

“A la deriva”: Caracterización y análisis comparativo de las toxinas presentes en los venenos de *Bothrops alternatus* y *Bothrops pubescens*

Mikaela Cúparo
Tutor: Víctor Morais

Índice

Resumen	3
1. Introducción	4
1.1. Generalidades de los ofidios (Squamata: Serpentes).....	4
1.1.1. Veneno.....	6
1.2. Especies de importancia médica en Uruguay.....	7
1.2.1. Género <i>Bothrops</i>	8
1.2.1.1. <i>Bothrops alternatus</i>	9
1.2.1.2. <i>Bothrops pubescens</i>	10
1.3. Accidente ofídico.....	11
1.3.1. Ofidismo como problemática social.....	11
1.3.2. Accidente ofídico en Uruguay.....	12
1.4. Toxinas de los venenos.....	14
1.4.1. Metaloproteasas (SVMP).....	16
1.4.2. Serinoproteasas (SVSP).....	17
1.4.2.1. Enzimas de tipo trombina.....	18
1.4.3. Fosfolipasas A ₂ (PLA ₂).....	18
1.4.4. L-amino oxidasas (LAAO).....	19
1.4.5. Otros componentes.....	19
2. Objetivos	20
2.1. Objetivo general.....	20
2.1.2. Objetivos específicos.....	20
3. Materiales y métodos	21
3.1. Venenos.....	21
3.2. Suero antiofídico.....	21
3.3. Sangre ovina.....	21
3.4. Ensayos.....	22
3.4.1. SDS-Page.....	22
3.4.2. Ensayo de actividad gelatinasa.....	22
3.4.3. Zimograma.....	23
3.4.4. Ensayo de actividad de tipo trombina.....	23
3.4.5. Ensayo de hemólisis indirecta.....	24
3.4.6. Ensayo de actividad L-amino oxidasa.....	25
3.5. Análisis de datos.....	26
4. Resultados	27
4.1. Composición de los venenos.....	27
4.1.2. SDS-Page.....	27
4.2. SVMP.....	29
4.2.1. Ensayo de actividad gelatinasa.....	29
4.2.2. Zimograma.....	29
4.3. SVSP.....	30
4.3.1. Ensayo de actividad de tipo trombina.....	30
4.4. PLA ₂	32
4.4.1. Ensayo de hemólisis indirecta.....	32
4.5. LAAO.....	33
4.5.1. Ensayo de actividad L-amino oxidasa.....	33
5. Discusión	34
6. Conclusiones y perspectivas	40
Bibliografía	41
Agradecimientos	49



Resumen

Bothrops alternatus y *Bothrops pubescens* conocidas comúnmente como Crucera y Yará, respectivamente, son dos ofidios de importancia médica en Uruguay. Prácticamente la totalidad de los accidentes ofídicos se deben a estas dos especies, contabilizando un promedio de 60 casos anuales. Sus venenos se caracterizan por ser de tipo hemotóxico, causando graves alteraciones en la coagulación y generando un desbalance del sistema hemostático en general. En caso de no realizarse el tratamiento adecuado, la mordida puede llegar a ser letal o causar secuelas considerables como necrosis o amputaciones del miembro afectado. El único antídoto específico disponible a escala global para el tratamiento del accidente ofídico es el suero antiofídico heterólogo. Este se obtiene a partir de anticuerpos extraídos de animales de producción, generados en respuesta a la inyección de pequeñas dosis de veneno. El suero antiofídico es un potente agente neutralizante de los componentes tóxicos de los venenos, pero cuenta con una serie de limitaciones. Entre ellas la generación de respuestas adversas debido a los fragmentos de anticuerpos de origen no humano. Otro aspecto central de los sueros, es que deben elaborarse a partir de un pool de venenos adecuado para la región donde se usa. Esta situación que no ocurre en Uruguay, donde el suero empleado se exporta de Argentina (Laboratorio BIOL) y no utiliza veneno de la especie *B. pubescens*. En general, la especie causante del accidente no es identificada y el tratamiento se aplica de forma indistinta. Los venenos son mezclas complejas de principalmente enzimas de naturaleza proteica que actúan como toxinas funcionales. En este trabajo, se constató que hay diferencias entre la composición relativa de los venenos de *B. alternatus* y *B. pubescens*. Se profundizó en la caracterización de las actividades y componentes de los venenos. A su vez, se desarrolló un ensayo novedoso para la evaluación de la actividad de tipo trombina, utilizando un sustrato preferencial de trombina asociado a un cromóforo, el ensayo reviste de utilidad para el testeo de compuestos neutralizantes, ya que es sensible al suero antiofídico e inhibidores. Se encontró que ambas especies tienen actividad L-amino oxidasa, gelatinasa y de tipo trombina comparable. Se encontraron diferencias respecto a la actividad hemolítica indirecta, sugiriendo que hay diferencias en cuanto a la representación y composición de fosfolipasas entre los venenos. Otras diferencias se vieron a nivel de los tipos de metaloproteasas de los venenos y la respuesta al uso de distintos inhibidores.



1. Introducción

1.1. Generalidades de los ofidios (Squamata: Serpentes)

Los ofidios se encuentran dentro de la clase Reptilia comprendidos dentro del suborden Serpentes, perteneciente al orden más diverso de reptiles: Squamata (Sites et al., 2011), el que incluye además a los saurios (lagartos y anfisbenas). Como el resto de los escamados, se caracterizan por presentar escamas córneas a lo largo de todo el cuerpo y mudar de forma completa periódicamente (Vitt & Caldwell, 2014). Se conocen a la fecha más de cuatro mil especies de serpientes, siendo el segundo grupo más diverso dentro de los reptiles actuales (Uetz et al., 2023). En Uruguay, la mayoría de representantes de nuestra fauna son ofidios, de las setenta y dos especies de reptiles que se encuentran en nuestro territorio, treinta y ocho pertenecen a este suborden (Carreira, 2024). La etimología de la palabra serpiente se rastrea como una derivación de *serpere* que significa “arrastrarse” y esto se debe a una de las características principales de este suborden que es la ausencia de miembros (Beolens et al., 2011). Dentro de las serpientes hay diversas especializaciones. Si bien la mayoría son terrestres, existen tanto especies fosoriales como arborícolas y marinas, así mismo, se encuentran en todos los continentes excepto la Antártida (Mattinson, 1986). En cuanto a su reproducción, existen tanto especies ovíparas como vivíparas (Vitt & Caldwell, 2014). Las fosetas loreales (subfamilia Crotalinae, víboras de foseta) y labiales (familia Boidae, boas) permiten la generación de una imagen de calor, de gran utilidad en aquellas especies que depredan sobre animales ectotermos como aves y mamíferos (Newman & Hartline, 1982). Se trata de cavidades que aparecen en la región cefálica, entre la narina y el ojo (región loreal) o sobre las escamas labiales (labial) (Figura 2). Las fosetas actúan como órganos termorreceptores, llevan la información de calor al cerebro, donde se integra con la información visual (lumínica) a nivel de procesamiento superior (Gracheva et al., 2010). Generalmente se encuentran en especies de hábitos crepusculares, dónde la visión de calor ocupa un rol crucial (Carreira et al., 2005).

