

Tesis de grado
Licenciatura en Bioquímica

Estudio de la resistencia de *Boiruna maculata* al veneno de *Bothrops alternatus*

Ignacio García

Tutor: Dr. Victor Morais
Co-tutor: Dra. Norma Suarez

*Departamento de
Desarrollo Biotecnológico
y Producción*

Diciembre 2020

Quiero agradecer a mis tutores, Victor y Norma, por abrirme las puertas de su laboratorio y permitirme haber llevado a cabo este trabajo, guiándome en cada paso.

A mis padres, por su apoyo constante, por motivarme a seguir mis sueños.

A Vale, por acompañarme, cuidarme (y rezongarme) durante este viaje, cuya ayuda ha sido indispensable para llegar hasta acá.

A El Nene, a La Tapada, Isa, Naza, Xixi, Martín, Mansi y otra vez a Vale por las horas de estudio, risas y discusiones que a veces no llevaban a nada, pero que de una forma u otra han contribuido para que esto fuera posible.

También quiero agradecer a Jeny, siempre dispuesta a dar una mano, y que me ayudó a elegir este rumbo.

A Melitta, quien incontables veces me abrió las puertas para recibir cualquier duda tonta que me surgiera de imprevisto, y cuya colaboración ha sido imprescindible para este trabajo.

Y finalmente agradecer al Dr. Alejandro Crampet, que sin su ayuda no hubiera sido posible el desarrollo de esta tesis.

ÍNDICE:

RESUMEN	5
INTRODUCCION	6
Características generales de los ofidios	6
El accidente ofídico	8
El veneno de las serpientes	11
Ofidismo en Uruguay y la región	16
El suero antiofídico.....	18
La Próxima generación de antivenenos.....	21
Inhibidores naturales.....	23
Las Musuranas	26
<i>Boiruna maculata</i>	28
MATERIALES Y MÉTODOS	31
Venenos y sangre:	31
Ensayo de coagulación:.....	31
Ensayo de inhibición del efecto coagulante:	31
Ensayo de la actividad hemolítica indirecta.....	32
Ensayo de inhibición de la actividad hemolítica indirecta	32
Ensayo de la actividad gelatinasa	32
Ensayo de inhibición de la actividad gelatinasa	33
Actividad L-amino oxidasa:	33
Inhibición actividad L-amino oxidasa.....	33
SDS-PAGE (4-12%):.....	33
Análisis estadísticos:.....	34
RESULTADOS	34
Ensayo de coagulación:.....	34
Ensayo de inhibición del efecto coagulante:	35
Actividad hemolítica indirecta:	36
Inhibición de la actividad fosfolipasa:	37
Actividad gelatinasa:	38
Inhibición de la actividad gelatinasa:.....	38
Actividad L-amino oxidasa	39
Inhibición L-amino oxidasa.....	40
SDS-Page	41
DISCUSIÓN	42
CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS	47
BIBLIOGRAFÍA	49

En nuestro país ocurren en promedio 60 accidentes por ofidios ponzoñosos cada año. Salvo raras excepciones, estos son causados por la crucera, *Bothrops alternatus* (DUMÉRIL, 1854) y la yara, *Bothrops pubescens* (COPE, 1870). El veneno de estos ofidios se caracteriza principalmente por importantes alteraciones en la coagulación y daño local pronunciado, particularmente en la zona de la mordedura. Esto puede derivar en importantes secuelas como incapacidad funcional del miembro mordido, amputaciones, o incluso llevar a la muerte en caso de que no se reciba a tiempo la correcta administración de suero antiofídico en un centro asistencial. Existen diferentes especies animales que poseen cierta resistencia parcial o total frente a la ponzoña de los ofidios, incluyendo entre otros, varias especies de reptiles. En nuestro país habita la musurana negra, *Boiruna maculata* (BOULENGER, 1896), una culebra que se especializa en depredar otras serpientes, entre ellas las del género *Bothrops*. Por esta razón, la musurana se ve frecuentemente expuesta a mordidas, y en consecuencia a su veneno, aunque estos incidentes no resultan en secuelas para la culebra. En el presente trabajo se buscó determinar si la sangre de *B. maculata* es capaz de neutralizar alguno o todos los efectos tóxicos del veneno de *B. alternatus in vitro*. Los resultados evidencian que la sangre de *B. maculata* puede inhibir notablemente la actividad de las metaloproteasas del veneno, que afectan la coagulación y destruyen el tejido. En contraste, la actividad hemolítica de las fosfolipasas A2 y la actividad enzimática de las L-amino oxidasas no se vio afectada por la sangre de *B. maculata*. Se realizó una corrida electroforética de la sangre de esta culebra donde se encontraron componentes de alto y bajo peso molecular, que podrían corresponder con el peso de algunos inhibidores enzimáticos reportados para animales resistentes al veneno de ofidios. En base a estos resultados se puede concluir que *B. maculata* posee en su sangre inhibidores de metaloproteasas que le otorgan resistencia al veneno de *B. alternatus*, razón por la cual se sugiere investigar más sobre los mismos con la finalidad de lograr una posible identificación, purificación y caracterización de estos, lo que se considera que pueda tener potencial aplicación medicinal para el tratamiento del accidente ofídico.

Palabras clave: Ofidismo, Accidente ofídico, Veneno, *Boiruna maculata*, Ofiofagia, *Bothrops alternatus*, Sangre, Inhibidores, Metaloproteasas, Serinoproteasas, Fosfolipasas A2

CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LOS OFIDIOS

Las serpientes, u ofidios, son animales vertebrados que conforman el suborden Serpentes, perteneciente al orden Squamata (escamados) y a la clase Reptilia¹⁻³. Están caracterizados por su cuerpo alargado, cubierto de escamas córneas y la ausencia de patas, por lo que sus cuerpos flexibles están adaptados a la locomoción mediante movimientos ondulatorios¹⁻³. Las serpientes no poseen párpados, pero sus ojos están cubiertos por una escama modificada transparente. Tampoco presentan oído externo ni membrana timpánica¹⁻³. Debido a la ausencia de miembros, los ofidios están dotados de un cráneo altamente cinético que le permite dislocar sus articulaciones, permitiéndoles engullir presas enteras¹⁻³. Una interesante adaptación sensorial con la que cuentan es el característico órgano de Jacobson, ubicado en el techo de la boca, que les permite sensar moléculas químicas con ayuda de su lengua bífida¹⁻³. Si bien en su mayoría son ovíparas, hay especies vivíparas¹⁻³.

Las serpientes son el segundo grupo más diverso de reptiles actuales, con más de 3000 especies, adaptados a diversos climas y han conquistado todos los continentes excepto la Antártida¹⁻³. Aunque mayoritariamente son terrestres, hay especies arborícolas, fosoriales, semiacuáticas y marinas¹⁻³. Las serpientes son especialmente abundantes en climas tropicales y subtropicales, donde con frecuencia causan accidentes al tener encuentros con humanos o animales domésticos^{1,4,5}. Estos siniestros son causadas por especies pertenecientes a las familias Colubridae, Elapidae y Viperidae, capaces de inyectar veneno^{1,3-5}. Dichos ofidios sintetizan el veneno en un par de glándulas especializadas, ubicadas, a ambos lados de la cabeza, que se comunican con colmillos modificados por los cuales el veneno ingresa al organismo de la víctima, como se ilustra en la Figura 1^{1,3,5}.

Todas las serpientes son carnívoras, y a pesar de que el ser humano no forma parte de la cadena alimenticia de ninguna serpiente, estos reptiles provocan anualmente entre en todo el mundo^{1,3,5-8}. La causa de estas fatalidades se debe a especies venenosas⁵⁻⁸.

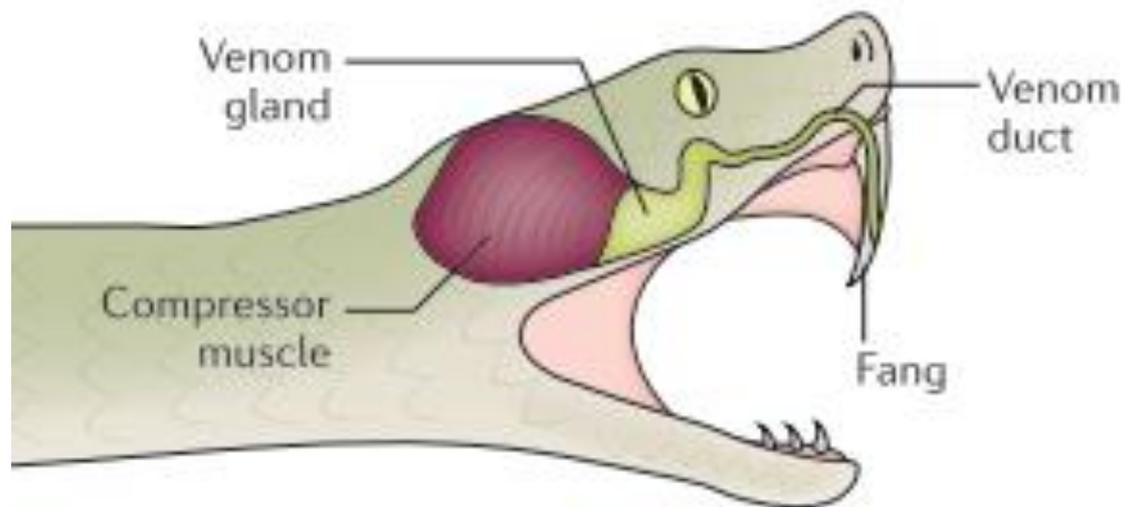


Figura 1. La imagen esquematiza como el colmillo especializado de un vipérido, se conecta con la glándula de veneno. El veneno es sintetizado y almacenado dentro de la glándula. La glándula está rodeada por un músculo compresor que la serpiente contrae a voluntad para inyectar el veneno, el cual viaja por el ducto hasta el colmillo. Extraído de Gutiérrez et al, 2017⁵.

La familia Colubridae consta de aproximadamente 1800 especies, casi el 70% de las especies de ofidios. Sus características ecológicas, morfología y sus tamaños son variados, abarcando desde los 20 cm hasta los 4 m ^{1,3,9}. Es la familia dominante en todos los continentes, salvo en Australia^{1,3}. Comúnmente llamadas “culebras”, las especies de esta familia generalmente presentan escamas cefálicas bien grandes y definidas, y ventrales anchas^{1,3,9}. Generalmente tienen pupilas circulares debido a su actividad diurna, y son predominantemente ovíparas^{1,3}. Si bien la mayoría de ellas no son venenosas y su dentición es aglifa, (todos sus dientes son iguales y macizos) muchas especies de esta familia son venenosas^{1,3-5,9}. En estos casos la dentición es opistoglifa, con colmillos diferenciados en la región posterior del maxilar, los cuales son más grandes que los demás dientes y tienen su cara anterior acanalada^{1,3-5,9}. Su veneno generalmente no es peligroso para el humano, exceptuando algunas especies cuyo veneno sí es letal^{1,3,5,9}.

Los ejemplares pertenecientes a la familia Elapidae incluyen a las cobras, mambas, corales, especies marinas, entre otras^{1-3,5}. Su morfología es muy similar a la de las culebras, con grandes escamas en la cabeza y ojos con pupila circular, a excepción de algunas especies australianas que se asemejan a vipéridos^{1,3}. La mayoría de las especies son terrestres y con adultos de tamaños variados, rondando los 50 cm las especies más pequeñas, y entre 2 y 3 m de longitud las más grandes³. Rara vez

alcanzan los 4 m, a excepción de la cobra real (*Ophiophagus hannah*) que alcanza los 6 m de largo³. Su dieta consiste principalmente en otros reptiles, salvo las marinas que se alimentan de peces^{1,3}. Son la familia predominante en Australia, pero no habitan Europa ni América del Norte^{1,3}. Los elápidos tienen dentición proteroglifa, caracterizada por los colmillos inoculadores huecos y siempre erectos. Estos dientes se posicionan en la región anterior del maxilar por los cuales inyectan un potente veneno neurotóxico^{1,3,5,9}.

Viperidae es la familia de serpientes más evolucionadas y son fácilmente reconocibles por su morfología. Los vipéridos, o “víboras”, tienen cabeza triangular con escamas pequeñas y pupila elíptica vertical^{1-3,9}. La subfamilia Crotalinae (víboras de foseta) posee entre las narinas y los ojos un distintivo órgano conocido como foseta loreal, que les permite sentir temperatura, por lo que son típicamente nocturnas^{1,3,9}. Dentro de los crotalinos encontramos los géneros *Agkistrodon*, *Bothrops*, *Crotalus*, *Lachesis*, *Trimmesurus*, entre otras^{3,5}. Comprende especies con adultos rondando entre los 30 a 60 cm hasta los casi 4 m de largo³. Las especies más grandes se alimentan de mamíferos y aves, y las más pequeñas pueden incluir pequeños reptiles y anfibios en su dieta³. Aunque no están presentes en Oceanía, son las serpientes que se distribuyen más alejadas del ecuador, así como a mayor altitud^{1,3}. Muchas especies de vipéridos son ovovivíparas o vivíparas^{1,3}. Su sistema inoculador de veneno es el mejor adaptado y especializado, con grandes colmillos retráctiles huecos que se pueden erguir a voluntad de la serpiente al momento de morder, inyectando veneno predominantemente hemotóxico y citotóxico^{1,3,5,9}.

En Uruguay hay ejemplares de estas tres familias de ofidios, siendo en su mayoría colúbridos, como es el caso de la musurana negra (*Boiruna maculata*)^{9,10}. Los vipéridos que se distribuyen por nuestro territorio pertenecen a los géneros *Bothrops* y *Crotalus*: la crucera y la yara (*Bothrops alternatus* y *Bothrops pubescens* respectivamente) y la cascabel (*Crotalus durissus terrificus*)⁹⁻¹¹. El único ejemplar de elápidos que habita Uruguay es la coral (*Micrurus altirostris*)⁹⁻¹¹.

EL ACCIDENTE OFÍDICO

El ofidismo, o accidente ofídico, es el cuadro clínico provocado por el envenenamiento consecuente a la mordida de una serpiente venenosa, ya sea a un humano o un animal^{5,10,12}. Las diversas manifestaciones clínicas del envenenamiento son producto de la variada composición de los diferentes venenos, que van desde daño localizado en el tejido, hasta efectos sistémicos que ponen la vida en riesgo^{4,5,8}.

Además del sufrimiento producido por las toxinas del veneno, el accidente ofídico usualmente deja secuelas, y si no es tratado debidamente puede causar la muerte prematura^{4-6,13}. Dentro de las secuelas observadas se han reportado: morbilidad crónica, discapacidad (ya sea por amputación o atrofiamiento muscular, deformidad y/o rigidez), infecciones crónicas, formación de úlceras y secuelas psicológicas^{4-6,13}.

El daño provocado por el accidente ofídico no es reconocido en gran medida por la salud pública mundial, los gobiernos ni las agencias de desarrollo, por la que la Organización Mundial de la Salud (OMS) lo clasificó como Enfermedad Tropical Desatendida (ETD) en abril del 2009^{5,6,14}. A pesar de que en el año 2013 fue quitada de la lista, el 9 de junio del 2017 vuelve a adquirir este estatus^{5,6,14}.

En la actualidad se reconoce que el ofidismo es una de las ETD con cifras más altas de incidencias y mortalidad, matando entre 270 y 340 personas por día a nivel mundial^{6,15}. Si bien no tiene el potencial epidémico de otras ETD, la tasa de mortalidad anual es ampliamente mayor que la atribuida a muchas de estas para las cuales se han realizado grandes esfuerzos para mitigarlas, mientras el ofidismo sigue estando rezagado^{4-6,8,15}.

Históricamente, el emponzoñamiento por el accidente ofídico ha recibido poca atención de las autoridades, de la industria farmacéutica y agencias financieras, lo que ha obstaculizado el desarrollo de estrategias efectivas para reducir el impacto de este problema^{5,6,8,15}. La principal razón de esto es la posición sociocultural de quienes la sufren, cuyas víctimas son personas de bajos recursos, trabajadores rurales y niños^{1,4-6,8,15}. Este flagelo está afianzado a la pobreza, involucrando desproporcionadamente a los que menos tienen, con 95% de los casos en áreas rurales de países tropicales y en vías de desarrollo^{1,4-6,8,15}.

Muchos de estos países son incapaces de solventar los costos provocados por el ofidismo, y en ellos no existe el seguro social^{5,7,15}. Se ha observado también que los habitantes de mayores ingresos, especialmente de Europa y América del Norte, tienen muy poca exposición a serpientes venenosas y no son conscientes del problema que el ofidismo supone para la salud pública^{4-6,8,15}.

