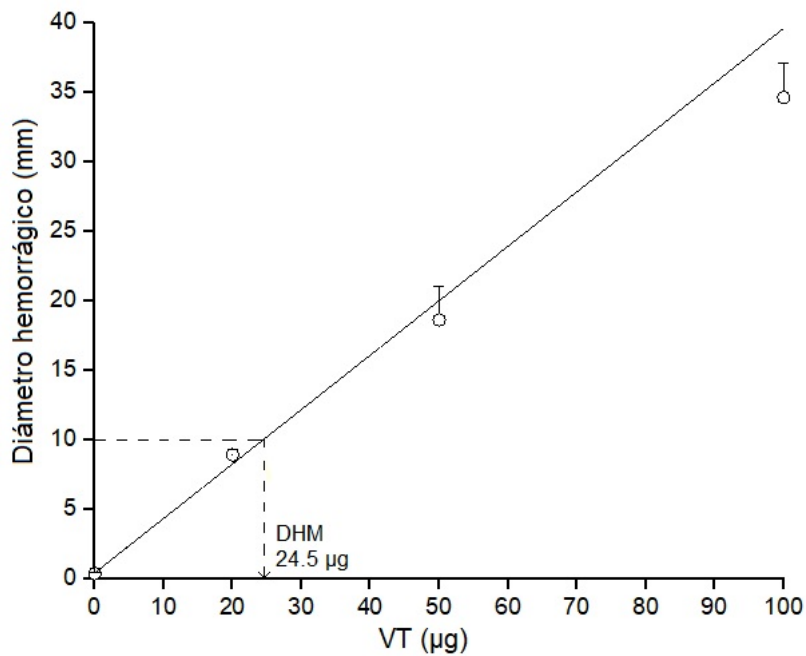


Figura 2. Dosis hemorrágica mínima del veneno total de *B. roedingeri* en ratones. Diferentes dosis de veneno (20, 50 y 100µg) fueron usadas. El gráfico representa el diámetro promedio de halos hemorrágicos \pm SD ($n = 4$). Se muestra la regresión lineal de dosis versus diámetros ($r = 0.99455$).

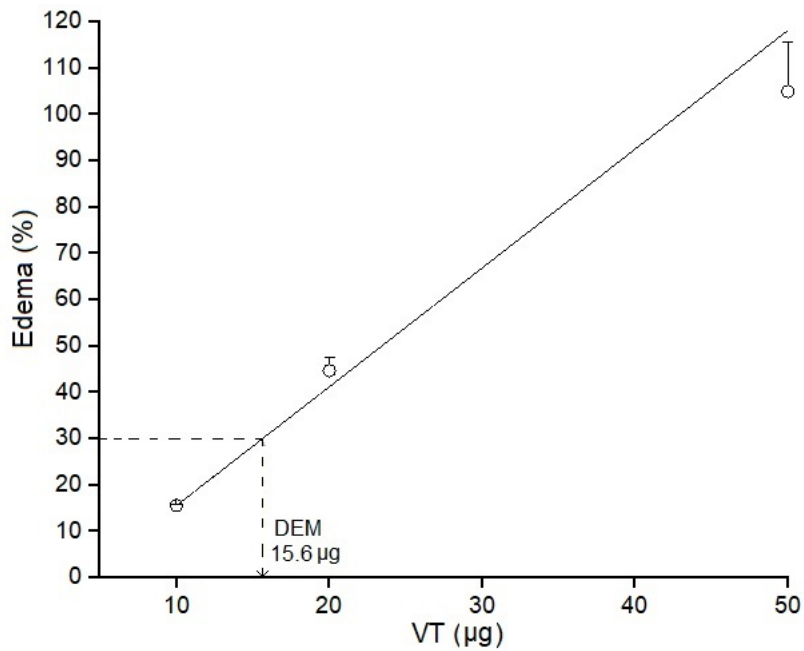


Figura 3. Dosis edematizante mínima (DEM) del veneno total de *B. roedingeri* en el modelo de pata posterior de ratones. Diferentes dosis de veneno (10, 20 y 50µg) fueron usadas. El grupo control recibió solución salina (50 µl). El edema es expresado en porcentaje, comparando el incremento del volumen de la pata con el respectivo control. Cada punto representa la media \pm SD de cuatro ratones. Se muestra la regresión lineal de dosis versus porcentaje de edema ($r = 0.99144$).