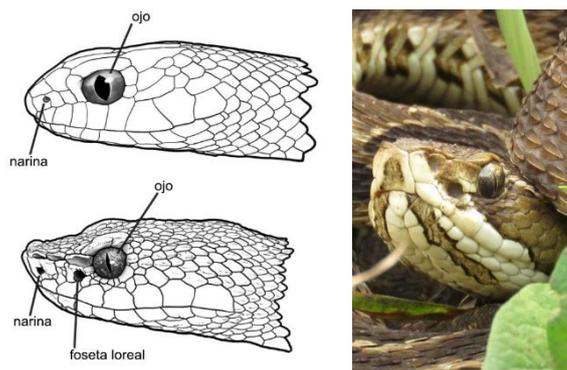


Figura 2. Ilustración en vista lateral de la foseta loreal (inferior) en contraste con una serpiente carente de la misma (superior). Fotografía de la vista frontal de la foseta loreal de *Bothrops alternatus*. Ilustración: Roberto Ayala, traducido. Fotografía de Adrián Antúnez.

En general, los ofidios maximizan la cinética del cráneo, algo novedoso dentro de los reptiles, ya que en otros grupos es de tipo robusto y bien osificado (Iordansky, 1986; Kochva, 1987; Lee, 2021). La cinética se refiere a la gran movilidad del cráneo, debido a la modificación de sus huesos. Principalmente el alargamiento del cuadrado; que articula con la mandíbula inferior y el cráneo generando la presencia de varios puntos



de quinesis (Fig. 1). Los ofidios presentan la mandíbula inferior no fusionada en la región frontal. Las hemimandíbulas se encuentran unidas entre sí por un ligamento elástico (Fig. 1). Estas características en conjunto les permiten alcanzar una gran apertura bucal que resulta necesaria al momento de la ingesta de presas que generalmente son de gran tamaño y deben ingerirse enteras (Kardong, 1980; Kardong et al., 1986).

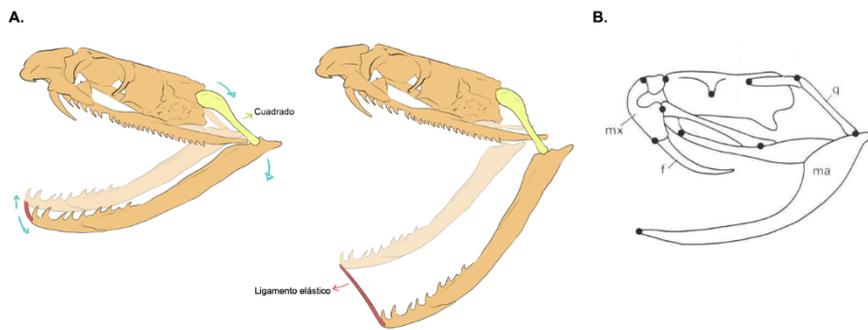


Figura 1. Esquematación de la cinética craneana en ofidios: **A.** Vista lateral del cráneo de un ofidio proteroglifo. Apertura mandibular, se resaltan el cuadrado móvil y alargado, la flexibilidad del cráneo y el ligamento elástico que une las hemimandíbulas inferiores. Modificado de (Deutscher, 2018). **B.** Vista lateral del cráneo de un ofidio solenoglifo. En negro se indican los puntos de quinesis, todas aquellas articulaciones que son capaces de tener desplazamientos. mx: maxilar; f: glifo; q: cuadrado; ma: mandíbula. Modificado de (Kardong et al., 1986).

La implantación dentaria de los ofidios es pleurodonta, es decir, lateral y superficial, así como de recambio continuo, común al resto de escamados (Mahler & Kearney, 2006). Sin embargo, dentro de los ofidios han surgido en algunos linajes especializaciones respecto al desarrollo de la producción de veneno, con la aparición de un aparato inoculador que difiere de la dentición homodonta -con todos los dientes de igual forma y tamaño- característica del resto de los reptiles. Se distinguen cuatro tipos de denticiones dentro de las serpientes: aglifa, opistoglifa, proteroglifa y solenoglifa (Fig. 3). Los glifos se definen como dientes modificados que se encuentran conectados con una glándula de veneno y favorecen su inoculación.

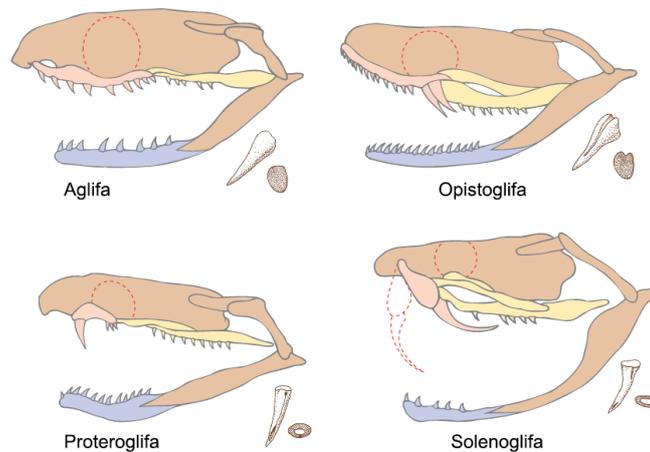


Figura 3. Tipos de dentición presentes en ofidios. Cráneo y vista lateral y dorsal de los dientes inoculadores. Hueso maxilar en color rosado. **A.** Dentición aglifa, todos los dientes presentan mismo tamaño y forma, el maxilar es largo y de posición horizontal. No poseen dientes inoculadores. **B.** Dentición opistoglifa, maxilar largo con un par de glifos modificados en su

extremo posterior que poseen un canal lateral abierto. **C.** Dentición proteroglifa, el maxilar se acorta considerablemente, los glifos son de posición anterior. El canal presenta una sutura, no cierra del todo. **D.** Dentición solenoglifa, el maxilar es corto y móvil, se detalla su movimiento en líneas punteadas rojas. El tamaño de los glifos -de posición anterior- aumenta considerablemente, el canal se cierra e internaliza. Modificado de Lee (2013).