La OMS y muchos científicos especializados en el tema afirman que la cantidad de accidentes y muertes provocadas por el ofidismo son difíciles de estimar, y no representan la epidemiología real de este flagelo⁴⁻⁸. Generalmente los números son estimados a partir de la literatura científica y los registros médicos, por lo que no representan con precisión las cifras reales⁴⁻⁸.

Las encuestas realizadas a la población de algunos países evidencian que la epidemiología real podría ser mucho mayor que la estimada por las estadísticas de los hospitales⁴⁻⁸.

Estos datos fueron confirmados en un relevamiento sobre el accidente ofídico en América, realizado en 2017 por el investigador Jean Phillippe Chippaux, donde se deja constancia de que la principal limitación que tuvo su trabajo fue la precisión y fiabilidad de las notificaciones de los servicios de salud⁴. Varios investigadores coinciden en que una de las principales causas de esto es el uso de la medicina tradicional⁴⁻⁸.

Se estima que 5.8 billones de personas están en riesgo de cruzarse con una serpiente venenosa^{5,6}. Estas cifras se traducen a 7400 personas mordidas por día, entre 1.8 y 2.7 millones de casos de envenenamiento por año, y entre 81000 y 138000 muertes anuales⁵⁻⁸.

En la Figura 2, se observa que Asia es el continente más afectado por este flagelo, con al menos 1 millón de envenenamientos por año, seguido en orden de disminución de casos por África y Oriente Medio, América Latina, el Caribe, Europa, Oceanía y finalmente Estados Unidos y Canadá⁵⁻⁸.

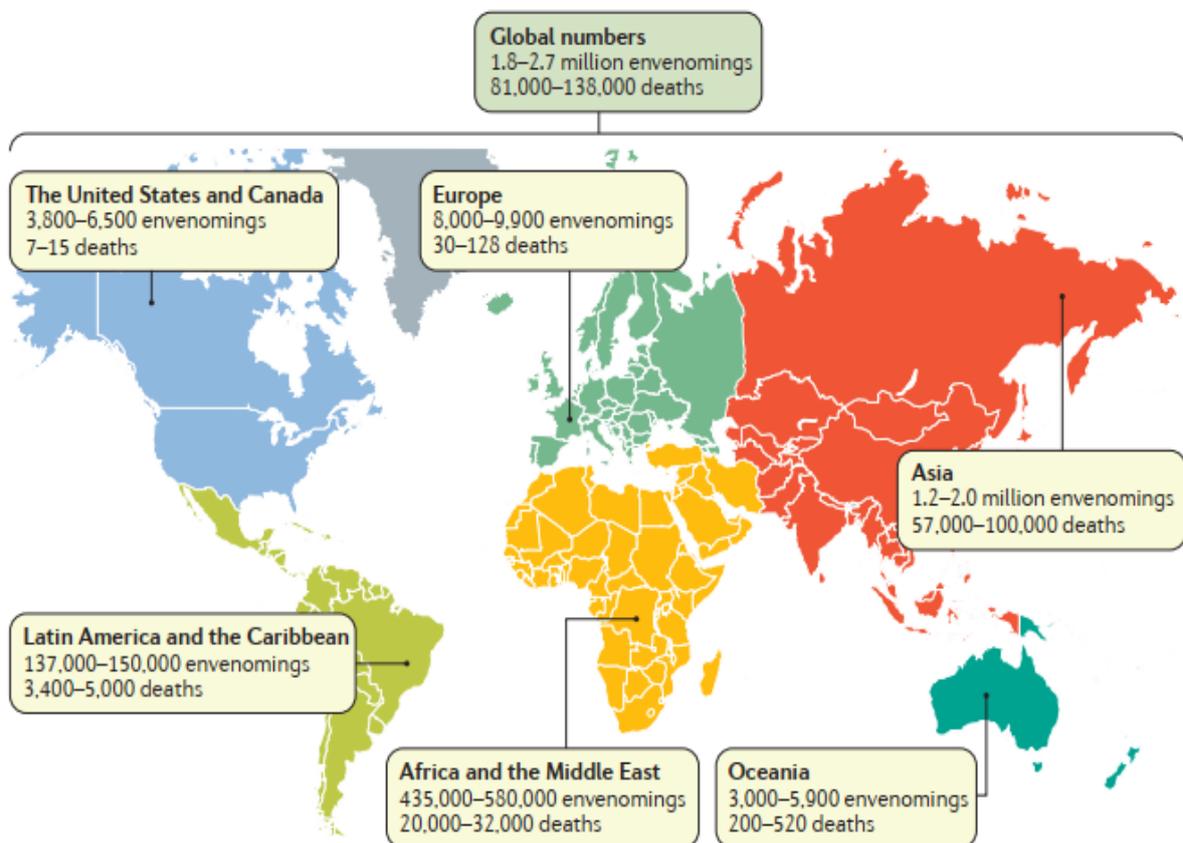


Figura 2. Cifras anuales estimadas de los casos de envenenamiento y víctimas fatales de ofidismo en cada continente. Modificado de Gutiérrez et al. (2017)⁵.

Es importante destacar que a pesar de que Oceanía tiene relativamente pocos casos de envenenamiento, el 8% de los casos son fatales, encabezando así la mayor tasa de mortalidad por envenenamiento⁵. La mortalidad es de 5% en África y Oriente medio y Asia, mientras que Europa, USA y Canadá tienen una tasa de muertes <1%⁵⁻⁸.

Debido a su condición como animales ectotermos, las serpientes se encuentran principalmente en climas cálidos, tropicales y subtropicales, razón por la que abundan en algunas regiones de África, Asia, América Latina y Oceanía^{1,3-5}. En muchos de estos países el encuentro entre humanos y serpientes es relativamente común, especialmente en zonas rurales donde la actividad agrícola coincide con la temporada de apareamiento y nacimientos, generalmente en épocas de lluvias y/o altas temperaturas^{1,4,5}.

La probabilidad de que ocurra un accidente ofídico se ve influenciada por varios factores, como el clima y la altitud, que tan adecuado pueda ser un territorio para que sea habitado por serpientes, así como la densidad poblacional humana^{1,4}. Muchos de los encuentros se deben a las actividades realizadas por el hombre, sobre todo la agricultura^{1,4}. Por otro lado, los factores que influyen sobre la gravedad de una mordida dependen de la especie y tamaño de la serpiente, así como del factor humano: edad y estado de salud de la víctima, accesibilidad a centros asistenciales y la disponibilidad de suero antiofídico^{4,5,8,15,16}.

EL VENENO DE LAS SERPIENTES

El veneno es un compuesto de gran complejidad y diversidad cuya finalidad son la caza y/o defensa, independientemente del animal que lo produzca^{5,13,17,18}. Entre los diversos linajes animales los venenos han evolucionado de forma diferente pero convergente, en una mezcla variable de proteínas de diversa naturaleza^{5,13}.

La presión selectiva que resultó en la adaptación del veneno en una especie dada puede aportar mucha información sobre la relación existente entre la toxicología evolutiva y clínica, pues son a menudo las toxinas con mayor actividad de incapacitación sobre las presas las que tienen mayor importancia médica en el contexto de un envenenamiento humano^{5,17,18}. Es por esta razón que identificar la base molecular de la adaptación en las serpientes venenosas a sus ecosistemas naturales, puede ayudar a identificar cuáles son las principales toxinas que deben neutralizarse para revertir los efectos del veneno, posibilitando el desarrollo de la próxima generación de tratamientos antiofídicos^{5,13,17,18}.

Los venenos de serpiente tienen composición variable, por lo que sus perfiles bioquímicos y los cuadros clínicos que provocan son distintos^{1,5,17,19}. Una vez en el organismo, algunas toxinas generan daño local y en tejidos adyacentes al sitio mordido, provocando con frecuencia secuelas permanentes^{5,17,19}.

Algunas toxinas circulan por los vasos sanguíneos y linfáticos, lo que les permite avanzar por el organismo atacando varios órganos^{5,11,17,19}. Por ejemplo, hay toxinas que provocan daño agudo en riñones o en el hígado, o bien, induciendo diversos desórdenes en el organismo como hemorragias y trombosis, que pueden desencadenar falla sistémica del organismo^{5,17,19}. Muchos venenos poseen neurotoxinas que atacan a los receptores musculares o la sinapsis provocando parálisis respiratorias y necrosis muscular. Esto estimula la liberación de componentes intracelulares como la mioglobina, que dañan el organismo y provocan entre otras cosas, falla renal.^{5,17,19}

Los venenos de las serpientes pertenecientes a la familia Viperidae provocan marcados efectos de daño local en el tejido y sistémicos a nivel de la coagulación, induciendo hemorragias, coagulopatías que conducen al choque hipovolémico^{5,17,19,20}. En la familia Elapidae, los venenos se caracterizan por su neurotoxicidad^{1,3,5,19}. Las toxinas responsables de esta atacan los receptores musculares y/o la sinapsis, causando parálisis de los músculos craneales inferiores, entre ellos, los que intervienen en la respiración y deglución^{5,19,21-23}. En el caso de la familia Colubridae, si bien se compone mayoritariamente de serpientes no venenosas, hay especies que sí lo son, y algunas cuyos venenos son comparables a los de los vipéridos o elápidos^{1,3,5,19}.

Las metaloproteasas del veneno de serpiente (SVMP - por sus siglas en inglés - Snake Venom Metallo proteinases) y las serinoproteasas de veneno de serpiente (SVSP – por sus siglas en inglés - Snake Venom Serine proteinases) son las principales responsables de los desórdenes a la hemostasis que provocan los venenos de la mayoría de los vipéridos y algunos elápidos y colúbridos^{5,19-21}. Las enzimas de estas familias actúan sobre la cascada de coagulación, promoviendo la activación de los factores de coagulación mientras que hidrolizan fibrinógeno y fibrina^{5,19-21}. El efecto general que provocan estas moléculas es el consumo excesivo de agentes coagulantes y fibrinógeno, volviendo la sangre incoagulable^{5,19-21}.

Los venenos hemorrágicos que poseen la mayoría de los vipéridos incrementan el riesgo de trombocitopenia y shock hipovolémico^{5,19-21}. Las SVMP y algunas fosfolipasas A2 (PLA2 – por sus siglas en inglés – Phospholipases A2) citotóxicas provocan daño

agudo a los riñones como efecto secundario a desórdenes en la hemostasis, o bien por acción directa del veneno sobre los mismos^{5,20,22}.

Como se puede apreciar en la Figura 3, las SVMP están presentes casi en exclusividad en los venenos de los viperidos, y en grandes proporciones^{5,11,18,20} Son las responsables de los desórdenes en la hemostasis, provocando diversas coagulopatías, como hemorragias^{5,11,19,22}.

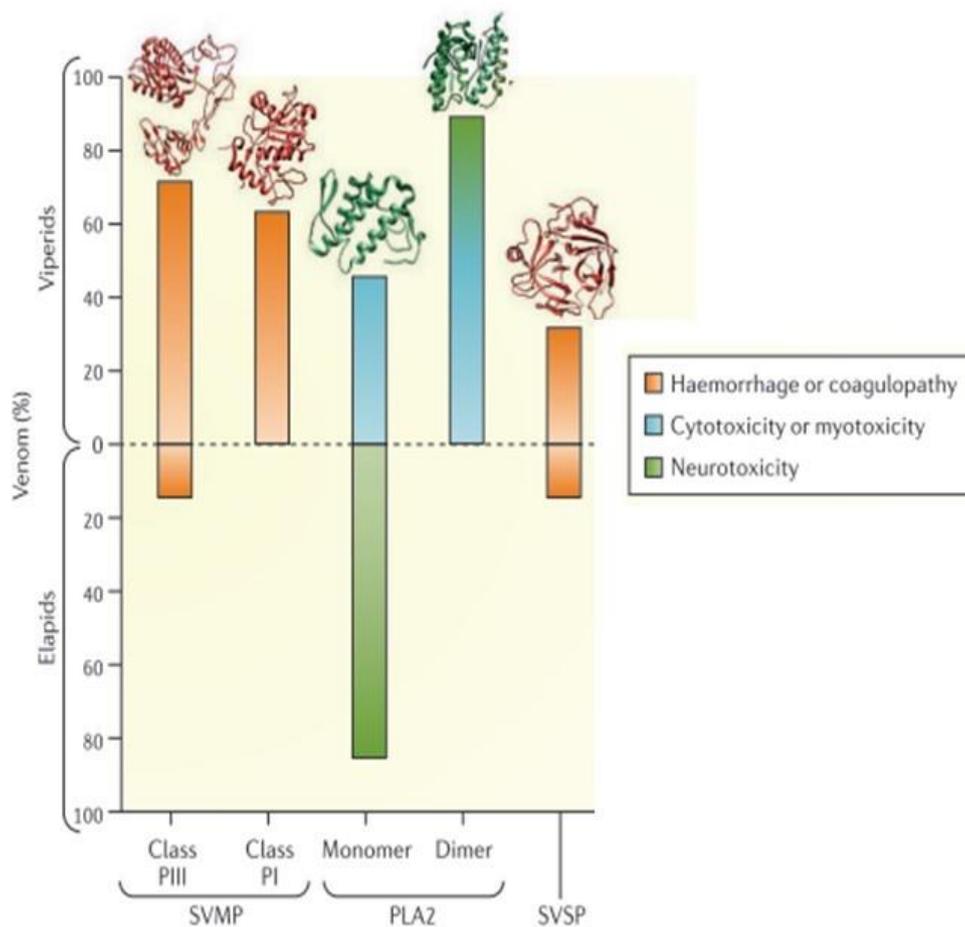


Figura 3. Distribución relativa de las principales familias de toxinas presentes en los venenos de Elápidos y Viperidos. Las siglas son por sus nombres en inglés. Modificado de Gutierrez et al, 2017⁵.

SVMP: Snake venom metallo proteinases. Se trata de proteasas cuyos principales efectos tóxicos perturban el sistema hemostático, y destruyen las paredes de los vasos sanguíneos.

PLA2: Phospholipases A2. Tienen actividad citolítica y miotóxica. También alteran la agregación plaquetaria.

SVSP: Su acción hemolítica causa coagulopatías e hipotensión.

Estas enzimas degradan proteínas y afectan la cascada de coagulación en varios niveles.^{5,11,19,20} Degradan fibrinógeno, el factor de von Willebrand (vWF), fibronectina y proteoglicanos de las membranas basales de los vasos sanguíneos^{5,11,24}.

Las SVMP hidrolizan el colágeno IV de las paredes de los epitelios y vasos sanguíneos, destruyéndolos y provocando la extravasación de su contenido^{5,11,19,20,22,23}. También hidrolizan los componentes de la matriz extracelular, como varios tipos de colágeno, ácido hialurónico y proteoglicanos, afectando la integridad de los tejidos, con el consecuente daño tisular a nivel local^{5,11,19,20}. En consecuencia, al degradar la interfaz entre la dermis y la epidermis, se forman ampollas y flictenas. Al mismo tiempo, la destrucción del tejido que promueven las SVMP contribuyen a que las demás toxinas puedan avanzar con mayor facilidad por el organismo^{5,11,19,20,22,23}.

El daño local en el tejido no solo se produce por la acción de las SVMP^{5,11,19}. La mionecrosis, es provocada por las PLA2^{5,11,19,25}. Estas enzimas provocan la destrucción de la membrana plasmática, algunas de forma directa y otras indirectamente, por la hidrólisis de fosfolípidos de membrana^{5,11,19,25}. Esta hidrólisis libera ácidos grasos (como ácido araquidónico) desencadenando reacciones que provocan dolor, la formación de edema y dañan los vasos linfáticos, por lo que su efecto es miotóxico, mionecrótico y hemolítico^{5,11,19,25}. Algunas pueden tener efecto neurotóxico, como la crotoxina del veneno de la *Crotalus durissus terrificus*^{11,19,25-27}.

Las toxinas mejor caracterizadas del veneno de serpiente posiblemente sean las SVSP, las cuales afectan la cascada de coagulación y el sistema fibrinolítico^{5,11,19}. La “Thrombin-like enzyme”, o “enzima tipo trombina”, como su nombre lo indica, es una proteína cuyo mecanismo de acción es similar al de la trombina^{5,11,19}. Digiere el fibrinógeno generando fibrina anormal, que no se estabiliza, generando consumo excesivo de fibrinógeno y causando severas alteraciones la hemostasis^{5,11,19}.