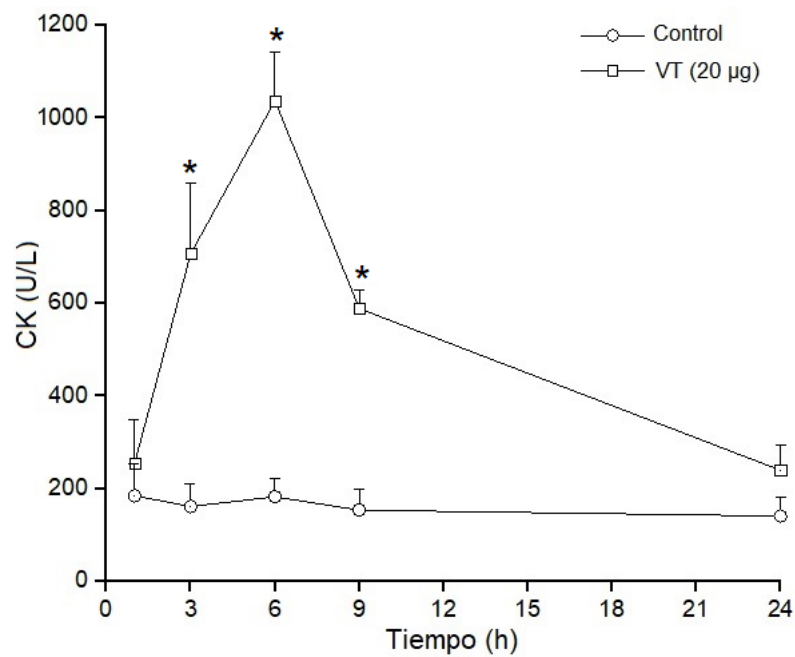


Figura 4 Actividad miotóxica local del veneno de *B. roedingeri* en ratones medidas a través de los incrementos en la actividad de creatina kinasa (CK) en plasma después de la inyección intramuscular del veneno (20 µg). Los controles fueron inyectados con 50µL de PBS. En diferentes momentos, se recogió sangre periférica y se midieron los niveles séricos de CK. Los valores son medias \pm SD de cuatro ratones en cada punto (* $p < 0.05$).

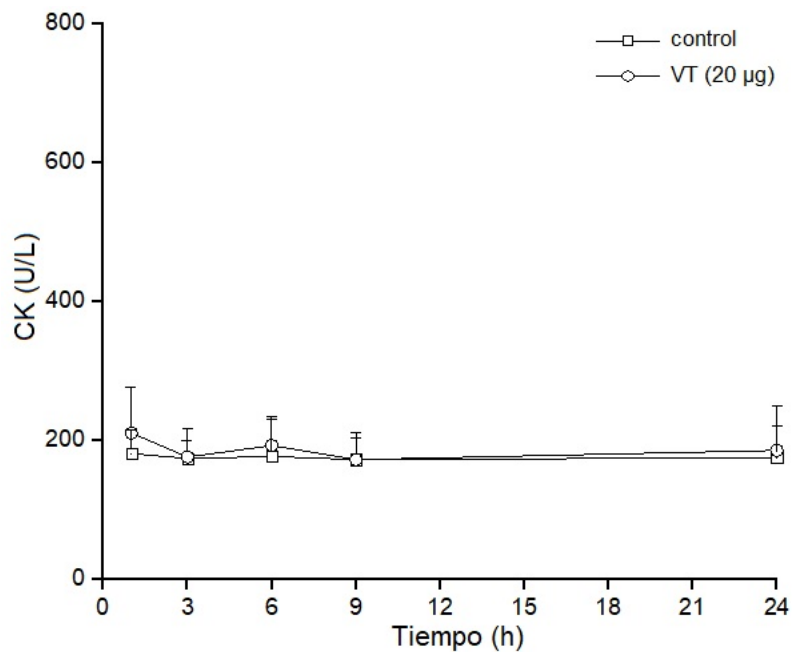


Figura 5

Actividad miotóxica sistémica del veneno de *B. roedingeri* en ratones medidas a través de los incrementos en la actividad de creatina kinasa (CK) en plasma después de la inyección intravenosa, del veneno (20 µg). Los controles recibieron 50µL de PBS. En diferentes momentos, se recogió sangre periférica y se midieron los niveles séricos de CK. Los valores son medias ± SD de cuatro ratones en cada punto (* $p < 0.05$).

Cuadro 1. Comparación entre las actividades tóxicas de *B. roedingeri* y otros venenos bothrópicos.

Veneno	DHM (μg)	DEM (μg)	AC (s)	AM (μg)
<i>Bothrops roedingeri</i>	24.5	15.6	6.67	20.0
<i>Bothrops atrox</i> ^a	4.10	2.95	3.65	56.3
<i>Bothrops brazili</i> ^a	3.71	1.18	7.39	13.5
<i>Bothrops pictus</i> ^a	1.06	0.52	46.6	15.4
<i>Bothrops barnetti</i> ^a	0.75	1.13	21.5	40.4

Abreviaturas: DHM (Dosis hemorrágica mínima, definida como la cantidad de veneno en μg que induce una lesión hemorrágica de 10 mm de diámetro, dos horas después de su aplicación), DEM (Dosis edematogénica mínima, definida como la cantidad de veneno en μg que induce un 30% de edema, respecto al control), AC (Actividad coagulante, expresada como índice de coagulación en segundos), AM (Actividad miotóxica, expresada en términos de dosis miotóxica mínima, definida como la cantidad de veneno en μg que inducen un incremento de CK plasmático tres horas después de inyección intramuscular correspondientes a cuatro veces el valor de CK de los controles).

^a Datos obtenidos de Rojas et al., (25).