En la dentición de tipo aglifo, todos los dientes son de igual forma y pequeño tamaño, si bien algunas especies pueden presentar dientes modificados con especializaciones, estas no se relacionan con la inoculación de sustancias tóxicas. Tal es el caso de algunas especies del género *Xenodon*, que poseen un diente de posición posterior alargado que no presenta ningún tipo de canal y responde a una dieta especializada de tipo batracófaga (Carreira & Maneyro, 2013). En la dentición opistoglifa, los glifos se encuentran en posición posterior y presentan un canal abierto, por lo que la inoculación no es del todo eficiente, parte del veneno se pierde. Sin embargo, algunas especies con este tipo de dentición pueden presentar veneno de riesgo considerado de importancia clínica y causar accidentes ofídicos en consecuencia (Prado-Franceschi & Hyslop, 2002). Las especies con tipo de dentición aglifa y opistoglifa pertenecen a las familias Colubridae (culebras) y Atractaspididae (Deufel & Cundall, 2006).

Dentro de las estructuras más especializadas en la inoculación de veneno se encuentran las denticiones de tipo proteroglifa y solenoglifa, presentes en especies que poseen un veneno considerado de importancia médica (Lee, 2021). La dentición proteroglifa es característica de los elápidos (corales, cobras y mambas), especies potencialmente mortales. En este caso, el glifo se ubica en posición anterior y presenta una sutura, que cierra parcialmente el canal conectado con la glándula de veneno (McCarthy, 1985). Los dientes son de posición fija, contrario a lo que ocurre en el último tipo de dentición, el más especializado. Las especies con dentición solenoglifa (todos vipéridos y especies del género *Atractaspis*, familia Atractaspididae) presentan un glifo de posición anterior y móvil, el maxilar reduce y desplaza en asociación con una musculatura contráctil, lo que permite que el diente se pliegue sobre el techo de la boca cuando el animal la cierra y protruye al momento de la inoculación (Carreira et al., 2005; Gutiérrez et al., 2017). Esto permite a su vez, aumentar el tamaño del glifo y tener un rango de apertura bucal mayor respecto a las especies con dentición de tipo proteroglifa.

1.1.1. Veneno

El veneno de las serpientes significó una adaptación evolutiva que permitió la captura de presas, su inmovilización, iniciar los procesos de digestión y como función secundaria, ser empleado como defensa (Mattinson, 1986; Young et al., 2002). Las glándulas de síntesis de veneno en ofidios se encuentran ubicadas en la cabeza, en los laterales por debajo de los ojos y desembocan en un glifo mediante un conducto glandular (Fig. 4). Constituyen una cápsula que se conforma de un epitelio compuesto por células serosas encargadas de secretar proteínas y células secretoras de mucus, a nivel de los conductos glandulares (Fry et al., 2009). Se encuentra rodeada de musculatura contráctil, controlada a voluntad por el animal al momento de la inoculación, vaciando el contenido hacia los glifos. Si bien este es el plan general, el tamaño y posición de la glándula es variable entre las especies, así como su capacidad de almacenamiento. El veneno se almacena tanto en la luz de la glándula como en los dos tipos celulares que la tapizan. En los vipéridos, la luz del órgano es el principal almacenamiento y suelen poseer pocos gránulos secretores, contrario a lo que ocurre en elápidos, donde se almacena principalmente a nivel de las propias células ya que tienen un lumen pequeño (Fry et al., 2007; Fry et al., 2009). Actualmente se sugiere una evolución independiente de los sistemas de inoculación de veneno en vipéridos y elápidos (Kardong, 1980; Sites et al., 2011).



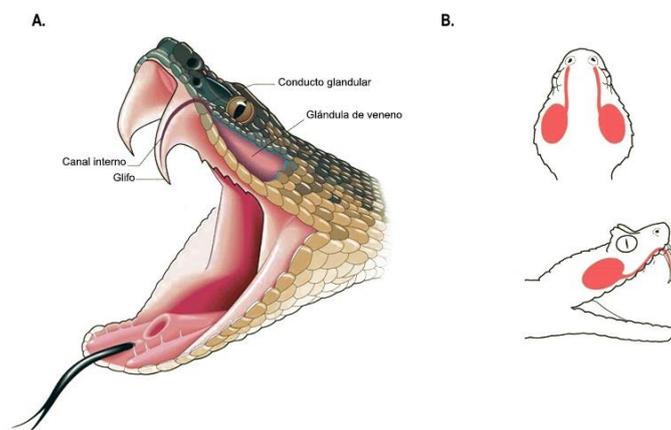


Figura 4. Anatomía de la glándula de veneno de un ofidio solenoglifo. **A.** Estructura del aparato inoculador, ubicación lateral de la glándula de veneno y canal interno asociado al glifo móvil. **B.** Disposición dorsal y lateral de la glándula de veneno. Modificado de QA internacional (2009).