El cuadro clínico causados por el emponzoñamiento de los vipéridos, consiste en daño local y efectos sistémicos^{4,11,19,21,28,29}. A nivel local, la herida causada por los colmillos sangra por tiempo prolongado^{5,11,19,20}. En el sitio mordido hay dolor radiante inmediato e hinchazón que se extienden rápidamente por el miembro afectado, con eritema inflamatorio, inflamación de los vasos linfáticos y aparecen moretones, ampollas y flictenas^{4,11,19,21,28,29}. El tejido superficial, los tejidos blandos y músculo se necrosan, y es frecuente la aparición de infecciones secundarias^{4,11,19,21,28,29}.

Por otro lado, los efectos sistémicos incluyen: taquicardia o bradicardia, hipotensión y choque cardiovascular, sangrados severos espontáneos en nariz, encías y tractos respiratorio, gastrointestinal y urinario^{4,5,19,21,28,29}. Existen síntomas variables, muchas veces asociados a cada especie en particular^{4,5,19,21,28,29}.

La acción en conjunto de las toxinas hemorrágicas y citotóxicas del veneno de los vipéridos compromete seriamente los tejidos^{4,5,11,19,21,28,29}. El aumento de presión a causa del edema produce isquemia sobre las fibras musculares^{5,19}. Esto, sumado al daño a los vasos sanguíneos y el músculo esquelético, a menudo termina en secuelas permanentes, como discapacidad o amputación de miembro afectado^{4,5,11,19,21,28,29}.

El envenenamiento produce cuadros clínicos que necesitan control médico, por lo que las víctimas tienen que ser hospitalizadas, y una vez en el centro asistencial, se les administra suero antiofídico (SAO)^{4-6,8,15,16}. Luego de finalizado el tratamiento es necesario realizar un seguimiento del paciente y brindarle cuidados adicionales para sobrellevar las secuelas físicas y psicológicas del siniestro, lo que lamentablemente, rara vez ocurre^{4-6,8,15,16}.

Las complicaciones (y posibles secuelas) así como las muertes por el accidente ofídico, dependen mucho del manejo a la hora de atender cada caso, donde todo el sistema de salud en sí mismo tiene relevancia y cada paso es vital^{4,6,8,15,16}. Desde la proximidad de los centros asistenciales hasta la disponibilidad del suero antiofídico específico, incluyendo el equipamiento adecuado, que los protocolos terapéuticos sean los correctos y que el personal médico esté debidamente capacitado, algo que no suele ser así en muchos centros hospitalarios rurales^{4-6,8,15,16}. También es un hecho que el viaje hasta el centro asistencial más cercano puede extenderse por largos períodos de tiempo, en promedio más de 6 horas, y puede verse entorpecido por el transporte o por la falta de este.^{4-6,8,15,16} Esto supone un problema, ya que empeora el cuadro patológico y se dificulta su tratamiento^{4-6,8,15,16}. Muchos centros asistenciales no cuentan con suero para la terapia, por lo que se asiste a las víctimas de la mejor forma posible para mitigar los efectos tóxicos^{4,6,8,15,16}. Desafortunadamente, esto no suele ser suficiente, aumentando considerablemente la morbilidad y mortalidad del accidente^{4,6,8,15,16}.

OFIDISMO EN URUGUAY Y LA REGIÓN

En América, la responsabilidad de los casos de envenenamiento se debe a vipéridos (como *Crotalus*, *Bothrops* y *Agkistrodon*) y elápidos, siendo *Micrurus* el principal género de elápidos que provoca accidentes, aunque estos representan menos del 1% de los casos^{4,5,19}. Si bien la inmensa mayoría de las mordidas son provocadas por serpientes pertenecientes a los géneros mencionados, la realidad es que también ocurren accidentes causados por serpientes opistoglifas y aglifas, pero dichos casos, aunque representan una baja demanda de asistencia médica, están lejos de ser triviales^{4,5,19}.

En Uruguay el accidente ofídico es un evento de notificación obligatoria del grupo A según el decreto 41/012^{4,30,31}. Esto significa que se requiere notificación inmediata del accidente a través de la vía de comunicación más rápida disponible^{30,31}. El Centro de Información y Asesoramiento Toxicológico (CIAT), lleva registro de este evento, recibiendo las consultas y supervisando el diagnóstico, tratamiento y la administración de suero antiofídico específico^{9,12,30,31}. El CIAT recibe aproximadamente 100 casos anuales, de los cuales 60 corresponden a ofidios ponzoñosos, principalmente vinculados a tareas rurales^{4,11,30,31}. La tasa de mortalidad para el ofidismo en Uruguay es < 1%^{4,11,30}.

En nuestro país la mayoría de los accidentes ofídicos son de mediana gravedad, sin embargo, si no se recibe un diagnóstico y tratamiento adecuado pueden ser fatales^{11,12,30,31}. Las especies de ofidios que provocan los accidentes en Uruguay tienen venenos hemostáticos y necróticos^{9-12,32}. Accidentes provocados por las dos especies que poseen veneno neurotóxico, son excepcionales.^{9-12,32}

La epidemiología del ofidismo en el territorio nacional tiene sus picos de casos en el verano, seguido de la primavera, entre los meses de noviembre a abril, con la mayoría de los accidentes registrados en el mes de marzo^{11,12,31}. Esto se explica porque hay mayor actividad de los ofidios y aumento de la concurrencia de personas en el ambiente natural de estos reptiles^{4,11,12,31}. Estos eventos ocurren predominantemente en áreas rurales y aunque el ofidismo afecta indistintamente a personas de ambos sexos y de cualquier edad, la mayoría de los accidentados son hombres^{4,11,12,31}. La franja etaria con mayor incidencia es entre los 15 y 30 años^{4,11,12,31}. Los departamentos con más accidentes son Tacuarembó y Cerro Largo, mientras que Flores y Montevideo son los que gozan del menor número de accidentes^{4,11,12,31}.

A pesar de que en territorio nacional habitan cuatro especies de serpientes potencialmente peligrosas para el hombre: la crucera (*B. alternatus*) la yara (*B. pubescens*) la cascabel (*C. durissus terrificus*) y la coral (*M. altirostris*) casi la totalidad de los accidentes (entre 60 y 70 anualmente) son provocados por las serpientes del género *Bothrops*^{9-12,30}. No obstante, recientemente han ocurrido accidentes causados por otras especies: la culebra de collar (*Phalotris lemniscatus*) y el primer accidente registrado en el país por la coral (*M. altirostris*)^{12,32,33}. En lo que respecta a la serpiente de cascabel, hace más de 50 años que no se registran accidentes, principalmente porque está casi extinta en nuestro país^{9,10,12,32,33}.

El género *Bothrops* tiene dos representantes en nuestro país: *B. pubescens* (“yara” o “yará”) y *B. alternatus* (“crucera”)^{9,10,31}. Estas serpientes tienen la cabeza bien diferenciada y a pesar de que no son muy musculosas, su aspecto es robusto^{9,10,31}. Tienen hábitos crepusculares y nocturnos^{9,10,31}. Su dentición es solenoglifa (Figura 1); y al sentirse amenazadas adoptan posición de ataque, enrollando su cuerpo, dejando la cabeza levantada y el cuello en forma de “S”^{9,10,12,31}. Generalmente al adoptar esta postura agitan la cola vigorosamente^{9,10,12,31}.

B. alternatus mide aproximadamente 1.5 m de largo y su coloración varía del castaño hasta tonalidades amarillentas^{9,10,12,31}. En el lomo tiene un característico diseño en forma de “C” o tubo de teléfono, de color más oscuro que el fondo y los rebordes blanquecinos^{9,10,12,31}. Debajo de la mandíbula presenta dos bandas, similares a una “V” que se ensancha hacia el cuello^{9,10,12}. Se suele encontrar en zonas bajas y húmedas con pastizales o pajonales, generalmente cercana a cursos de agua^{9,10,12,31}. Esta especie es la que provoca más accidentes dado que responde agresivamente al sentirse amenazada^{9,10,12,31}.

B. pubescens no suele superar 1 m de longitud^{9,10,12,31}. Generalmente son de color grisáceo con manchas en forma trapezoidal más oscuras, que se ensanchan hacia los flancos^{9,10,12,31}. Habita serranías pedregosas y es poco frecuente en zonas bajas y húmedas^{9,10,12,31}.

El veneno de estas serpientes es una mezcla compuesta principalmente por proteínas y péptidos (entre un 90 - 95%) donde la mayoría son enzimas pertenecientes a las familias de las SVMP, SVSP, PLA2 y L-Amino oxidasas (LAAO – por sus siglas en inglés – L-Amino acid oxydase)^{11,28,29,34}. Estas enzimas son las responsables de provocar un

marcado daño local, y severos desórdenes en la coagulación, que pueden resultar en la amputación del miembro afectado^{11,28,29,34}.

Las enzimas proteolíticas del veneno bothropico, en su mayoría SVMP y SVSP, son las responsables de desestabilizar la hemostasis, afectando la cascada de coagulación en diferentes niveles^{5,11,28,34}. Por ejemplo, activan factores de coagulación como el factor V, el factor X y la protrombina, al mismo tiempo que se estimula la formación de fibrina mediante enzimas tipo trombina^{5,11,28,34}. Así, se ven alterados diversos procesos, como la coagulación, la agregación plaquetaria, la fibrinólisis y la presión sanguínea^{5,11,28,34}.

EL SUERO ANTIOFÍDICO

En la actualidad, y desde hace más de un siglo, los sueros antiofídicos son el único tratamiento real y efectivo para los efectos sistémicos del veneno y para evitar las víctimas fatales del accidente ofídico^{5,7,13,16}. Desde hace más de 120 años los SAO son producidos a partir del plasma hiperinmune de animales domésticos de gran porte, principalmente caballos y ovejas. Pero poco han cambiado en los últimos 50 o 60 años^{5,7,13,16}.

Para su producción se requiere de; veneno (generalmente provista por un serpentario o adquirido comercialmente), disponibilidad y mantenimiento de los animales inmunizados (caballos, ovejas, entre otros), una planta de producción (para tratar el plasma y purificar los anticuerpos) y el envasado con su debido etiquetado^{5,16,35}. Cada uno de estos pasos influye en el costo total del producto^{16,35}.

Estas soluciones son concentrados de inmunoglobulinas (o de sus fragmentos (F(ab')₂s o Fabs), generalmente de caballo u oveja, al que se le inyectan cantidades controladas de veneno para producir anticuerpos contra las toxinas de este^{5,7,16,35}. En su producción, toda la IgG extraída del plasma es tratada con pepsina para romper la molécula y separar la región Fc del anticuerpo de los fragmentos F(ab')₂^{5,35}. Esto permite reducir las reacciones adversas disparadas por la región Fc^{5,35}. De forma similar, se puede usar papaína para tratar los IgG y generar pequeños fragmentos Fab⁵. No obstante, esto trae la desventaja de que se filtra mucho más rápido y se elimina del organismo con facilidad⁵. Algunos sueros consisten en moléculas enteras de IgG, usualmente purificados mediante precipitación con ácido caprílico^{5,13,35}.

Los SAO producidos pueden ser monovalentes, si son efectivos únicamente contra el veneno de una especie dada, o polivalentes si fueron diseñados para combatir los

venenos de mayor importancia médica de especies comprendidas en un área geográfica determinada^{5,16,35}.

Curiosamente, aunque el SAO se ha estado usando como tratamiento desde hace un centenar de años, aún tienen sus limitaciones y desventajas^{5,7,8,13,16,35}. Posiblemente las más citada en general son la escasez a nivel global y el costo^{5,7,8,13,16}. En las últimas décadas grandes productores de sueros antiofídicos detuvieron su producción, principalmente por razones comerciales^{5,7,8,13,16}. Otras de los problemas existentes son la especificidad, potencia de neutralización y las reacciones adversas que genera su administración en las víctimas^{5,7,8,13,16,20,35}.

Partiendo de la base de que la producción de suero es costosa por todo lo que se requiere para su producción, como se comentó anteriormente, otros factores influyen en su precio^{5,7,8,16}. El transporte y almacenaje de los SAO depende de una delicada cadena de frío, la cual casi siempre se rompe^{8,15,16}. Dado que muchas veces la cadena de frío no puede mantenerse, algunos productores liofilizan su suero para evitar que los mismos se desestabilicen por la temperatura^{5,8,15,16,35}. Si bien esto es ventajoso, porque disminuye el riesgo de reacciones adversas, supone un costo extra en el producto^{5,7,8,16,35}. En las regiones donde el accidente ofídico es especialmente abundante el tratamiento supera por mucho el presupuesto de las víctimas^{5,7,8,16}. El elevado costo que tiene el tratamiento con SAO lleva a que estas deban endeudarse para poder pagarlo, por lo que el ofidismo es la enfermedad tropical más cara^{5,7,8,16}.

La especificidad es un factor a tener en cuenta en muchos aspectos^{5,13,16,35}. La acción de un suero antiofídico está restringida a la especie (o género) de la cual se extrajo el veneno para su producción^{5,16}. Esto es así tanto para SOA monovalentes, como los polivalentes, lo cuales son específicos contra un pool de venenos, generalmente asociado a una región geográfica específica^{5,13,16}. Los sueros antiofídicos comercializados en regiones inapropiadas son completamente ineficientes, ya que no están producidos por ni para las especies de dicha región^{5,16}. Estos sueros son una importante causa de daño, no solo a nivel económico sino que también para las víctimas del ofidismo, ya que consumen los recursos de los sistemas de salud y ponen en riesgo la vida del paciente^{5,13,16}. Aunque se estima que en los países de medio y bajos recursos el porcentaje de antídoto efectivo oscila entre <5% hasta 20% de la cantidad requerida, por la variabilidad en la potencia y el mercado inapropiado, la cantidad de tratamientos efectivos es mucho menor^{13,16}.

Los problemas de especificidad van de la mano con la gran desventaja que enfrentan los sueros antiofídicos respecto a su eficacia^{5,35,36}. La diversidad filogenética existente entre las serpientes de las cuales se extrae el veneno para hiperinmunizar a los animales influye en la especificidad de las IgG generadas^{5,35,36}. Esto se traduce a que la cantidad de viales requeridos para el tratamiento clínico sea mayor, aumentando con cada vial administrado el riesgo de efectos adversos en el paciente, y el costo del tratamiento^{5,35,36}. Se estima que solo entre 10 y 15% de las IgG en un vial de suero antiofídico son realmente específicas contra las proteínas del veneno^{5,35,36}.

Los problemas de eficacia y las reacciones adversas están directamente ligados a su diseño y producción^{5,35,36}. Cerca del 70% de los anticuerpos presentes en los sueros no están dirigidos contra las toxinas del veneno, si no contra todos los antígenos con los que el animal inmunizado se ha cruzado en su vida^{5,35,36}. Las reacciones adversas tempranas son aquellas que se ven dentro de las primeras 24 h^{35,36}. La mayoría de los casos donde ocurren reacciones adversas tempranas es en pacientes que no han tenido contacto previo con SAO^{35,36}. Se sospecha que estas reacciones se deben a la hipersensibilidad tipo I y a la activación del complemento por parte del sistema inmune^{35,36}. Se puede observar malestar general, erupciones, broncoespasmo y, en casos graves, choque anafiláctico^{5,35,36}. Además, la presencia de endotoxinas como contaminantes en SAO de calidad pobre, puede inducir fiebre^{35,36}. Las reacciones adversas tardías, que incluye: inflamación de articulaciones, mialgias y urticaria, están asociadas a hipersensibilidad tipo III^{35,36}.

Hoy en día muchas regiones afrontan una crisis dada la escasez de suero antiofídico, que ya de por sí es un tratamiento cuya disponibilidad y accesibilidad siempre ha sido bastante limitada^{5,7,8,16}. En las últimas décadas, el mercado sufrió el cese de producción de muchas empresas, algo que solo acentuó este problema que supone una amenaza para la vida de millones de personas^{5,7,8,16}. Esta situación pone en aún más en evidencia la necesidad de considerar las realidades comerciales en el desarrollo de nuevos tratamientos antiofídicos, para lograr obtener mejores sueros polivalentes, eficaces, más seguros y económicos^{5,7,8,16}.

Por las razones ya expuestas, la producción de antivenenos se desenvuelve en un mercado frágil, no siendo rentable para los fabricantes^{7,14,35}.

En las últimas décadas la producción ha estado dominada principalmente por laboratorios de salud pública que han podido mantenerse al ritmo de las nuevas

tecnologías farmacéuticas^{7,14,35}. Mientras que para las industrias privadas (si bien han tenido una mayor relevancia, especialmente en Asia y África) las condiciones del mercado no favorecen el desarrollo e innovación hacia nuevas tecnologías^{7,14,35}. Por ello es necesario poder fomentar y reforzar la colaboración entre la investigación y la producción para mejorar cada aspecto de los sueros antiofídicos y lograr el desarrollo de mejores sueros, más seguros, eficientes y baratos^{7,14,35}.