1.2. Especies de importancia médica en Uruguay

En Uruguay se encuentran presentes cuatro especies de ofidios que poseen venenos considerados de importancia médica (Figura 5). Estas se encuentran dentro de las familias Viperidae y Elapidae. La familia Viperidae es representada por dos géneros en nuestro país: *Bothrops* y *Crotalus*, contando con dos especies dentro del primero; *Bothrops alternatus* y *Bothrops pubescens* (Crucera y Yará, respectivamente) y una única especie dentro del segundo; *Crotalus durissus terrificus* (Víbora de cascabel). Por otro lado, la familia Elapidae también presenta una única especie dentro de nuestro territorio; *Micrurus altirostris* (Coral) (Carreira et al., 2005). Las especies mencionadas anteriormente, son prioritarias para su conservación a nivel nacional según los criterios del Sistema Nacional de Áreas Protegidas (SNAP) debido a su valor medicinal, económico y cultural (Soutullo et al., 2013). Esta categorización se debe al valor productivo de sus venenos, que pueden ser utilizados para la elaboración de suero antiofídico u otros productos. Así mismo, son especies que se consideran de interés para investigación. Por otro lado, exceptuando a *C. durissus terrificus*, ambas especies del género *Bothrops* como *M. altirostris* son especies de caza libre en Uruguay, según lo especificado en el Decreto N° 164/996 (2 de mayo de 1996), amparándose en su peligrosidad y potencial mortalidad. Sin embargo, no se registran muertes a causa del ofidismo en nuestro país desde 1986 (Carreira et al., 2006). Actualmente el CIAT (Centro de Información y Asesoramiento Toxicológico) se encuentra estudiando un caso del año 2023 con alta probabilidad de tratarse de un deceso por ofidismo (Morais, comunicación personal, 2024). Se trata de animales emblemáticos y autóctonos, contrario a lo que ocurre con el resto de especies de caza libre, las cuales son exóticas y/o introducidas o aquellas pertenecientes a la fauna autóctona, son especies consideradas plagas. No solo poseen un valor asociado a lo cultural, muchas veces con implicancias negativas (Murray & Foote, 1979), sino que son importantes controladores biológicos, especialmente de plagas o vectores como pueden serlo diferentes especies de roedores (Carreira et al., 2005).

En el caso de *C. durissus terrificus* se trata de una especie cuyas poblaciones se encuentran fuertemente disminuidas y sus registros son escasos, restringiéndose actualmente a los departamentos de Artigas y Rivera (Carreira & Maneyro, 2013). Si bien a nivel global la categoría de esta especie es LC (preocupación menor), se encuentra catalogada como EN (en peligro) a nivel nacional (Carreira & Maneyro, 2015;



Carreira & Maneyro, 2019). Es una especie con dentición solenoglifa y su veneno es de tipo neurotóxico y hemotóxico. Habita en zonas de serranías y pedregales, se alimenta preferentemente de roedores. Son animales que pueden alcanzar grandes tamaños, superando el metro y medio de longitud total. Presentan una coloración clara en tonos de castaño con un patrón de rombos blancos a lo largo de todo el cuerpo. Su cola finaliza en un crótalo (“cascabel”) compuesto por un acúmulo de mudas sucesivas y es utilizado como advertencia, generando un sonido característico Carreira & Maneyro, 2013). No se registran accidentes con esta especie en nuestro país (Carreira et al., 2006).

Figura 5. Especies consideradas de importancia médica en Uruguay. **A.** *Micrurus altirostris*



(Coral), **B.** *Crotalus durissus terrificus* (Víbora de cascabel), **C.** *Bothrops alternatus* (Crucera), **D.** *Bothrops pubescens* (Yarará). Fotografías (A-D): Ernesto Elgue, João De Angeli, Martin Amarante y equipo de guardaparques de la Laguna Garzón (Rocha, Uruguay).

Respecto a *M. altirostris*, se distribuye en todo el territorio, habita arenales, pedregales y praderas abiertas (Carreira & Maneyro, 2013). Se trata de una especie cuya categoría de conservación se encuentran evaluada como LC tanto a nivel nacional como global (Carreira & Maneyro, 2015). Es un ofidio de mediano porte -los adultos alcanzan hasta noventa centímetros- y de hábitos fosoriales. Se caracteriza por un patrón de diseño con anillos completos dispuestos a lo largo de todo el cuerpo, en triadas con los colores negro, blanco o crema y rojo. Se trata de una especie con dentición de tipo proteroglifa que posee un potente veneno neurotóxico con acción a nivel de la unión neuromuscular. Su acción es bloqueante y puede causar la muerte a raíz de una parálisis respiratoria (De Abreu et al., 2008). Se alimenta de reptiles, preferentemente anfibios, pero también saurios u otros ofidios (Carreira & Maneyro, 2013). Si bien hay un reporte ocasional de un accidente reciente causado por una mordedura de *M. altirostris* (Juanena et al., 2018), el mismo se debió a un manejo imprudente por parte de la víctima, ya que no es una especie que en nuestro país protagonice este tipo de sucesos. Se trata de un ofidio que se caracteriza por tener un temperamento dócil y esquivo (Carreira & Maneyro, 2013). El caso mencionado anteriormente se trata del único accidente registrado hasta la fecha por esta especie.

1.2.1. Género *Bothrops*

El género *Bothrops* cuenta con cuarenta y ocho especies en la actualidad (Uetz et al., 2023) y se posiciona como el principal causante de accidentes ofídicos en Sudamérica (Sant’Ana & Gutiérrez, 2015). Su distribución abarca América del Sur, central y México (Fenwick et al., 2009). Pertenece a la subfamilia Crotalinae, caracterizada por la presencia de fosea loreal. Esta característica que a su vez da nombre al género ya que *Bothrops* proviene de *bothros* que significa “agujero” y *ops* que refiere a “el ojo” refiriéndose a la posición del órgano termorreceptor (Williams et al., 2021). Se alimentan generalmente de pequeños mamíferos, aunque pueden incluir aves, anfibios, reptiles e



incluso artrópodos en su dieta. Cuentan con la particularidad de tener una reproducción vivípara. Abarcan un gran rango de tamaños, pudiendo ir desde unos pocos centímetros hasta los dos metros de longitud total (Carreira & Maneyro, 2013). En relación a su aspecto general poseen escamas carenadas a lo largo del cuerpo y la cabeza se encuentra completamente cubierta de escamas pequeñas exceptuando la escama supraocular que presenta un tamaño mayor en proporción (Carreira et al., 2005).

En cuanto a la dentición, es de tipo solenoglifo, presentan veneno considerado de importancia clínica y en aquellas especies que se ha caracterizado su acción, se ha encontrado que es hemotóxico, generando entre sus efectos principales daño localizado del tejido, mionecrosis y hemorragias (Gutiérrez & Lomonte, 1989; Larréché et al., 2021). Al encontrarse bajo situaciones de estrés, presentan un despliegue comportamental característico que implica la vibración de la cola y elevación del cuello como aviso, para posteriormente morder en caso de que la amenaza persista (Araujo & Martins, 2006). Estas características etológicas propias del género las vuelven proclives a causar accidentes ofídicos al producirse el encuentro fortuito con estas especies. En Uruguay, prácticamente la totalidad de los accidentes ofídicos son ocasionados por las dos especies de *Bothrops* que habitan en nuestro país: *Bothrops alternatus* (Crucera) y *B. pubescens* (Yarará) (Carreira et al., 2006).

1.2.1.1. *Bothrops alternatus*

Se encuentra presente en Argentina, Brasil, Paraguay y Uruguay, se presume que su distribución en nuestro país comprende todo el territorio (Carreira et al., 2005; Carreira et al., 2006). Es identificable por su patrón único de diseño. Ambas especies del género *Bothrops* presentes en Uruguay se distinguen por su diseño corporal característico. *B. alternatus* posee un patrón con manchas en forma de “C” a lo largo del cuerpo, con un reborde blanco y una cruz en el centro. La coloración general es castaña, con manchas oscuras sobre un fondo más claro, el vientre es blanquecino. En la región cefálica presenta un patrón de líneas del color de las manchas corporales que generalmente forma una cruz en el centro de la zona dorsal. A su vez, esta especie presenta dos bandas laterales oscuras en la región ventral de la cabeza, ausentes en *B. pubescens* (Figura 6). Puede llegar a medir hasta 150 centímetros de longitud total. La cabeza se encuentra bien diferenciada del cuerpo, es de forma triangular y se afina hacia el hocico (Carreira et al., 2005).

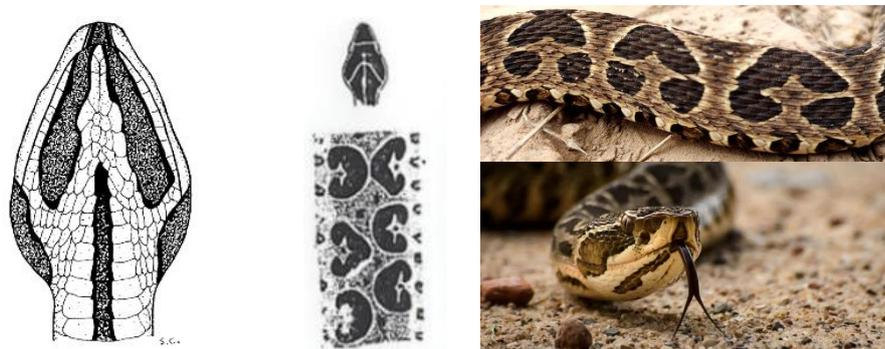


Figura 6. Patrón de diseño de *Bothrops alternatus*, **A.** vista ventral de la cabeza, se aprecian las bandas oscuras características, **B.** Vista dorsal de la cabeza, se distingue la forma similar a una “cruz” y el diseño de “C” a lo largo del cuerpo. Extraídos de (Carreira et al., 2005). **C.** Diseño corporal lateral y diseño de la cabeza (Fotografías: Diego Oscar y Javier González, respectivamente).



Habita generalmente en zonas bajas y húmedas con pajonales. No se trata de una especie especialmente agresiva. Al igual que otras especies del género posee un comportamiento de advertencia que consiste en colocar el cuello en forma de "S", enrollarse y agitar la cola enérgicamente golpeando el sustrato. Se alimenta preferentemente de roedores, por lo que puede llegar a ingresar a viviendas y/o galpones en busca de alimento (Carreira & Maneyro, 2013).

1.2.1.2. *Bothrops pubescens*

Se distribuye desde Brasil (Rio Grande do Sul) hasta Uruguay, dónde se encuentra restringida a la región este del país (Carreira et al., 2005; Carreira et al., 2006). Esta especie presenta menores dimensiones que su congénere, no alcanzando en general el metro de longitud. Es diferenciable de *B. alternatus* por su patrón de diseño (Figura 7). Presenta una coloración general grisácea con manchas oscuras en forma de trapecio a los laterales del cuerpo en toda su extensión. Estas manchas pueden o no fusionarse en el centro, sobre el eje dorsal del cuerpo. Las manchas trapecoidales presentan un reborde blanquecino. La cabeza es de forma triangular y se halla bien diferenciada del cuerpo.



Figura 7. Patrón de diseño de *Bothrops pubescens*, **A.** vista ventral de la cabeza, **B.** Vista dorsal de la cabeza, se distinguen las manchas irregulares en la región cefálica y el diseño de trapecios a lo largo del cuerpo. Extraídos de (Carreira et al., 2005). **C.** Diseño corporal en vista dorsal y diseño de la cabeza, se aprecia la banda lateral oscura (Fotografías: Patricia Bidondo y Carlos Schmidutz, respectivamente).

En la región cefálica presenta manchas oscuras irregulares y una banda lateral oscura que va desde atrás del ojo hasta el comienzo de la mandíbula. El vientre es claro y levemente manchado. Las crías poseen el extremo de la cola de color crema, coloración que va perdiéndose en las mudas sucesivas (Carreira et al., 2005). Habita ambientes de serranías, aunque ocasionalmente puede llegar a encontrarse en zonas bajas de bañados. Es una especie de actividad nocturna. Es en general más agresiva que *B. alternatus* al producirse un encuentro si bien comparten el mismo despliegue defensivo de advertencia. Los juveniles se alimentan de artrópodos, saurios, anfibios y mamíferos de pequeño porte mientras que los adultos de anfibios, mamíferos y aves (Carreira & Maneyro, 2013).



1.3. Accidente ofídico

1.3.1. Ofidismo como problemática social

Se define al accidente ofídico como el cuadro clínico desencadenado por la mordedura de un ofidio en respuesta a la inoculación de veneno: una mezcla de sustancias tóxicas, esencialmente enzimas de naturaleza proteica con un alto grado de especialización (Carreira et al., 2006; Gutiérrez et al., 2017). Pueden distinguirse desde efectos leves y localizados, como la inflamación de la zona en el caso de algunas culebras, hasta el daño sistémico, necrosis, hematotoxicidad y neurotoxicidad, entre otros, característicos de los venenos de las especies de importancia médica (Carreira et al., 2005; Carreira et al., 2006). El accidente ofídico es considerado por la Organización Mundial de la Salud (OMS) como una enfermedad tropical desatendida (ETD) (Chippaux, 2017; Williams et al., 2019). Esto se debe, en gran parte, a los sectores socioculturales sobre los cuáles el ofidismo tiene impacto. Las ocurrencias de accidentes ofídicos son comunes y se restringen en un 95% de los casos a las zonas rurales pertenecientes a países en vías de desarrollo (Chippaux, 2017; Gutiérrez et al., 2017). Así mismo, los números totales de envenenamientos y muertes ocasionadas por ofidismo son estimados, debido a que no siempre se lleva un registro estricto de los casos (Figura 8).