LA PRÓXIMA GENERACIÓN DE ANTIVENENOS

Dada la situación, inhibidores específicos podrían tener un gran potencial como tratamiento, gracias a su bajo costo, buena termo-estabilidad y distribución rápida por el tejido^{5,18,20}. Se ha reportado que algunos péptidos inhibidores de metaloproteasas poseen gran eficacia para neutralizar hemorragia y necrosis inducida por estas enzimas^{5,18,20}. Se puede suponer que combinar inhibidores de metaloproteasas y fosfolipasas sería una alternativa rápida, efectiva y de amplio espectro para tratar el daño tisular producido por el veneno^{5,18,20}. La investigación en el área de los inhibidores es una fuente potencial de nuevas drogas para tratar el accidente ofídico^{5,18,20}. También se han dirigido esfuerzos en la síntesis de nanopartículas para secuestrar y neutralizar toxinas presentes en los venenos, por lo que tener éxito en estos abordajes ofrecería sustanciales ventajas económicas y logísticas^{5,18,20}.

Actualmente, algunos enfoques de investigación en la producción no tradicional de mejores SAO incluyen el uso de nanopartículas, antivenenos basados en plantas, inmunización con ADN, producción de epítopes sintéticos en cadena y el desarrollo de sueros recombinantes^{5,7,16,23,35}. Estos últimos se basan en la mezcla de anticuerpos IgG humanizados, oligo o monoclonales, que sean específicos contra las toxinas de los venenos^{5,7,16,35}. Con ayuda de la proteómica se podría “ajustar” el blanco de las toxinas de mayor relevancia en cada veneno^{5,7,16,35}. Si fuera posible concretar esto, se obtendrían sueros más efectivos, seguros y potentes, reduciendo los riesgos de reacciones por hipersensibilidad^{5,7,16,35}.

Hay grupos de investigación enfocados en el desarrollo de un SAO recombinante, elaborado únicamente con cadenas pesadas de IgG₃ de camello, los cuales tienen un tamaño pequeño, son termoestables y de gran especificidad, lo que los vuelve candidatos terapéuticos prometedores para la prevención de la necrosis inducida por el veneno⁵.

Los recientes avances en proteómica han permitido el desarrollo de nuevas herramientas para comprender mejor las toxinas que componen los venenos de diversas especies animales^{5,13,20}. Gracias a los rápidos avances en dicha área y del aumento en la disponibilidad de los transcriptomas de las glándulas de veneno, fue posible acceder a información esencial en la composición proteica de los venenos, lo que permitió inferir el rol que estas cumplen⁵. Combinando la información obtenida de la proteómica y la transcriptómica, junto con la secuenciación del ADN, es posible desarrollar IgG que apunten directamente contra las toxinas de mayor importancia clínica⁵. Un enfoque posible para lograr esto, sería el analizar el transcriptoma de cada grupo o familia de toxinas expresadas en el veneno de una serpiente, o una familia de estas, para identificar secuencias que sirvan como epítope⁵. De esta forma, se podría producir una cadena de epítopes sintético diseñados para generar múltiples IgG diferentes de un grupo antitoxina, con la capacidad de neutralizar un grupo entero de toxinas, independientemente de la especie de serpiente⁵. A través de este procedimiento se podría desarrollar un suero antiofídico polivalente, agrupando todas las IgG de los diferentes grupos antitoxina⁵.

Como la eficacia de la dosis es otro aspecto para mejorar de los SAO, actualmente hay grupos de trabajo intentando aislar linfocitos B de ratones inmunizados con estos epítopes en cadena, para luego manipular los genes que codifican las IgG, con la finalidad de producir anticuerpos monoclonales y producir un suero antiofídico polivalente compuesto únicamente de estos.⁵ Aunque el suero resultante sería capaz de neutralizar el veneno de un grupo definido de serpientes, la humanización de dichos anticuerpos monoclonales supondría una mejora sustancial en la disminución de los efectos adversos en los SAO actuales⁵.

Otra estrategia que se sugiere es el desarrollo de SAO recombinantes mediante el monitoreo de microarrays específicos de toxinas de alta densidad para identificar los epítopes de las toxinas de mayor importancia médica⁵. Esto, en conjunto con la producción de IgG humanizados a través de nuevas técnicas biotecnológicas, podría conducir a la producción de nuevos sueros cuyo costo sería similar al de los actuales, pero con una relación dosis-eficacia ampliamente mejorada⁵.

La producción de SAO a gran escala, a partir de anticuerpos recombinantes necesita de sistemas de expresión adecuados, ya que pueden ser expresados tanto en células eucariotas como procariotas, pero es necesario considerar los pros y contras de cada uno³⁵. La expresión en células procariotas es de bajo costo y fácil de manejar, pero el rango de anticuerpos que se pueden producir es limitado por la incapacidad de estas células a realizar modificaciones postraduccionales³⁵. Por otra parte, las células eucariotas si son capaces de realizar modificaciones postraduccionales, pero mantenerlas es caro, son difíciles de mantener y su crecimiento es más lento³⁵.

Así mismo, el desarrollo de estos nuevos tipos de sueros antiofídicos no sería suficiente para resolver otros aspectos conflictivos del ofidismo^{5,7,8,13,15}. Es imprescindible que sea complementado con el análisis de la relación costos-accesibilidad de los servicios de salud, (y otras áreas relacionadas con las ciencias sociales) para que a largo plazo se desarrollen políticas sociales que ofrezcan a las víctimas de ofidismo, un tratamiento seguro, efectivo y accesible, tanto económicamente como en disponibilidad.^{5,8,13}.

INHIBIDORES NATURALES

Desde la antigüedad se reconoce que hay animales resistentes al veneno de serpiente; desde las propias serpientes, hasta los mamíferos^{17,18,20}. Actualmente se cree que la resistencia a los venenos se debe a dos factores no excluyentes entre sí, como lo son mutaciones en los receptores blanco de las toxinas de los venenos, o bien, la presencia de proteínas séricas que neutralicen las toxinas^{17,18,20-22,37}.

De estas últimas se conocen dos tipos, inhibidores de PLA2 (PLI – de sus siglas en inglés – Phospholipases A2 inhibitors), capaces de inhibir el efecto miotóxico (y neurotóxico de algunas PLA2), y los inhibidores de SVMP (SVMPI – de sus siglas en inglés – Snake Venom Metallo proteinases inhibitors) que suprimen los efectos hemorrágicos característicos de los envenenamientos por vipéridos^{17,18,20-22,24}.

En el siglo XVIII se comenzó la búsqueda de inhibidores naturales para las metaloproteasas, ya que se había observado la resistencia de las serpientes a su propio veneno, y en los últimos 40 años, los SVMPI fueron principalmente aislados del suero de diversos animales²⁰⁻²². Al día de hoy, todos los SVMPI aislados han demostrado capacidad específica de inhibir total o parcialmente la actividad hemorrágica, tanto del veneno como de las metaloproteasas purificadas²⁰⁻²².

Los SVMPI que han sido aislados hasta el momento son glicoproteínas oligoméricas acídicas, cuya actividad se mantiene en un amplio rango de pH y temperatura^{18,20,38,39}. Se los clasifica en dos clases; de alto peso molecular, que rondan entre 700 y 1000 KDa, y de bajo peso molecular, que van desde los 50 hasta 90 KDa^{18,20,38,39}. Los ejemplos más estudiados de estos últimos son HSF, extraído de suero de la serpiente *Protobothrops flavoviridis* (serpiente de Habu), mientras que de mamífero se logró aislar Oprin, y DM43, ambos de *Didelphis virginiana* (zarigüeya americana o tlacuache nortero)^{17,18,20,21,34}.

Los SVMPI encontrados en sueros de serpiente son clasificados dentro de la superfamilia de la cistatina, mientras que los SVMPI séricos de mamífero pertenecen a la superfamilia de las inmunoglobulinas^{17,18,20,21,34}. Por su parte, el único SVMPI aislado del extracto muscular del erizo europeo (*Erinaceus europaeus*) pertenece a la familia de la ficolina/opsonina P35^{18,20}.

A partir del suero de *P. flavoviridis* fue purificado el primer SVMPI, al que se llamó HSF (Habu snake factor)^{17,18,20,21,34,39}. HSF es una glicoproteína de 70 KDa, posiblemente homodimérica en solución, capaz de inhibir (*in vitro* e *in vivo*) la actividad proteolítica de numerosas enzimas pertenecientes a la familia de las SVMP^{20,21}. Algunos estudios indican que necesitaría interactuar con proteínas séricas de bajo peso molecular para llevar a cabo su acción neutralizante^{20,21}.

Aparte de HSF, BJ46a es otro inhibidor de SVMP muy estudiado, aislado del suero de la jararaca (*Bothrops jararaca*). BJ46a tiene un peso de 79 KDa y al igual que HSF, su estructura podría ser homodimérica^{20,21}. Del suero de la mamushi y la mamushi japonesa (*Gloydius blomhoffi brevicaudus* y *Gloydius blomhoffi*) se purificaron dos SVMPI, cMSF y jMSF respectivamente²⁰. Estas proteínas inhibitoras de 40.5 KDa presentan una homología de secuencia con HSF del 83% para la primera y 84% para la segunda, pero entre ellas, no inhiben las mismas SVMP²⁰. Al igual que HSF su acción inhibitoria parece estar ligada a la interacción con proteínas séricas de bajo peso molecular²⁰. Al día de hoy se han purificado SVMPI que no han sido completamente caracterizados, como NtAH, que es un oligómero de 880 kDa^{20,21}.

Se ha comprobado experimentalmente que la serpiente índigo oriental, *Drymarchon couperi*, que se alimenta de vipéridos, es resistente a la actividad hemolítica y las SVMP de su veneno⁴⁰. A pesar de ello, estas serpientes no son completamente resistentes ya que se han reportado hinchazón y necrosis en la zona de la mordida⁴⁰.

Así mismo, se cree que su resistencia a la actividad hemolítica no se deba a una proteína sérica, si no a elevadas concentraciones de vitamina E en su suero⁴⁰. En el mismo trabajo que se hizo este descubrimiento, los investigadores también encontraron que el suero de *Thamnophis marcianus*, una culebra que no es ofiófaga como *D. couperi*, tiene más potencia neutralizante contra las SVMP que el suero de esta última⁴⁰. El hecho de que grandes concentraciones de vitamina E puedan inhibir la actividad tóxica de alguno o varios componentes del veneno, implica un posible enfoque novedoso para el desarrollo de nuevos tratamientos contra el accidente ofídico⁴⁰.

En mamíferos, los primeros reportes de resistencia al veneno datan del siglo XIX²⁰. Dentro de esta clase de animales, la resistencia a los venenos parece haber evolucionado únicamente en especies que habitualmente predan o son predadas por serpientes venenosas^{17,20}.

El primer factor antihemorrágico purificado del suero de un mamífero fue de la zarigüeya *D. virginiana*, al que se llamó AHF, un SVMPI de 68 KDa que es estable entre 0 y 37 °C, y a pH entre 3 y 10^{17,20}. A partir del suero de mamíferos, se han purificado numerosos inhibidores de metaloproteasas, especialmente del suero o plasma de diversas especies de zarigüeyas^{17,20}. Tanto para zarigüeyas como mangostas ofiófagas, se ha podido secuenciar proteínas neutralizantes presentes en su suero que tienen una elevada homología de secuencia con la glicoproteína α 1B humana^{17,20}.

Otros ejemplos de SVMPI purificados de mamíferos son: Oprin, glicoproteína capaz de inhibir varias SVMP, también aislada del suero de *D. virginiana*^{17,18,20,24}. Un complejo dimérico llamado “Complejo Antibothrópico” (ABC), que demostró, in vitro e in vivo la capacidad de bloquear la actividad hemorrágica, los efectos edematogénicos e hiperalgésicos del veneno de *B. jararaca*^{17,18,20,24}. Este complejo también se encuentra en la leche materna de la zarigüeya común, *Didelphis marsupialis*, lo que promueve la defensa de las crías^{17,18,20,24}.

Erinacin es el nombre del factor antihemorrágico extraído del tejido muscular de *E. europeus*^{17,20}. Se trata de una proteína de 1040 KDa, perteneciente a la superfamilia de la ficolina/opsonina P35^{17,20}. Este SVMPI consta de dos subunidades que al ser disociadas, resultan en la pérdida de su actividad antihemorrágica^{17,20}.

Algunas especies del género *Didelphis* son resistentes a los efectos de las SVSP, PLA2 neurotóxicas, LAAO y otras toxinas de algunos venenos, pero no se han podido encontrar inhibidores en sus sueros^{17,24}. Además, recientemente se descubrió que

poseen resistencia a las Lectinas tipo C (CTL)^{17,24}. El factor de von Willebrand (vWF) es una proteína involucrada en la coagulación de la sangre, que en zarigüeyas resistentes al veneno ha pasado por un rápido proceso de evolución adaptativa²⁴. vWF tiene modificaciones en sus aminoácidos que puedan explicar sus propiedades²⁴. Esta proteína se une a un subgrupo de CTL del veneno, induciendo la agregación plaquetaria²⁴.

El suero de la ardilla californiana (*Spermophilus beecheyi*) puede reducir la actividad hemolítica y proteolítica del veneno de la cascabel *Crotalus oreganus*²². Debido a la presencia de un SVMPI de ~108 KDa, esta especie tiene la capacidad de reducir más del 75% de la actividad de algunos venenos como el anteriormente mencionado, pero no parece ser muy efectivo para otros vipéridos²². Así mismo, la capacidad de *S. beecheyi* de resistir al envenenamiento varía entre poblaciones²².

El hecho de que las plantas posean propiedades medicinales cae en el escepticismo, por lo que siguen pasando desapercibidas y no son tomadas en cuenta^{18,23}. A pesar de ello, se ha reportado que extractos de *Parkia biglobosa* (algarroba africana) aplicada en roedores, disminuye los efectos del veneno de la cobra escupidora, *Naja nigricollis*, y que compuestos de las semillas de la leguminosa *Mucuna pruriens* son activadores de la coagulación^{18,23}.

La carqueja (*Baccharis trimera*) tiene capacidad de combatir los efectos del veneno de serpientes del género *Bothrops* gracias a Bt-CD, un componente activo con propiedades antiproteolíticas y antihemorrágicas²³. Se ha comprobado que Bt-CD disminuye la actividad proteolítica del veneno de *B. alternatus* aproximadamente en un 70%²³.

Basados en las diversas desventajas de los SAO actuales, la investigación enfocada en inhibidores naturales del veneno de serpiente, puede ser un campo más que prometedor para impulsar el desarrollo de nuevos tratamientos, y/o complementar los actuales combinándolos con estos inhibidores de origen animal o vegetal^{5,17,18}.

LAS MUSURANAS

Dentro de la literatura se describe un curioso grupo de serpientes sudamericanas a las que se conoce vulgarmente como “musuranas”^{9,10,41-46}. Este nombre hace referencia a diferentes especies de serpientes que comprenden los géneros *Boiruna*, *Clelia* y *Rhachidelus*^{9,10,41-46}. Dichos ofidios presentan una sorprendente similitud morfológica y

hábitos ofiófagos, que bien podrían compararse con *D. couperi*, y algunos ejemplares de culebras del género *Lampropeltis*^{9,10,40-46}.

Todas estas serpientes son miembros de la familia Colubridae^{9,10,40-47}. Tienen tamaño mediano a grande, de cuerpo relativamente robusto, y (al menos el dorso) completamente negro en los adultos, ya que algunas cambian de color a lo largo de su vida^{9,10,40-47}. Son serpientes de hábitos ofiófagos, que dan muerte a su presa por constricción, y posiblemente con su ponzoña^{9,10,40-47}. Otra característica que comparten es la resistencia al veneno, algo que podría ser el resultado de convergencia evolutiva debido a sus hábitos alimenticios^{40,41,44,47-50}.

Rhachidelus brazili se alimenta exclusivamente de otras serpientes, incluyendo ponzoñosas⁵⁰. Se ha reportado que esta musurana no es sensible al veneno de otros ofidios, ya que al ser mordida no presenta síntomas de envenenamiento⁵⁰. También se observó que si se juntaban ejemplares de *R. brazili* con otras serpientes venenosas, y la primera no tiene intenciones de alimentarse no las agrede, ni tampoco se defiende cuando es atacada⁵⁰.

Las clelias son conocidas por su resistencia al veneno, particularmente *Clelia clelia*, razón por la cual se han publicado algunos trabajos al respecto^{37,42,49}. A principios del 82, Cerdas y Lomonte publicaron un artículo donde mencionan a otros autores que observaron esta particularidad en dichas serpientes⁴⁹. Sin embargo, describen que a causa de los múltiples cambios que ha sufrido la taxonomía y nomenclatura de los géneros *Clelia*, *Pseudoboa* y *Oxyrhopus*, no aseguran ni descartan que los trabajos previos que citan correspondan efectivamente a la especie que ellos estudian, *C. clelia*⁴⁹. Los autores de ese trabajo someten a 12 ejemplares de *C. clelia*, de diferente peso y tamaño, al veneno de diversas serpientes venenosas pertenecientes a las familias Viperidae y Elapidae, ya sea por mordida natural o por inyección intramuscular del veneno⁴⁹. Sorprendentemente, los autores reportan que en todos los casos las clelias sobrevivieron y no mostraron efectos locales visibles ni conductuales⁴⁹. Por estas razones, concluyen y destacan lo notable de la ausencia de cuadros locales, así como la resistencia a los venenos de dos especies que no se encuentran en la distribución geográfica de *C. clelia*⁴⁹. Finalmente sugieren que la resistencia de *C. clelia* puede surgir de la ausencia de receptores en para el veneno, y/o la presencia de factores en el suero que neutralicen sus componentes⁴⁹.

En un trabajo posterior, Lomonte, Cerdas y Gutiérrez, evalúan la capacidad del suero de *C. clelia* para neutralizar las toxinas responsables de los efectos locales producidos por el veneno de *Bothrops asper*³⁷. En dicho trabajo, se hace mención a que una de las mayores flaquezas de los sueros antiofídicos actuales es la neutralización parcial (o nula) del daño local de los tejidos provocados por la mordida de un vipérido^{5,37}. Por ello evaluaron la administración del suero en ratones, donde observaron que el suero de *C. clelia* tenía actividad miotóxica similar al veneno, aunque era capaz de neutralizar la actividad hemorrágica de este³⁷. Los autores reportan que al tratar con calor el suero previo a su inyección, este pierde sus propiedades tóxicas y disminuye su eficacia para neutralizar el veneno³⁷. A pesar de ello, compararon la efectividad del suero de esta serpiente contra un suero antiofídico comercial, resaltando que el suero de *C. clelia* tenía mayor potencia de neutralización³⁷. Posteriormente, se comprobó que *C. clelia* ya nace con la capacidad de neutralizar el efecto hemorrágico del veneno de *B. asper*, y no es adquirida por la alimentación con serpientes venenosas⁴².

Si bien en Uruguay no habitan ni *R. brazili* ni *C. clelia*, esta última ha sido citada para nuestro país por la sorprendente similitud morfológica con *B. maculata*, pero esto fue desestimado⁹. Como esta especie cohabita con otras pertenecientes al género *Clelia*, y la extraordinaria morfología externa que comparten, históricamente han existido confusiones taxonómicas entre ellas, como por ejemplo entre *B. maculata*, *C. clelia* y *Clelia plúmbea*^{44,49}. *B. maculata* ha sido clasificada en múltiples ocasiones en diferentes géneros desde su primera identificación como especie válida (*Oxyrhopus maculatus* (Boulenger, 1896))⁴⁴. Entre estos géneros se encuentran: *Clelia clelia clelia*; (Freiberg, 1968), *Clelia occipitolutea* (Bailey, 1970), *C. clelia* (Di Fonzo de Abalos&Bucher), *Clelia rustica* (Bergna& Álvarez, 1990), *Clelia spp* (Norman, 1994), siendo *C. clelia* la especie con la que mayor confusión ha generado⁴⁴.

BOIRUNA MACULATA

El género *Boiruna*, creado por Hussam Zaher fue nombrado de esta forma por las palabras del Tupí-guaraní “Mboi+r+ú” y “una” que significan, respectivamente “que come serpientes” y “negro”, características que claramente identifican a las 2 especies de este género⁴⁷.

Boiruna maculata (BOULENGER, 1896), comúnmente llamada “musurana” o “musurana negra” es una especie de serpiente perteneciente a la familia Colubridae, de tamaño mediano a grande^{10,41,44,51}. Las mismas alcanzan 1.8 metros de largo, pero existen

registros de ejemplares que sobrepasan este tamaño^{9,10,41,44,47,51}. Tienen cuerpo robusto, algo comprimido y cola relativamente corta, características típicas de serpientes terrestres^{10,41,44,51}. La cabeza es pequeña, moderadamente diferenciada del cuello en adultos, con el hocico redondeado y frontalmente aplanado^{9,10,41,44,51}.

La coloración es totalmente negra en los adultos, pudiendo presentar reflejos iridiscentes^{9,10,41,44,47,51}. Esta especie presenta variación de coloración ontogénica; las crías tienen la cabeza negra con un collarín de escamas blanquecino o crema, pero el resto del cuerpo es color coral o rojo intenso^{9,10,47,51}. A medida que crecen, con las sucesivas mudas de piel, el dorso se torna cada vez más negro, limitando el color rojo a los flancos y el vientre, hasta volverse completamente negros^{9,10,47,51}.

B. maculata es reconocida por sus hábitos ofiófagos, incluyendo en su dieta especies que son peligrosas para el ser humano^{9,10,41,44,47,50,51}. No obstante, también puede incluir anguilas, anfibios, saurios, aves y pequeños mamíferos en su dieta^{9,10,41,44,47,50,51}.



Figura 4. A la izquierda un ejemplar adulto de *B. maculata*. Foto por Ignacio García. A la derecha un juvenil de la misma especie, con su coloración característica, que se vuelve completamente negra a medida que la culebra va mudando su piel. Foto: Federico Achaval

Existe una creencia popular que estas serpientes son resistentes al veneno de los ofidios que depreda^{9,10,41,44,47,50,51}.

Esta especie, de hábitos crepusculares y nocturnos, es endémica de nuestro país, así como de norte y centro de Argentina, Brasil (desde el oeste del Mato Grosso y Sur de Goiás, hasta el sur y sureste del país), sur de Bolivia y oeste de Paraguay^{10,43,45,51}.

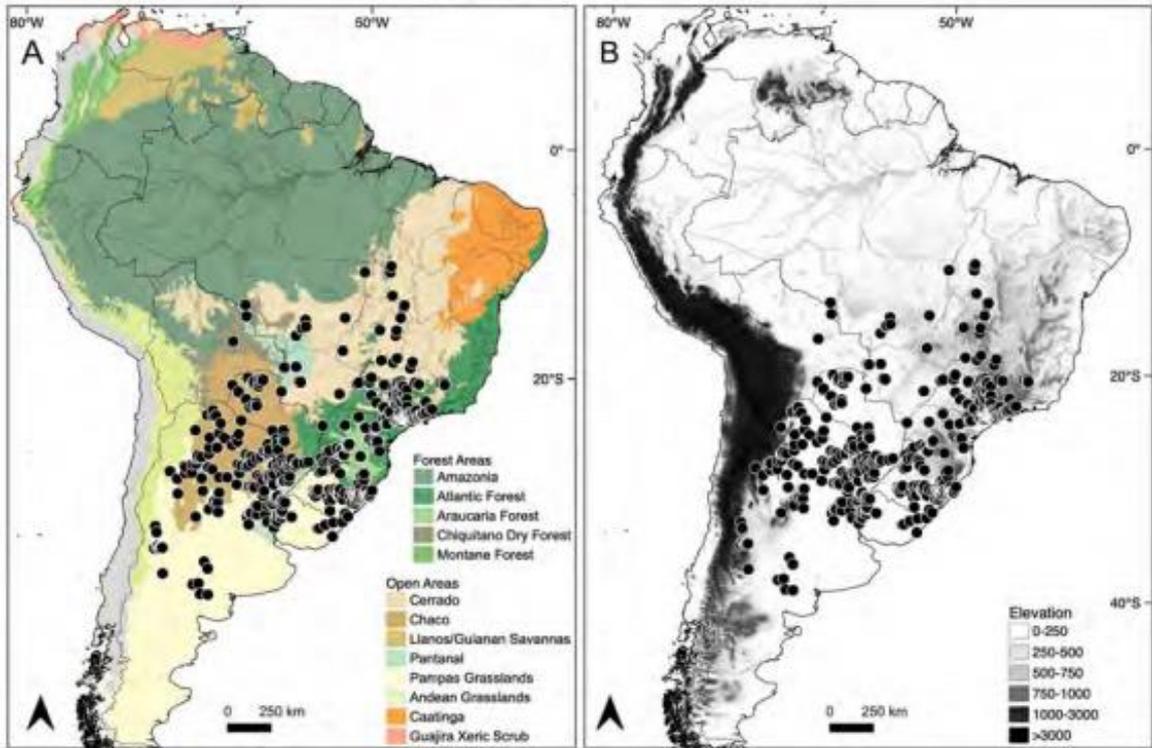


Figura 5. Mapa extraído de Nogueira et al (2020)⁴³. En A, se indica la distribución de *B. maculata* con relación a las ecorregiones de América del Sur, mientras que el B, es en función a la altitud.

En nuestro país se ha registrado en los departamentos de Artigas, Salto, Paysandú, Tacuarembó, Cerro Largo y Rocha, aunque es posible que se distribuya por todo el territorio nacional¹⁰. Habita ambientes diversos, tales como praderas, pedregales y montes, generalmente asociados a cursos de agua¹⁰. También ha sido observada en zonas próximas a viviendas rurales, e incluso en ambientes con forestación de eucaliptus¹⁰.

A partir de relatos no registrados formalmente que aseguran la resistencia de *B. maculata* al veneno de las *Bothrops*, y basándonos en el historial de confusiones taxonómicas ligado a las características que comparte con *Clelia clelia*, cuya resistencia al veneno está comprobada, en el presente trabajo se propuso evaluar si la sangre de *B. maculata* presenta también alguna propiedad que le otorgue tal resistencia.

VENENOS Y SANGRE:

El veneno de *Bothrops alternatus* y la sangre de *Boiruna maculata* fueron extraídos en el Serpentario del Instituto de Higiene de la Facultad de Ciencias - Facultad de Medicina, UdelaR. La sangre de *B. maculata* se extrajo por punción de la aorta caudal, por lo que no fue necesario sacrificar al donante.

A partir de 20 µg de veneno liofilizado de *Bothrops alternatus* se preparó una solución stock de concentración 10 mg/mL.

ENSAYO DE COAGULACIÓN:

El ensayo se llevó a cabo un procedimiento similar al descrito por Morais (2012)¹¹. A partir de la solución stock del veneno, se incubaron diluciones de concentración decreciente de entre 0,01 µg/µL y 10 µg/µL, en 50 µL de Buffer fosfato salino (PBS), y se agregó a cada dilución 150 µL de sangre ovina (Biokey), La mezcla se incubó a 37°C por 2 horas. En intervalos regulares de 2 minutos, se invirtió un tubo de cada serie. Se definió como “tiempo de coagulación”, el tiempo que tarda en ocurrir la coagulación total de la muestra, determinado por la formación de un coágulo que no cae cuando se invierte el tubo. Como control negativo se usaron 150 µL de sangre ovina, con 50 µL de PBS.

ENSAYO DE INHIBICIÓN DEL EFECTO COAGULANTE:

Se prepararon muestras conteniendo 150 o 250 µL de sangre ovina, 50 µL (20 µg/mL) de veneno de *B. alternatus*, y se agregaron 2, 5 y 10 µL de sangre de *B. maculata*, como inhibidor. Como control de inhibición, se sustituyó la sangre de *B. maculata* por suero antiofídico comercial (Instituto Malbrán). Los controles fueron los mismos que para la puesta a punto del ensayo. Las muestras fueron incubadas a 37° C, y se evaluó la formación de coágulo observándose la muestra cada 2 minutos. El tiempo máximo establecido para el experimento fue de 2 horas.

ENSAYO DE LA ACTIVIDAD HEMOLÍTICA INDIRECTA

Según el protocolo de Martins et al, 2009⁵², se puso a punto un ensayo de hemolisis indirecta, donde se centrifugaron 2 mL de sangre ovina a 2500 rpm por 5 minutos para separar los glóbulos rojos, que luego fueron lavados 3 veces con PBS, y resuspendidos con 2 mL del mismo buffer.

Se incubaron 200 µL de la suspensión de glóbulos rojos con 10 µL de veneno, en diluciones de entre 0.1 µg/µL y 10 µg/µL, y 10 µL de Lecitina 0.4 mg/mL (Sigma). Se llevó a los tubos a un volumen final de 500 µL con buffer fosfato salino (PBS), y se incubó a 37° C durante 1 hora, se centrifuga y se determina la absorbancia a 420 nm del sobrenadante, para cuantificar la hemoglobina liberada por la lisis de los eritrocitos. Como control negativo se usaron 200 µL de suspensión de glóbulos rojos con PBS. Para el análisis de los datos se corrigió el valor de las medidas de absorbancia contra la condición blanco.

ENSAYO DE INHIBICIÓN DE LA ACTIVIDAD HEMOLÍTICA INDIRECTA

Se tomaron 200 µL de la suspensión de glóbulos rojos lavados y se incubaron junto con 10 µL de veneno de *B. alternatus* 10mg/mL y se agregó 20 µL o 50 µL de sangre de *B. maculata*, y 10 µL de Lecitina 0.4 mg/mL. Se los llevó a un volumen final de 500 µL con PBS, se los dejó en la estufa por 1 hora a 37° C y se centrifugó. Finalmente se midió la absorbancia de los sobrenadantes de las muestras a 420 nm, para cuantificar la hemoglobina liberada por la lisis de los eritrocitos. Para el análisis de los datos se corrigió el valor de las medidas de absorbancia contra la condición blanco.

ENSAYO DE LA ACTIVIDAD GELATINASA

Se incubaron en estufa a 37°C por 24 horas; 150, 200 y 300 µL de soluciones de gelatina sin sabor (marca comercial) 1% y 3%, en agua destilada, con volúmenes de 2, 5 o 10 µL de veneno 10 mg/mL y 150 µL de PBS adicionado con calcio (CaCl₂= 10 mM). Pasado este tiempo, se le agregó a cada tubo 200 µL de TCA (sol. 50%) para precipitar las proteínas no digeridas por el veneno, y se centrifugó a 700 G por 2 min. Para cuantificar los péptidos digeridas por el veneno, se incubaron 25 µL del sobrenadante de cada tubo con una solución de BCA, preparada según protocolo del fabricante⁵³ (200 µL de solución de BCA (2% de sulfato de cobre 4%), y se incubaron a 37° C por 30 min. Finalmente se midió la absorbancia de las muestras a 562 nm. Para

el análisis de los datos se corrigió el valor de las medidas de absorbancia contra la condición blanco.

ENSAYO DE INHIBICIÓN DE LA ACTIVIDAD GELATINASA

Para este ensayo se incubaron 150 μL de gelatina 1% con 5 μL de veneno 10 mg/mL y 10 μL o 20 μL de sangre de *Boiruna maculata*, completando con buffer fosfato adicionado con calcio hasta alcanzar los 350 μL . Las muestras se incubaron por 24 horas en estufa a 37°C. Posteriormente se añadió a cada una de las muestras 200 μL de TCA (sol. 50%), y se centrifugaron por 2 minutos a 700 G. Para finalizar, se midió la concentración proteica de 25 μL de los sobrenadantes, mediante protocolo BCA⁵³ (2% de sulfato de cobre 4%), midiendo su absorbancia a 562 nm. Para el análisis de los datos se corrigió el valor de las medidas de absorbancia contra la condición blanco.

ACTIVIDAD L-AMINO OXIDASA:

Siguiendo el método de Kishimoto y Takahashi (2001)⁵⁴, se preparó la solución reactiva disolviendo una tableta de O-fenilendiamina (OPD) (Sigma-Aldrich) en 10 mL de PBS y se agregó 15 μL de Leucina (5 mM) y 15 μL de peroxidasa (0.8 U/mL). Las muestras fueron preparadas mezclando 90 μL de solución reactiva con 10 μL de veneno 10 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ o 5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$. Posteriormente se las incubó a 37°C por 60 minutos y se midió absorbancia a 492nm. Para el análisis de los datos se corrigió el valor de las medidas de absorbancia contra la condición blanco.

INHIBICIÓN ACTIVIDAD L-AMINO OXIDASA

La solución reactiva fue preparada como se describió anteriormente. Las muestras fueron preparadas agregando 5 μL de sangre de *B. maculata* a 5 μL de veneno 10 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, y 5 μL de PBS a 5 μL de veneno 10 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$. Se prepararon 2 blancos, uno solo con 10 μL de PBS y otro con 5 μL de PBS y 5 μL de sangre de *B. maculata*. Luego de incubar las muestras por 60 minutos a 37°C, se procedió a medir su absorbancia a 492nm. Para el análisis de los datos se corrigió el valor de las medidas de absorbancia contra la condición blanco.