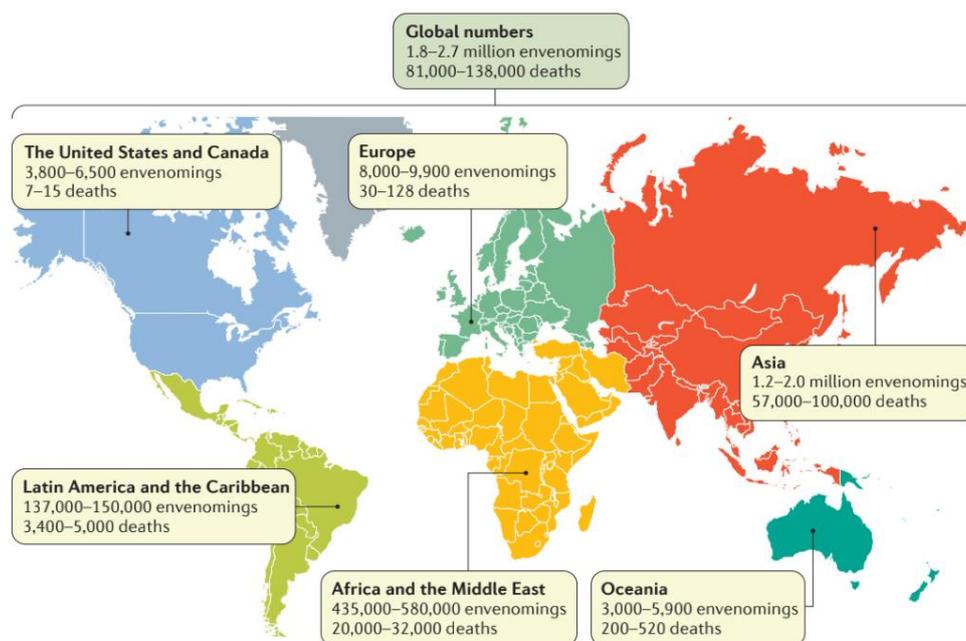


Figura 8. Distribución geográfica del número estimado de envenenamientos y muertes por ofidismo a escala global. Extraído de (Gutiérrez et al., 2017).

Las cifras estimadas sugieren que casi seis millones de personas se encuentran en riesgo de cruzarse con un ofidio venenoso, un promedio de ocho mil mordidas por día y un total de casi tres millones de casos de envenenamiento que se traducen en una mortalidad anual de entre 80.000 y 138.000 defunciones (Gutiérrez et al., 2017; Bawaskar et al., 2021). En la Figura 8, se observa que prácticamente la totalidad de estas muertes ocurren en Asia y África, luego se mantienen cifras menores pero altas en América del Sur y decrecen considerablemente para Oceanía y América del Norte. La frecuencia de ocurrencia de las mordeduras depende directamente de la riqueza de especies y la densidad de personas que coexisten en un ambiente dado (Carreira et al., 2006). Las diferencias entre las distintas regiones y el impacto del ofidismo, así como



su mortalidad reflejan en gran medida la situación sanitaria y de salud en general de los países implicados. Un buen sistema de respuesta y disponibilidad de tratamiento (suero antiofídico) se traduce en una baja mortalidad. Al contrario, en regiones donde se carece de estos recursos como gran parte de África y Asia y América Latina el accidente ofídico se torna una problemática de gran prevalencia y la mortalidad aumenta a cifras alarmantes. Cabe mencionar, que la población de riesgo, más expuesta a sufrir un accidente ofídico, es aquella que habita o desarrolla actividad laboral en ambientes donde se encuentran las especies de importancia médica (Blaylock, 2004). En adición, desarrollarse en un ambiente de riesgo y tener un sistema de sanidad con carencias y falta de disponibilidad de tratamiento es una situación recurrente en los países de alta mortalidad (Bawaskar et al., 2017). Se trata de un fenómeno explicado por múltiples causas, es necesario contemplar otros aspectos del accidente ofídico más allá de su mortalidad.

Las consecuencias del accidente ofídico pueden tener importantes efectos subletales, ocasionando graves secuelas, incluso luego del tratamiento. Así mismo, tanto el riesgo de muerte como el de padecer afectaciones más severas o de forma permanente se correlaciona directamente con el tiempo que transcurre entre el accidente y la administración del suero antiofídico. Por lo tanto, la cercanía de los centros de salud con disponibilidad de suero a zonas donde se encuentran personas expuestas a sufrir este tipo de accidentes resulta crucial (Chippaux, 2017; Gutiérrez et al., 2017). Entre las secuelas que ocasionan los accidentes ofídicos se encuentran registrados estados de morbilidad crónica, discapacidad (a causa de amputación por necrosis o afectaciones motrices/neurológicas), infecciones crónicas y/o generalizadas, úlceras y afectaciones psicológicas (Williams et al., 2011; Bawaskar et al., 2021).

Recientemente, un censo realizado sobre los casos de accidentes ofídicos relevó un total de 63.400 muertes (aproximado, por las limitantes mencionadas anteriormente) y casi tres millones de envenenamientos a escala global durante el año 2019 (Roberts et al., 2021). El mismo trabajo, recabó información sobre los accidentes ofídicos ocurridos entre 1990 y 2019, destacándose una reducción en el número de envenenamientos y víctimas fatales asociadas a esta problemática de un 36%. Dicha evolución, hacia una mitigación de esta ETD, se encuentra vinculada a que la accesibilidad a los tratamientos, prevención e información sobre ofidismo, donde pueden y deben realizarse esfuerzos mayores con este fin (White et al., 2019; Ibadullah et al., 2021).

1.3.2. Accidente ofídico en Uruguay

En Uruguay son registrados en promedio anualmente 120 casos de accidentes ofídicos, de los cuales aproximadamente 60 son de importancia médica, causados en su totalidad por *B. alternatus* y *B. pubescens* (Figura 9). Entre 2002 y 2005 se registraron un total de 239 casos, siendo mayor su prevalencia en la región sureste del país (108 casos) y de similar incidencia a nivel del litoral y noreste (65 y 66 casos, respectivamente) (Carreira et al., 2006). Los casos de accidentes ofídicos comprendidos entre 2005 y 2020 se mantienen dentro del mismo promedio anual, no estando disponibles registros públicos de los mismos. Entre 2020 y 2022 fueron registrados 143 casos de accidentes ofídicos, todos correspondientes a estas dos especies (Ministerio de Salud Pública [MSP], 2023). En cuanto a la distribución geográfica del accidente ofídico la mayoría de casos ocurren en Tacuarembó, Rivera, Salto, Cerro Largo, Lavalleja, Rocha y Maldonado (Pino, 2012; MSP, 2023).