SDS-PAGE (4-12%):

Mediante el método de Laemmli (1969)⁵⁵ se corrieron 5 μL de las muestras, en un gel de poliacrilamida de gradiente (4-12%) TruPAGE precast gel (Sigma). Las muestras

consistieron en 5µL de sangre de *B. maculata*, 2 y 5 µL de sangre ovina, 5 µL de sangre de *P. lemniscatus*, 5µL de la sangre de *B. alternatus* y un marcador de peso molecular (Precision Plus Protein™ Standards, Dual Color, Bio-Rad, catálogo # 161-0374). A cada una de las muestras se les agregó el buffer de carga correspondiente (TruPAGE™ LDS Sample Buffer, Sigma-Aldrich) y se las incubó a 100°C por 5 minutos. Las muestras se corrieron a amperaje constante (20 mA), hasta que el frente de corrida alcanzó el final del gel. El buffer de corrida empleado fue TruPAGE™ TEA-Tricine (Sigma-Aldrich).

ANÁLISIS ESTADÍSTICOS:

Los análisis estadísticos de los ensayos se realizaron mediante t test, considerados estadísticamente significativos p valores <0.05 (*), utilizando el software GraphPad Prism versión 6.01.

RESULTADOS

ENSAYO DE COAGULACIÓN:

Para evaluar si la sangre de *B. maculata* era capaz de inhibir la coagulación inducida por el veneno, en primera instancia se puso a punto un ensayo de tiempo de coagulación de sangre de oveja con veneno de *B. alternatus in vitro*. Como se puede observar en la Figura 6, la muestra blanca, solo con sangre de oveja, no coaguló (señalado en el gráfico como n.c).

Tiempo de coagulación inducido por el veneno

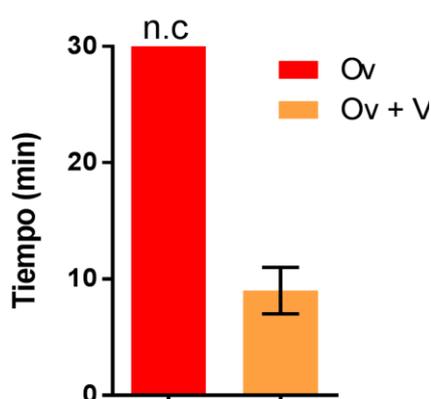


Figura 6. Tiempo de coagulación inducido por el veneno. Sangre ovina (Ov), y sangre ovina con agregado 5 µL de veneno 10 µg/µL de *B. alternatus* (Ov+V). "n.c" indica que la sangre no coaguló en el tiempo del ensayo.

Sin embargo, cuando se agregó 5 μL el veneno 10 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de *B. alternatus*, la coagulación de la sangre ocurrió en aproximadamente 9 minutos, y se tomó como la concentración de veneno a utilizar en el ensayo de inhibición del efecto coagulante.

ENSAYO DE INHIBICIÓN DEL EFECTO COAGULANTE:

Para determinar si la sangre de *B. maculata* es capaz de inhibir la coagulación inducida por el veneno, se realizó un ensayo de inhibición del efecto coagulante in vitro. La Figura 7 muestra que los controles de sangre ovina sola, como la muestra adicionada con suero antiofídico comercial no coagularon.

Por otra parte, la sangre ovina adicionada con 5 μL de veneno 10 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ coaguló en aproximadamente 18 minutos. Al agregar 2 μL de sangre de *B. maculata*, el tiempo de coagulación se extendió a 20 minutos. Cuando se aumentó el volumen agregado de la sangre de la culebra a 5 μL se observa que el tiempo de coagulación fue de 27 minutos, y al agregar 10 μL de dicha sangre a la mezcla con sangre ovina y veneno, la sangre de oveja demoró 60 minutos en coagular por acción de este último. Por lo tanto, el tiempo de coagulación se vio enlentecido conforme se agregó mayor volumen de sangre de *B. maculata*, confirmando la inhibición del efecto coagulante del veneno de *B. alternatus* sobre sangre ovina.

Inhibición de la coagulación inducida por el veneno

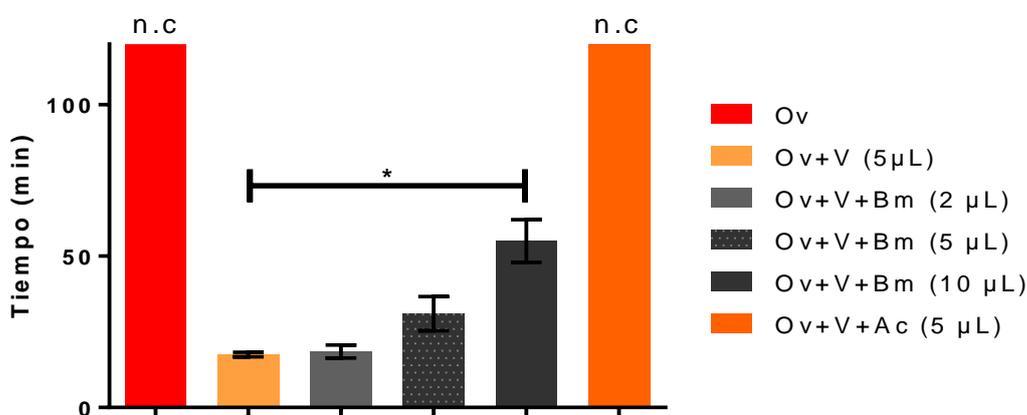


Figura 7. Ensayo de inhibición de la coagulación inducida por el veneno. Para todos los casos "n.c" significa que la sangre no coaguló en el tiempo durante tiempo en que se prolongaron los ensayos.

Ov corresponde a la sangre ovina, Ov+V a la sangre ovina con 5 μL de veneno 10 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, y Ov+V+Bm a la sangre ovina con veneno y el volumen correspondiente de sangre de *B. maculata*. Ov+V+Ac sustituye el mismo volumen de *B. maculata* por SAO comercial. La diferencia significativa está señalada por el asterisco (*) (p-valor <0.05)

ACTIVIDAD HEMOLÍTICA INDIRECTA:

Para evaluar si la sangre de *B. maculata* es capaz de inhibir las fosfolipasas A2 se analizó la actividad hemolítica indirecta *in vitro*. En la Figura 8 se indican los resultados obtenidos de la puesta a punto de ensayo de actividad hemolítica, donde se agregaron concentraciones crecientes de veneno de *B. alternatus* y se midió la actividad fosfolipasa en sangre ovina.

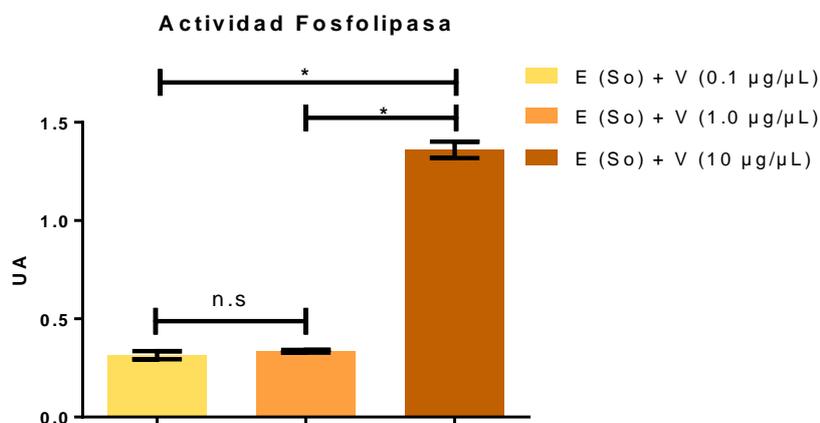


Figura 8. Ensayo de Actividad Fosfolipasa. Cada columna posee eritrocitos lavados de sangre ovina (E(So)) con concentraciones crecientes (de izquierda a derecha) de veneno de *B. alternatus*. Cuando corresponda, "n.s" indica que la diferencia no es significativa entre los resultados, mientras que el * indica diferencia significativa (p-valor < 0.05).

A las muestras preparadas se les adiciona lecitina, ya que las PLA2 del veneno bothropico actúan sobre una fuente exógena de lecitina, generando lisofosfátidos que se introduce en la membrana plasmática, inestabilizándola y provocando la hemólisis indirecta⁵⁶.

Tanto al agregar 10 µL de veneno 0.1 µg/µL, como 1 µg/µL, se observa una actividad fosfolipasa baja, sin diferencias significativas entre estas condiciones. Por otro lado, cuando se agregaron 10 µL de veneno 10 µg/µl, esta actividad aumenta significativamente. Debido a ello se eligió esta última concentración (de 10 µg/µl de veneno) para los ensayos de inhibición.

INHIBICIÓN DE LA ACTIVIDAD HEMOLÍTICA INDIRECTA:

Para evaluar el efecto inhibitorio de la sangre de *B. maculata* a la actividad fosfolipasa analizada previamente, se agregaron 20 μL de sangre de *B. maculata* manteniendo las mismas condiciones que el apartado anterior.

En la Figura 9 se aprecia que aunque hay una aparente tendencia decreciente al agregar

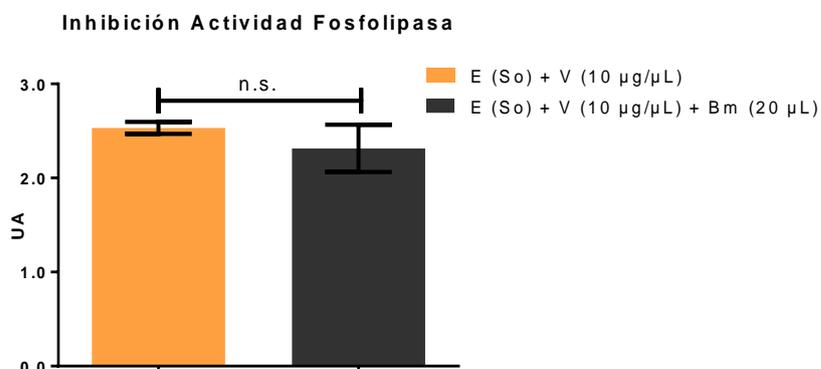


Figura 9. Inhibición de la actividad fosfolipasa. La columna de la derecha corresponde a los eritrocitos lavados de oveja con el veneno de *B. alternatus*, mientras que la de la izquierda representa el agregado de sangre de *B. maculata* a la mezcla anterior. Los resultados no presentan diferencias significativas (n.s.).

el inhibidor (columna de la derecha), los resultados del ensayo de inhibición de la actividad de las PLA₂, no son significativos (n.s). Esto indica que la sangre de *B. maculata* no es capaz de inhibir la actividad de las fosfolipasas A₂, al menos para el volúmen de sangre evaluado.

ACTIVIDAD GELATINASA:

La actividad gelatinasa, se evaluó mediante la digestión de gelatina al incubarla con veneno de *B. alternatus*. Los resultados obtenidos para el ensayo de actividad gelatinasa se muestran en la Figura 10.

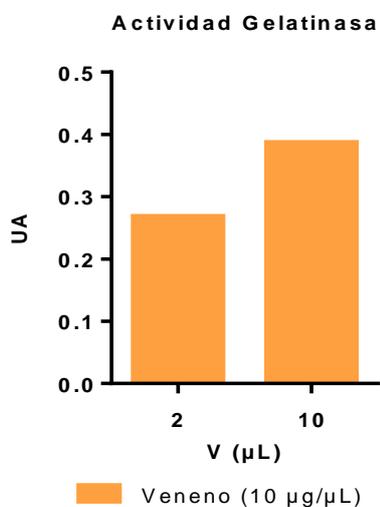


Figura 10. Actividad gelatinasa para 2 y 10 µL del veneno de *B. alternatus* 10 µg/µL.

Este ensayo se realizó agregando 2 y 10 µl de veneno 10 µg/µL de *B. alternatus*, y se puede apreciar que la actividad del gelatinasa del veneno aumenta conforme se incrementa su volumen, pero para estandarizar los ensayos, todos llevados a cabo con 5 µL de veneno, se usó dicho volumen para evaluar la inhibición de esta actividad.

INHIBICIÓN DE LA ACTIVIDAD GELATINASA:

Para evaluar si la sangre de *B. maculata* es capaz de inhibir la actividad gelatinasa, se agregó la misma al veneno incubado con la gelatina, y se utilizó sangre ovina como control negativo de inhibición. En cambio, al agregar sangre de *B. maculata*, la disminución en la actividad enzimática es de casi 3 veces para 10 µL de sangre de la culebra, y de casi 8 veces para 20 µL mostrando una relación proporcional con la concentración de sangre agregada (Figura 11).

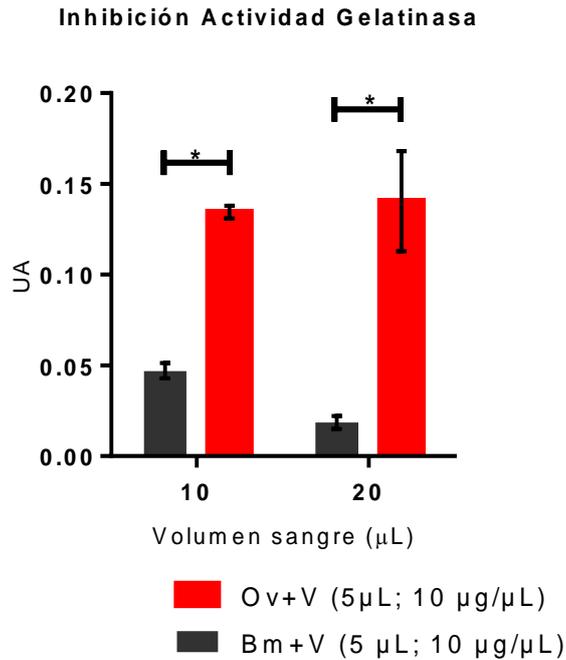


Figura 11. Se señala la absorbancia de 10 y 20 µL de la sangre de oveja y sangre de *B. maculata*, ambas mezclada con 5µL de veneno de *B. alternatus* (10 µg/µL). El asterisco (*) indica diferencia significativa entre los datos. (p-valor <0.05)

No obstante, la diferencia entre los volúmenes agregados de sangre de *B. maculata*, no es significativa entre ellas. Estos valores dejan en evidencia que la sangre de *B. maculata* es capaz de inhibir la actividad gelatinasa del veneno de *B. alternatus*.

ACTIVIDAD L-AMINO OXIDASA

Para evaluar la actividad L-amino oxidasa del veneno de *B. alternatus*, se establecieron las condiciones del ensayo evaluando dicha actividad con 5 y 10 µl de veneno 10 µg/µL. En la Figura 12 se muestra como la actividad de las LAAO aumenta conforme lo hace el volumen de veneno agregado.

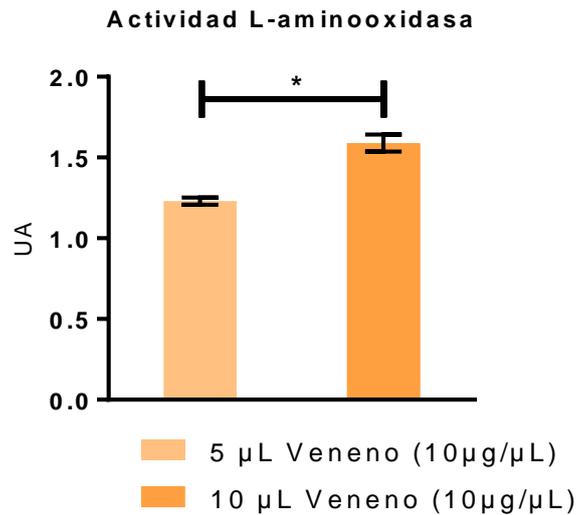


Figura 12. Actividad L- amino oxidasa del veneno de *B. alternatus*. La diferencia significativa entre los datos se señala con el asterisco (*) (p-valor < 0.05)

INHIBICIÓN L-AMINO OXIDASA

De la misma forma se procedió con la evaluación de la sangre de *B. maculata* y su posible inhibición de la actividad L-amino oxidasa. Para ello se incubó la misma con el veneno de *B. alternatus* en las condiciones seleccionadas en el ensayo anterior.