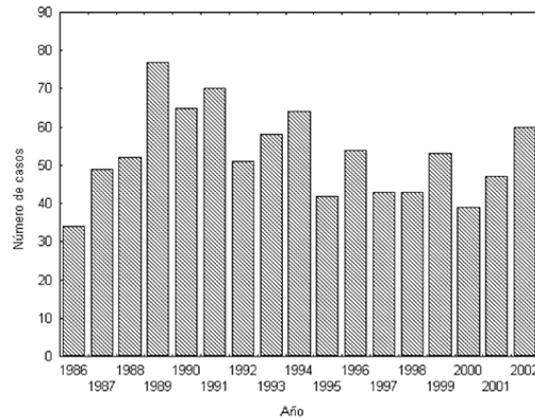


Figura 9. Casos de ofidismo en Uruguay reportados al Ministerio de Salud Pública comprendiendo el período entre 1986 (comienzo del registro obligatorio) hasta 2002. Extraído de Carreira et al. (2005).

Respecto a la estacionalidad, el mayor número de casos ocurre en verano y primavera, en concordancia con el período de actividad de estas especies, que hibernan durante las estaciones frías (Carreira et al., 2005). El rango etario de mayor incidencia del ofidismo es entre los quince y cuarenta años y presenta un sesgo hacia la población masculina. La gran mayoría de los casos ocurre en contexto de accidente laboral vinculado al trabajo rural. Un porcentaje menor ocurre en contextos de esparcimiento. Generalmente las zonas mordidas son las extremidades inferiores y superiores, siendo más frecuentes los pies y piernas, ocasionalmente las manos (Pino, 2012; Carreira et al., 2006). Se han reportado a la fecha dos accidentes con la especie *Phalotris lemniscatus*, perteneciente a la familia Colubridae, con relevantes implicancias clínicas (Negrin et al., 2019). La realización de estudios de la composición de este veneno corroboró la existencia de componentes similares a los hallados en las ponzoñas de las especies del género *Bothrops* (Bastida et al., 2019).

Desde 1986, el ofidismo es de notificación y registro obligatorio, tarea que lleva a cabo el Centro de Información y Asesoramiento Toxicológico (CIAT, Departamento de Toxicología, Facultad de Medicina, UdelaR), además de propiciar el diagnóstico y supervisión de la administración de suero antiofídico. Para el tratamiento se cuenta con un inventario de suero antibothrópico, de tipo polivalente, que se aplica indistintamente para las mordeduras ocasionadas por ambas especies del género *Bothrops* (Morais et al., 2008). Si bien la mortalidad es nula desde que comenzó a llevarse un registro de los casos de ofidismo, no existe en el país un registro de las secuelas asociadas a este tipo de problemática, aun siendo que muchas de ellas requieren un seguimiento o tratamiento prolongado en el tiempo (Bawaskar et al., 2021).

El suero antiofídico es el único tratamiento específico a nivel global, en respuesta al accidente ofídico (Gutiérrez et al., 2017; Habib & Brown, 2018). El mismo presenta una serie de importantes limitaciones cómo lo son el estar elaborado en base a un pool de especies que no siempre incluye todas aquellas en el área donde es empleado, como ocurre en Uruguay, donde el suero actualmente utilizado no contiene a la especie *B. pubescens* (BIOL Argentina; *B. alternatus*, *B. diporus* y *C. durissus*). Por otro lado, comúnmente su elaboración consiste en el uso de anticuerpos extraídos de animales de producción (caballo u oveja, generalmente), por lo que, las reacciones adversas hacia los anticuerpos de origen no humano son relativamente comunes (Morais & Massaldi, 2009). Existen registros en Uruguay de reacciones adversas de importancia clínica ante el suero antiofídico (Rodríguez et al., 2004; Morais et al., 2012) por lo que, incursionar



en otras posibles soluciones o metodologías en contraste con los sueros heterólogos, resultan necesarias de desarrollar. Si bien el tratamiento es común indistintamente de la especie que ocasione el accidente, siguen siendo diferentes. Así mismo, aunque los casos clínicos que mostraron efectos adversos ante la administración de suero antiofídico han ido disminuyendo, aún existe cierta prevalencia (Negrin et al., 2021).

Abordajes preliminares sugieren que existen diferencias en los venenos de *B. pubescens* y *B. alternatus*, cuyo entendimiento podría brindar información de interés para la optimización del tratamiento actual sobre esta problemática (Suarez & Morais, 2019). Estudios funcionales y descriptivos como los que se propone realizar durante el transcurso del presente proyecto profundizan en la dilucidación y caracterización de estos componentes.

1.4. Toxinas de los venenos

El mecanismo de acción del veneno de los ofidios puede dividirse principalmente en: daño estructural causado por proteólisis, desbalance fisiológico -al mimetizar proteínas endógenas del organismo inoculado o por inhibición competitiva- y disrupción endofisiológica. La acción de las toxinas es rápida y se direccionan hacia las zonas del organismo donde pueden acceder fácilmente a la circulación (Fry, 2005). Los venenos son mezclas complejas, compuestas casi en su totalidad por proteínas de naturaleza enzimática y una pequeña proporción de componentes menores como iones, nucleótidos, carbohidratos, entre otros. A grandes rasgos, pueden distinguirse dos tipos de venenos; hemotóxico (Viperidae) y neurotóxico (Elapidae) (Tu, 1996; Goswami et al., 2014). El veneno de las especies de *Bothrops* se caracteriza por ser de tipo hemotóxico causando importantes alteraciones de la coagulación y daño local, provocado por un desbalance del sistema hemostático a causa de sus componentes (Matsui et al., 2000; Cavalcante et al., 2023). Pese a la gran variabilidad respecto a las proporciones relativas de sus componentes, los venenos de ofidios suelen poseer un pool de proteínas relativamente conservado. Destacándose entre estos a las toxinas de tres dedos (3FTx) -toxina principal de Elapidae, no caracterizada en los venenos bothrópicos-, metaloproteasas (SVMP), fosfolipasas de tipo A₂ (PLA₂), serinoproteasas (SVSP), proteínas secretoras ricas en cisteína (CRISP) y L-amino oxidasas (LAAO) (Tsetlin, 1999; Sajevic et al., 2011; Fry et al., 2007).