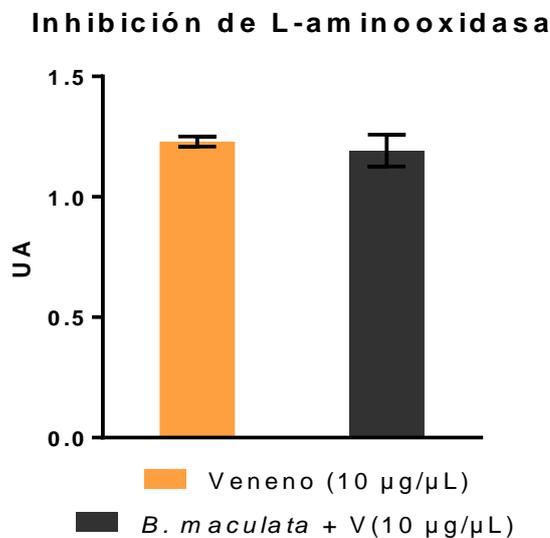


Figura 13. Inhibición de la actividad L-amino oxidasa. En la columna izquierda se representa el veneno, y en la derecha el veneno mezclado con sangre de *B. maculata*. En ambos casos, el volumen de veneno es de 5µL, al igual que el de sangre de la culebra.

En el gráfico de la Figura 13 podemos apreciar que agregar sangre de *B. maculata* al veneno no afecta la actividad enzimática de las LAAO presentes en este último. Este resultado sugiere, a modo preliminar, que la sangre de *B. maculata* no tendría la capacidad de inhibir la actividad L-amino oxidasa del veneno de *B. alternatus*.

SDS-PAGE

Para analizar los componentes proteicos presentes en la sangre de *B. maculata*, se realizó una corrida electroforética en condiciones desnaturizantes y no reductoras. A continuación, se presentan los resultados de la electroforesis en gel. (Figura 14)

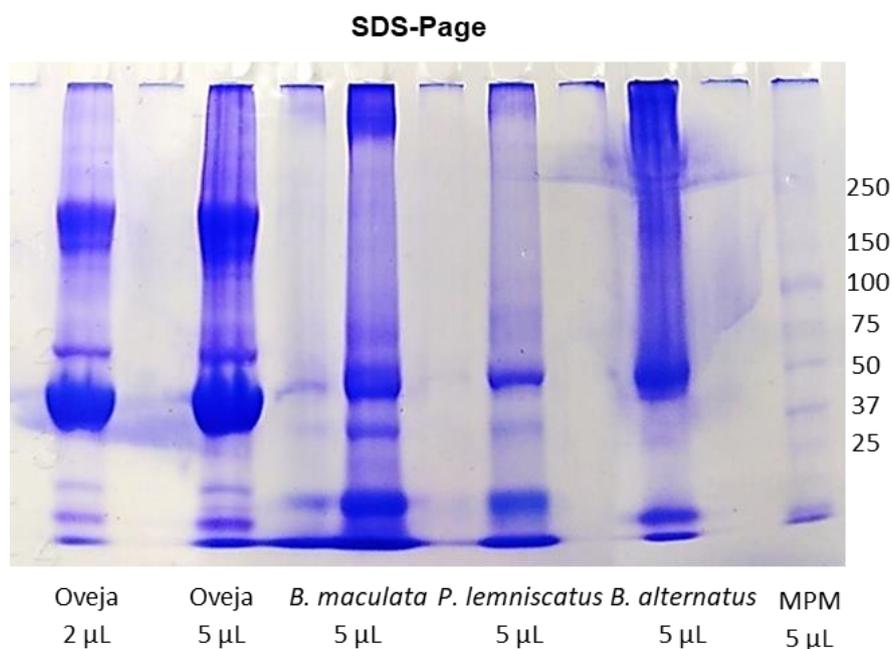


Figura 14. SDS-Page con los perfiles de corrida (izquierda a derecha) de sangre de: Oveja (2 y 5 µL), *B. maculata*, *P. lemniscatus* y *B. alternatus*. El ultimo carril a la derecha corresponde al marcador de peso molecular.

Se puede observar en los dos primeros carriles donde se sembró sangre de oveja en diferentes volúmenes, la similitud de los mismos, habiéndose teñido con más intensidad el carril sembrado con 5 µL de sangre. Aproximadamente entre los 250 y 150 KDa se puede observar tenues bandas, seguidas por otras dos muy intensas en los 150 KDa, que corresponden a la zona reportada para las inmunoglobulinas del tipo G. Por debajo de estas parecería haber algunas bandas muy tenues. Entre los 50 y 75 KDa hay una delgada banda bien definida y en el entorno de los 50 KDa aparece otra banda muy

intensa que podría tratarse de la albúmina. Se pueden ver 2 bandas por debajo de los 25 KDa.

En el carril correspondiente a *B. maculata*, hay una intensa banda >250 KDa. Otras bandas pueden apreciarse muy vagamente, entre los 250 y 150 KDa, donde se encontrarían las inmunoglobulinas del tipo Y. Aproximadamente a los 75 KDa hay una difusa banda, seguida de otra bien intensa, cuyo peso ronda los 50 KDa, que podrían tratarse de la albúmina y la transferrina. Apenas debajo de los 37 KDa hay una banda que se aprecia con facilidad, y debajo de esta, en torno a los 25 KDa, otra muy tenue. Por debajo de este peso se puede ver otra banda bien definida e intensa.

En lo que respecta al perfil de *P. lemniscatus*, este es bastante similar al de *B. maculata*, aunque es mucho más tenue y no parecería presentar demasiados componentes >250 KDa.

En el carril con sangre de *B. alternatus*, debido a la falta de resolución que se extiende hasta los 50 KDa aproximadamente, es difícil distinguir bandas. No obstante, podría inferirse que hay componentes de más de 250 KDa, similar a *B. maculata*, y se vislumbran vagamente una banda a 150 KDa, donde se esperaría encontrar a las inmunoglobulinas y otra a 100 KDa. Una banda muy intensa se aprecia a los 50 KDa (posiblemente correspondiente a la albúmina), y una muy tenue por encima de los 37 KDa. Al igual que en los otros dos ofidios, se puede ver una banda por debajo de los 25 KDa, aparentemente de menor peso que en las anteriores, que podría corresponder a BaltMIP, un inhibidor proteico de miotoxinas reportado para el suero de esta especie.

DISCUSIÓN

Desde hace más de un siglo, los sueros antiofídicos han sido el único antídoto efectivo contra el accidente ofídico, pero acarrear con ellos numerosas desventajas, y poco han cambiado en este tiempo. Esto ha impulsado la búsqueda de nuevas terapias para el accidente ofídico, y no solo el desarrollo de mejores sueros, más económicos, efectivos y que tengan menos riesgos para las víctimas del ofidismo, sino también a nuevas herramientas que sean capaces de complementar este tratamiento.

Desde la antigüedad, muchos animales han despertado interés gracias a su capacidad de resistir al veneno de serpiente, y tras numerosos estudios, se ha demostrado la existencia de inhibidores naturales que disminuyen o neutralizan las toxinas presentes

en el veneno. A partir de estos trabajos se ha profundizado en la investigación de los mismos, buscándoles una posible aplicación terapéutica para tratar el ofidismo.

Los efectos locales provocados por el veneno no son revertidos por el SAO por la despareja relación veneno/SAO, algo que se acentúa con la demora en la administración de este último. Por esta razón, uno de los enfoques actuales para mejorar el tratamiento antiofídico es ahondar en estos inhibidores, pudiendo ser una alternativa la administración local de estos para minimizar la degradación del tejido.

El objetivo de este trabajo fue evaluar si la sangre de *B. maculata* es capaz de inhibir total o parcialmente, alguno o todos los efectos tóxicos del veneno de *Bothrops alternatus*. Para lograrlo, se llevaron a cabo ensayos *in vitro* donde se incubó la sangre de *B. maculata* con el veneno de *B. alternatus*, evaluando las principales actividades tóxicas del mismo.

Una de las expectativas de este trabajo, es poder aprovechar la eventual resistencia de *B. maculata* al veneno como una fuente potencial para el desarrollo de nuevos y/o mejores tratamientos antiofídicos.

El veneno de *B. alternatus* se caracteriza por provocar severos daños sistémicos, principalmente a nivel de la cascada de coagulación, siendo las SVMP y SVSP las responsables de afectar la hemostasis. Estas enzimas tienen efectos tanto procoagulantes como anticoagulantes, estimulando la formación de coágulos inestables, al mismo tiempo que consumen factores de coagulación de forma excesiva. El resultado de esta combinación vuelve a la sangre incoagulable, derivando en severas hemorragias que aumentan considerablemente el riesgo de shock hipovolémico.

Estos desórdenes sistémicos son los principales efectos tóxicos del veneno que ponen en riesgo la vida de la víctima si no son tratados a tiempo^{5,11,28,34}.

Con relación a los efectos hemostáticos del veneno, en el presente trabajo, durante la puesta a punto del ensayo de coagulación, se observó que el veneno coagulaba completamente la sangre de oveja. Posiblemente esto se deba a que el ensayo se realizó *in vitro*, donde la sangre se encuentra estática, a diferencia que en el organismo la sangre, que se encuentra en movimiento, prevaleciendo el efecto anticoagulante por el consumo de los factores de la coagulación. Para comprobar que en las condiciones experimentales fueran las adecuadas y que se neutralizara el efecto del veneno, se usó como control positivo una mezcla de SAO con el veneno y la sangre ovina, la cual, para

el tiempo establecido para el ensayo, no coaguló. Al incorporarse al ensayo la sangre de *B. maculata*, se pudo observar que el tiempo de coagulación de la sangre ovina se va enlenteciendo conforme se incrementa el volumen de la sangre de la culebra. Inicialmente, el tiempo de coagulación de la sangre ovina cambia muy poco. La coagulación total se obtuvo en un tiempo de una hora al agregarse cinco veces más volumen de sangre de *B. maculata* a la solución, retrasando cinco veces más el tiempo que le lleva a la sangre ovina ser coagulada por el veneno. Estos resultados confirman que la sangre de *B. maculata* tiene la capacidad de inhibir, al menos parcialmente, las toxinas del veneno responsables de la coagulación sanguínea, ya que los tiempos de coagulación fueron retrasados notablemente.

Morais reportó que las SVMP del veneno de *B. alternatus*, influirían de forma significativa en la actividad coagulante, por lo que podemos asumir que un posible mecanismo molecular involucrado en esta disminución estaría afectando la actividad de estas proteasas, y presumiblemente también la actividad de las SVSP, aunque estas tienen un rol fundamentalmente anticoagulante¹¹.

Esta resistencia podría ser atribuida principalmente a la presencia de factores séricos, ya que la resistencia al veneno (propio o de otras especies) que se ha reportado para serpientes se debe principalmente a estos^{20-22,25,57-60}.

Otras posibles causas de la resistencia pueden ser la presencia de anticuerpos naturales^{39,61}, que neutralicen la actividad coagulante del veneno, alguna mutación en los sitios de acción de las toxinas del veneno en las células de *B. maculata*, u otros factores. En un reporte realizado por Goetz, se sugiere que la resistencia a la actividad hemorrágica hacia un veneno puede estar relacionada a elevados niveles de Vit-E en la sangre⁴⁰. Cabe destacar que, en cualquier caso, uno o varios de los mecanismos podrían estar actuando en conjunto, por lo que deberían realizarse más estudios para comprobarlo. Sin embargo, en caso de que la resistencia de *B. maculata* se debiese a una mutación en el sitio de acción del veneno, este mecanismo no permitiría conferir su resistencia a la sangre otro organismo. Por otra parte, se podría investigar la eficacia de la administración de Vit-E directamente en los pacientes, y los posibles riesgos que esto podría implicar.

Con relación a las SVMP, que son el componente mayoritario del veneno de *B. alternatus*, se ha reportado que son responsables de los efectos sistémicos y también las principales causantes del pronunciado daño local producto del envenenamiento. Si

bien estos efectos solo suponen un riesgo potencial para la supervivencia de la víctima, suelen poner en grave peligro el miembro afectado, teniendo frecuentemente como consecuencia la amputación de este^{5,11,19,21}.

En este trabajo se estudiaron estas enzimas mediante un ensayo de inhibición de la actividad gelatinasa. Si bien se han reportado que algunas SVSP y PLA2 pueden tener actividad gelatinasa, la mayor parte de esta actividad viene dada por las SVMPI. En el ensayo se observó que la actividad gelatinasa disminuye considerablemente en presencia de la sangre de *B. maculata*, y conforme se aumenta el volumen de ésta. Este resultado sugiere que uno de los mecanismos de *B. maculata* para resistir los efectos del veneno, es inhibiendo esta familia de enzimas. Al igual que en el caso de la inhibición de la coagulación, esta podría suponer la presencia de moléculas capaces de neutralizar la actividad de dichas enzimas, como anticuerpos neutralizantes o inhibidores enzimáticos, posiblemente séricos, como se reporta en la bibliografía. En lo que respecta a inhibidores séricos, se han aislado varios inhibidores específicos de metaloproteasas, tanto en serpientes, como mamíferos e incluso plantas. HSF fue el primer SVMPI aislado y caracterizado a partir de suero de serpiente, aunque se han aislado varios más, como BJ46a, NtAH, cMSF, jMSF, entre otros. Junto a HSF, los SVMPI más estudiados son Oprin y Erinacin, que provienen del suero de dos mamíferos^{20,21}.

Los resultados obtenidos en el estudio de la actividad L-amino oxidasa son concordantes con reportes en la literatura. Las LAAO están presentes en casi todos los venenos de serpiente, representando entre 1 y 9% de las proteínas, dependiendo de la especie. A pesar de que representan el 7% del venoma de *B. alternatus*, no se esperaba que la sangre de *B. maculata* tuviera efecto alguno sobre la actividad de estas enzimas, ya que su actividad aún es cuestionada a pesar de que se le atribuyen diversos efectos. En los resultados del ensayo de inhibición de la actividad L-amino oxidasa, que demuestra que la presencia de sangre de *B. maculata* no afecta la actividad de estas enzimas, confirmando los datos bibliográficos^{11,58}.

Otro de los ensayos realizados en este trabajo fue el estudio de la hemólisis indirecta causada por las PLA2, las que, de acuerdo con la literatura, destruyen las membranas celulares al hidrolizar sus glicerofosfolípidos, aunque también contribuyen al daño local, induciendo formación del edema, miotoxicidad y hemorragia. Estas enzimas son componentes mayoritarios del veneno de *alternatus*, cuya proporción es similar a la de las LAAO^{5,11,20}.

Los resultados obtenidos del ensayo de inhibición de estas enzimas apuntan a que la sangre de *B. maculata* no es capaz de combatirlas. Esto abre camino a tres posibilidades: Que el volumen de sangre de la culebra no haya sido suficiente para observar inhibición en el ensayo. Que no haya factores solubles en la sangre que antagonicen contra las toxinas, o bien, cabe la posibilidad de que la resistencia esté asociada a modificaciones sobre la superficie celular. De ser este el caso, como este ensayo mide hemólisis indirecta de eritrocitos ovinos, es de esperarse que no se vea reflejado en los resultados. Considerando la posibilidad de una mutación en el sitio de acción de estas hidrolasas, que son los glóbulos rojos, se podría repetir el ensayo, directamente con la sangre de *B. maculata*, sin incluir la sangre ovina, y comprar los resultados. En la literatura se describe la existencia de inhibidores de PLA₂, (PLI), en suero de serpientes venenosas y no venenosas, por lo que, no descartaría completamente la presencia de algún tipo de PLI en el suero de *B. maculata*. En tal caso, posteriores estudios serían necesarios para verificarlo, pudiendo repetirse este ensayo mediante otras técnicas que puedan ser más sensibles y/o robustas^{21,25,27,62}.

En función de la escasa bibliografía referente a *B. maculata* y asumiendo que de tener resistencia a los venenos, lo más probable es que fuera por la presencia de proteínas séricas, se corrió en un gel de electroforesis la sangre de esta serpiente junto a la de otros dos ofidios (*B. alternatus* y *P. lemniscatus*) y sangre de oveja para tener como referencia y observar diferencias. Debido a la ausencia de información proteómica, la corrida electroforética es meramente descriptiva, por lo que en esta sección del trabajo solo se comentará a que podrían corresponder las bandas visualizadas.

En el perfil electroforético de la sangre de *B. maculata*, se observan diversas bandas dentro del rango en que podrían corresponder a inhibidores descritos para suero de ofidios^{18,20,60,62-64,21,22,25,27,38,39,57,59}. Por encima de los 250 KDa, se podría inferir la presencia de IgM pentaméricas, con un peso molecular ~850 a 900 KDa, o agregados de 4 subunidades de cadenas pesadas de las dos subclases de inmunoglobulina IgY^{38,39,61}, de 240 y 280 KDa. Así mismo, se ha reportado un SVMPI de alto peso molecular, NtAH, rondando los 1000 KDa^{20,21}. A pesar de que la sangre de *B. maculata* no mostró inhibición de PLA₂s, se visualizan bandas que rondan el rango dentro del que se han descrito PLI (130 y 160 KDa)^{25,27,62}. Los SVMPI de bajo peso molecular que se han reportado se encuentran en el rango comprendido entre 50 y 90 KDa, donde es posible visualizar algunas bandas en el gel^{18,20,22}. En la literatura se menciona que varios

de estos SVMPI parecen depender de proteínas séricas de bajo peso molecular (≤ 25 KDa), que se pueden observar en el perfil de la corrida^{18,20,22}.

Debido a la similitud de los perfiles de corrida entre *B. maculata*, *P. lemniscatus*, y *B. alternatus*, se podrían hacer las mismas suposiciones sobre la identidad de sus bandas.

Posteriores ensayos cromatográficos y proteómicos son necesarios para conseguir mayor resolución en la separación de estos componentes sanguíneos y su eventual identificación, con la esperanza de que los mismos puedan tener potencial utilidad para el tratamiento del accidente ofídico.

Lamentablemente, a causa de la escasa disponibilidad de sangre de *B. maculata*, no fue viable realizar más ensayos, y la variedad de condiciones que fue posible llevar a cabo se vio limitada.

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

Gracias a los resultados obtenidos en los ensayos, se puede afirmar que la sangre de *B. maculata* tiene la capacidad de contrarrestar, al menos parcialmente, las actividades tóxicas del veneno de *B. alternatus*, en particular las SVMP y presumiblemente de las SVSP. Sin embargo, debido a que la actividad de estas últimas no fue evaluada de forma individual, se podría diseñar un ensayo específico para su evaluación y eventualmente agregar sangre de *B. maculata* para estudiar los efectos que pueda tener esta última sobre dichas enzimas.

A pesar de que la actividad de las PLA2 no se vio afectada por la sangre de *B. maculata*, se considera relevante evaluar esto nuevamente mediante otras técnicas, dada la importancia de estas enzimas en el veneno.

El veneno de *B. alternatus* comparte sus características generales con el veneno de otros vipéridos, siendo sus efectos característicos el daño local y los desórdenes sistémicos. Por ello, identificar inhibidores que neutralicen su toxicidad podría ser extrapolable a otros venenos de especies del mismo género, o con efectos tóxicos similares. Cabe señalar que el género *Bothrops* es el que causa más accidentes en nuestro país y en la región.

Una de las principales ventajas de *B. maculata* es que la especie es autóctona, lo que hace posible obtener la materia prima mediante la recolección de algunos ejemplares en territorio nacional y de esa forma profundizar en la investigación de estos inhibidores, sin la necesidad de importar las muestras.

En relación a la profundización de estos ensayos, una alternativa sería llevar a cabo experimentos *in vivo* sobre estas culebras. De contar con un número considerable de ejemplares de *B. maculata*, y cuidando las condiciones sanitarias, evaluar la acción del veneno directamente sobre su organismo realizando seguimiento de la evolución del cuadro clínico producido por el veneno, a nivel macro y microscópico, sería sumamente relevante e interesante.

Por otro lado, de lograrse la purificación y caracterización de estos inhibidores, y asumiendo que son de naturaleza proteica, se podría considerar una posible producción de forma recombinante. Finalmente, con un sistema optimizado y adecuado, podría desarrollarse una solución inyectable de administración local para combatir los efectos tóxicos del veneno. Si los resultados propuestos fueran exitosos la elaboración de una solución basada en proteínas recombinantes, ofrecería amplias ventajas respecto al proceso de elaboración de los SAO actuales. En principio, se reduciría considerablemente el costo de producción, al independizarse del uso de animales domésticos de gran porte y el gasto que estos suponen. Con relación a ello, los efectos adversos que generan la administración de sueros antiofídicos producidos de sueros hiperinmunes podrían ser reducidos o eliminados. Por otra parte, la producción a mayor escala sería más económica y seguramente en tiempos más acotados. A su vez, producir una solución basada en inhibidores recombinantes permitiría un mayor control de la pureza del producto final.

Ante un panorama de estas características, la reducción de los costos parece más que factible, favoreciendo la accesibilidad del producto tanto a nivel económico como su distribución regional, al menos en principio, dentro del territorio nacional.

BIBLIOGRAFÍA

1. Mattison, C. *Snakes of the world. Snakes of the world* (Blandford press, 1998). doi:10.5962/bhl.title.70771.
2. Cleveland P. Hickman, J., Roberts, L. S. & Larson, A. *Integrated Principles of Zoology*. (McGraw Hill, 2011).
3. Vitt, L. J. & Caldwell, J. P. *Herpetology - An introductory Biology of Amphibians and Reptiles*. (Elsevier Inc., 2014).
4. Chippaux, J. P. Incidence and mortality due to snakebite in the Americas. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **11**, (2017).
5. Gutiérrez, J. M. *et al.* Snakebite envenoming. *Nature reviews. Disease primers* vol. 3 17063 (2017).
6. Bawaskar, H. S. & Bawaskar, P. H. Snakebite envenoming. *The Lancet* vol. 393 131 (2019).
7. Williams, D. J. *et al.* Strategy for a globally coordinated response to a priority neglected tropical disease: Snakebite envenoming. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **13**, 12–14 (2019).
8. Williams, D. *et al.* The Global Snake Bite Initiative: an antidote for snake bite. *The Lancet* vol. 375 89–91 (2010).
9. Carreira, S. Meneghel, M. Achaval, F. *Reptiles de Uruguay*. (2005).
10. Carreira, S. & Maneyro, R. *Guía de los reptiles del Uruguay*. (2013).
11. Morais, V. Analisis comparativo de los venenos ofídicos de importancia clínica y estudio bioquímico del accidente ofídico en Uruguay. (Instituto de Higiene, Facultad de Medicina, UdelAR, 2012).
12. Carreira S., Negrin A., Tortorella M.N., Pino A., M. C. *Ofidismo en Uruguay. Especies peligrosas y características del accidente ofídico*. (2008).
13. Williams, D. J. *et al.* Ending the drought : New strategies for improving the flow of affordable , effective antivenoms in Asia and Africa. *J. Proteomics* **74**, 1735–1767 (2011).
14. Chippaux, J. Snakebite envenomation turns again into a neglected tropical disease. 1–2 (2017) doi:10.1186/s40409-017-0127-6.
15. White, J. *et al.* A comprehensive approach to managing a neglected , neglected tropical disease ; The Myanmar Snakebite Project (MSP). *Toxicon X* **1**, 100001 (2019).
16. Habib, A. G. & Brown, N. I. The snakebite problem and antivenom crisis from a health-economic perspective. *Toxicon* (2018) doi:10.1016/j.toxicon.2018.05.009.
17. Voss, R. S. & Jansa, S. A. Snake-venom resistance as a mammalian trophic adaptation: Lessons from didelphid marsupials. *Biol. Rev.* **87**, 822–837 (2012).
18. Sánchez, E. E. & Rodríguez-Acosta, A. Inhibitors of snake venoms and development of new therapeutics. *Immunopharmacology and Immunotoxicology* vol. 30 647–678 (2008).
19. Gutierrez, J. M. Comprendiendo los venenos de serpientes: 50 años de investigaciones en América Latina. *Rev. Biol. trop* vol.50 n.2 (2002).

20. Bastos, V. A., Gomes-Neto, F., Perales, J., Neves-Ferreira, A. G. C. & Valente, R. H. Natural inhibitors of snake venom metalloendopeptidases: History and current challenges. *Toxins* vol. 8 (2016).
21. Valente, R. H., Dragulev, B., Perales, J., Fox, J. W. & Domont, G. B. BJ46a, a snake venom metalloproteinase inhibitor isolation, characterization, cloning and insights into its mechanism of action. *Eur. J. Biochem.* **268**, 3042–3052 (2001).
22. Biardi, J. E., Ho, C. Y. L., Marcinczyk, J. & Nambiar, K. P. Isolation and identification of a snake venom metalloproteinase inhibitor from California ground squirrel (*Spermophilus beecheyi*) blood sera. *Toxicon* **58**, 486–493 (2011).
23. Januário, A. H. *et al.* Neo-clerodane diterpenoid , a new metalloprotease snake venom inhibitor from *Baccharis trimera* (Asteraceae): anti-proteolytic and anti-hemorrhagic properties. **150**, 243–251 (2004).
24. Drabeck, D. H. *et al.* Resistance of South American opossums to vWF-binding venom C-type lectins. *Toxicon* **178**, 92–99 (2020).
25. Izabel dos Santos, J. *et al.* Isolation and biochemical characterization of a γ -type phospholipase A2 inhibitor from *Crotalus durissus collilineatus* snake serum. *Toxicon* **81**, 58–66 (2014).
26. Harrison, R. A. & Gutiérrez, J. M. Priority actions and progress to substantially and sustainably reduce the mortality, morbidity and socioeconomic burden of tropical snakebite. *Toxins (Basel)*. **8**, (2016).
27. Shirai, R., Toriba, M., Hayashi, K., Ikeda, K. & Inoue, S. Identification and characterization of phospholipase A2 inhibitors from the serum of the Japanese rat snake, *Elaphe climacophora*. *Toxicon* **53**, 685–692 (2009).
28. Mamede, C. C. N. *et al.* Comparative analysis of local effects caused by *Bothrops alternatus* and *Bothrops moojeni* snake venoms: Enzymatic contributions and inflammatory modulations. *Toxicon* **117**, 37–45 (2016).
29. Lanari, L. C., Rosset, S., González, M. E., Liria, N. & de Roodt, A. R. A study on the venom of *bothrops alternatus duménil*, *bibron* and *duménil*, from different regions of argentina. *Toxicon* **55**, 1415–1424 (2010).
30. Negrin, A. Efficacy and safety of snake antivenoms used in Uruguay in 2018. in *Toxicon* S30 (2020). doi:10.1016/j.toxicon.2019.12.033.
31. Cheroni, A. P. *Serpentario.edu.uy*. <https://www.serpentario.edu.uy/> (2012).
32. Juanena, C., Saldun, P., Zelada, B. & Negrin, A. Mordedura por víbora de coral (*Micrurus altirostris*): primer caso en Uruguay. *Rev. MEDICA DEL URUGUAY* **34**, (2018).
33. Negrin Alba , Morais Victor, Carreira Santiago, T. M. N. Mordedura de *Phalotris lemniscatus* (Duméril, Bibron & Duméril, 1854) (Squamata, Dipsadidae) en Uruguay *Phalotris lemniscatus* (Duméril, Bibron & Duméril, 1854) (Squamata, Dipsadidae) bites in Uruguay. *Acta Toxicol. Argentina* **27**, 65–71 (2019).
34. Öhler, M. *et al.* The venomics of *bothrops alternatus* is a pool of acidic proteins with predominant hemorrhagic and coagulopathic activities. *J. Proteome Res.* **9**, 2422–2437 (2010).
35. Laustsen, A. H. *et al.* Pros and cons of different therapeutic antibody formats for recombinant antivenom development. *Toxicon* **146**, 151–175 (2018).

36. De Silva, H. A., Ryan, N. M. & De Silva, H. J. Adverse reactions to snake antivenom, and their prevention and treatment. *Br. J. Clin. Pharmacol.* **81**, 446–452 (2016).
37. Lomonte, B., Cerdas, L., Gené, J. A. & Gutiérrez, J. M. Neutralization of local effects of the terciopelo (*Bothrops asper*) venom by blood serum of the colubrid snake *Clelia clelia*. *Toxicon* **20**, 571–579 (1982).
38. Rios, F. M. & Zimmerman, L. M. Immunology of Reptiles. in *eLS* 1–7 (2015). doi:10.1002/9780470015902.a0026260.
39. Wang, T. *et al.* Evidence of IgY Subclass Diversification in Snakes: Evolutionary Implications. *J. Immunol.* **189**, 3557–3565 (2012).
40. Goetz, S. M. *et al.* Serum-based inhibition of pitviper venom by eastern indigo snakes (*Drymarchon couperi*). *Biol. Open* **8**, 1–5 (2019).
41. Gallardo, G., Scrocchi, G. J., Di Giacomo, A. & Giraud, A. Boiruna maculata (mussurana, víbora lula, mamona). Prey and predation behavior. *Herpetol. Rev.* **37**, 349–350 (2006).
42. Lomonte, B., Cerdas, L., Solórzano, A. & Martínez, S. El suero de neonatos de *Clelia clelia* (Serpentes: Colubridae) neutraliza la acción hemorrágica del veneno de *Bothrops asper* (Serpentes: Viperidae). *Rev. biol. trop* **38**, 325–6 (1990).
43. Nogueira, C. C. *et al.* Atlas of Brazilian Snakes: Verified Point-Localities Maps to Mitigate the Wallacean Shortfall in a Megadiverse Snake Fauna. *South Am. J. Herpetol.* **14**, 1 (2020).
44. Scott Jr., N. J. *et al.* The genera Boiruna and Clelia (serpentes: pseudoboini) in Paraguay and Argentina. *Papéis Avulsos Zool. (São Paulo)* **46**, (2006).
45. Cacciali, P. *et al.* The Reptiles of Paraguay: Literature, Distribution, and an Annotated Taxonomic Checklist. Special Publication 11, Museum of Southwestern Biology, University of New Mexico. *Spec. Publ. Museum Southwest. Biol.* **11**, 1–373 (2016).
46. Carreira, S; Hladky, R; Lamas, D & Negrin, E. *Herpetological Reviews.* **49**, 511–560 (2018).
47. Zaher, H. A new genus and species of pseudoboine snake , with a revision of the genus *Clelia* (Serpentes , Xenodontinae). (2016).
48. Wright, T; Floyd, E; Camper, J D & Nilsson, J. *Clelia clelia* - Natural History Notes. *Herpetol. Rev.* **50**, 141–149 (2019).
49. Cerdas, L. & Lomonte, B. Estudio de la capacidad ofiofaga y la resistencia de la zopilota. *Toxicon* **20**, 936–939 (1982).
50. Vital Brazil, D. A-defesa-contra-o-ophidismo - Vital Brazil (1911).pdf. (1911).
51. Cej, J. M. *Reptiles del noroeste, nordeste y este de la Argentina. Herpetofauna de las selvas subtropicales, Puna y Pampas.* (1993).
52. Martins, L. J., De Araújo, P. M. F., Bon, C., Hyslop, S. & De Araújo, A. L. In vitro hemolytic activity of *Bothrops lanceolatus* (FER-DE-LANCE) venom. *J. Venom. Anim. Toxins Incl. Trop. Dis.* **15**, 498–508 (2009).
53. Sigma-Aldrich. BCA assay Technical bulletin. 1–6.
54. Kishimoto, M. & Takahashi, T. A spectrophotometric microplate assay for L-amino acid oxidase. *Anal. Biochem.* **298**, 136–139 (2001).

55. Laemmli, U. K. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nat. Publ. Gr.* **228**, 726–734 (1970).
56. Bonilla, C. & Zavaleta, A. Estudio bioquímico del veneno de la serpiente *Bothrops hyoprurus*. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Publica* vol. 14 18–32 (1997).
57. Fortes-Dias, C. L. Endogenous inhibitors of snake venom phospholipases A2 in the blood plasma of snakes. *Toxicon* **40**, 481–484 (2002).
58. Guo, C., Liu, S., Yao, Y., Zhang, Q. & Sun, M. Past decade study of snake venom L -amino acid oxidase. *Toxicon* **60**, 302–311 (2012).
59. Kihara, H. Studies on Phospholipase A in *Trimeresurus flavoviridis*. **349**, 341–349 (1976).
60. Okumura, K., Masui, K., Inoue, S., Ikeda, K. & Hayashi, K. inhibitor from the serum of the non-venomous snake *Elaphe quadrivirgata*. *Society* **171**, 165–171 (1999).
61. Dessauer, H. C. Blood chemistry of reptiles: Physiological and evolutionary aspects. in *Biology of the Reptilia* vol. Vol. 3. 1–71 (1970).
62. Zhong, L. & Huang, C. Isolation and biochemical characterization of a gamma-type phospholipase A2inhibitor from *Macropisthodon rudis* snake serum. *Toxicon* **122**, 1–6 (2016).
63. Oliveira, F. *et al.* rBaltMIP, a recombinant alpha-type myotoxin inhibitor from *Bothrops alternatus* (*Rhinocerophis alternatus*) snake, as a potential candidate to complement the antivenom therapy. *Toxicon* **124**, 53–62 (2016).
64. Perales, J. *et al.* Molecular Structure and Mechanism of Action of the Crotoxin Inhibitor from *Crotalus durissus terrificus* Serum. *Eur. J. Biochem.* **227**, 19–26 (1995).