Los componentes proteicos de los venenos se dividen en dos grandes grupos: polipéptidos no enzimáticos y enzimas. Los polipéptidos son toxinas que pueden actuar sobre enzimas (potenciando o inhibiendo su actividad) o directamente sobre estructuras biológicas como moléculas de membrana o de la matriz extracelular (Mackessy, 2010). Para los venenos bothrópicos se encuentran descritas dentro de este grupo las desintegrinas y lectinas de tipo C (Larréché et al., 2021). Dentro de las enzimas, se encuentran proteasas, hidrolasas principalmente (clivan proteínas mediante hidrólisis) y toxinas funcionales con acciones más específicas a nivel de las membranas celulares e incluso los tejidos, como el muscular o nervioso (Mackessy, 2010). Los ofidios del género *Bothrops* presentan en la composición de su veneno mayormente metaloproteasas (SVMP), serinoproteasas (SVSP), fosfolipasas A₂ (PLA₂) y L- amino oxidasas (LAAO) (Larréché et al., 2021). Respecto a la composición de los venenos de ofidios existe una gran diversidad de perfiles proteicos con diferente tipos y concentración, encontrándose una gran variabilidad entre individuos de un mismo género (Fry et al., 2002; Calvete et al., 2007; Tashima et al., 2008) o incluso a nivel de la misma especie (Castro et al., 2013; Calvete et al., 2009). Actualmente, se ha identificado mediante proteómica la presencia en el veneno de la especie *B. alternatus* de diez familias de toxinas y en *B. pubescens* de catorce familias diferentes, pertenecientes a las SVMP, SVSP, PLA₂ y LAAO, principalmente (Figura 10).



Observándose en ambas especies una predominancia de las SVMP. Sin embargo, hacen falta más estudios funcionales para elucidar su acción en los sistemas biológicos y evaluar que tan fiel es la representación de las toxinas a nivel de la actividad.

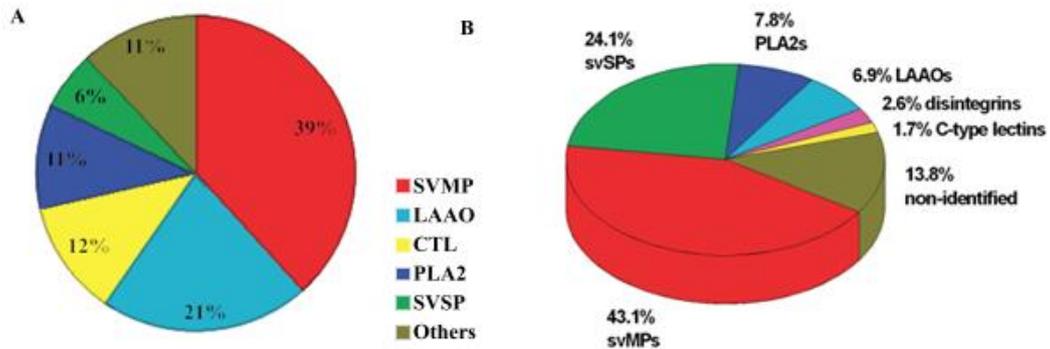


Figura 10. Toxinas presentes en los venenos de *Bothrops pubescens* (A), *Bothrops alternatus* (B) y su proporción relativa (%), dilucidadas mediante abordajes de proteómica. Gráficos extraídos de Rangel et al. (2022) y Öhler et al. (2010), respectivamente. SVMP: Metaloproteasas, LAAO: L-amino oxidasas, CTL: Lectinas de tipo C, PLA2: Fosfolipasas A₂, SVSP: Serinoproteasas.

Los efectos tóxicos asociados al veneno de las especies del género *Bothrops* se caracterizan por alteraciones de la coagulación y daño severo localizado del tejido afectado (Matsui et al., 2000). Las toxinas presentes en el veneno son capaces de activar factores de coagulación y a su vez, desencadenar la formación de fibrina mediante la acción de enzimas de tipo trombina e inhibir la agregación plaquetaria (Markland, 1998). El daño local está mediado principalmente por SVMP y PLA₂ cuya acción conjunta provoca la degradación de las membranas basales a nivel capilar y posterior lisis celular (Gutiérrez & Rucavado, 2000; Kini, 2003). La manifestación clínica del envenenamiento se caracteriza por alteraciones sistémicas incluyendo hemorragias, ocasionalmente edema pulmonar y fallo renal, pudiendo llegar a causar la muerte por falla orgánica generalizada si no se recibe un tratamiento adecuado (Gutiérrez et al., 2009).

Como se mencionó anteriormente, el veneno tiene acción a varios niveles una vez que ingresa al torrente sanguíneo, un efecto central es la interacción con los factores de coagulación que intervienen en la cascada de coagulación, una vía compleja de señalización. Entre el mecanismo de acción se encuentra la activación de los factores II (protrombina), V, VIII, X y XIII (Figura 11). La interacción de las toxinas con la cascada de coagulación y el consumo de los factores de coagulación (entre ellos el fibrinógeno, factor I) lleva a que se genere una incoagulabilidad sistémica. Las enzimas proteolíticas determinan en gran medida las afectaciones del sistema hemostático, afectando varios procesos fisiológicos tales como la agregación plaquetaria, coagulación sanguínea, fibrinólisis y presión sanguínea (Markland, 1998).



En caso de no neutralizar la acción del veneno, puede ser mortal. Las consecuencias del accidente ofídico ocasionado por especies del género *Bothrops* en los casos donde no resulta letal, suelen variar en gravedad, siendo posibles las amputaciones de los miembros afectados consecuencia de la necrosis (Gutiérrez & Lomonte, 1989; Mamede et al., 2016), así como registrándose casos esporádicos dentro de los vipéridos de ceguera o efectos psicomotores de moderados a graves (Mustapha et al., 2010; Praveen et al., 2015). Por otro lado, se han asociado lesiones renales que pueden desembocar en una patología crónica como consecuencia del envenenamiento bothrópico (Albuquerque et al., 2020).

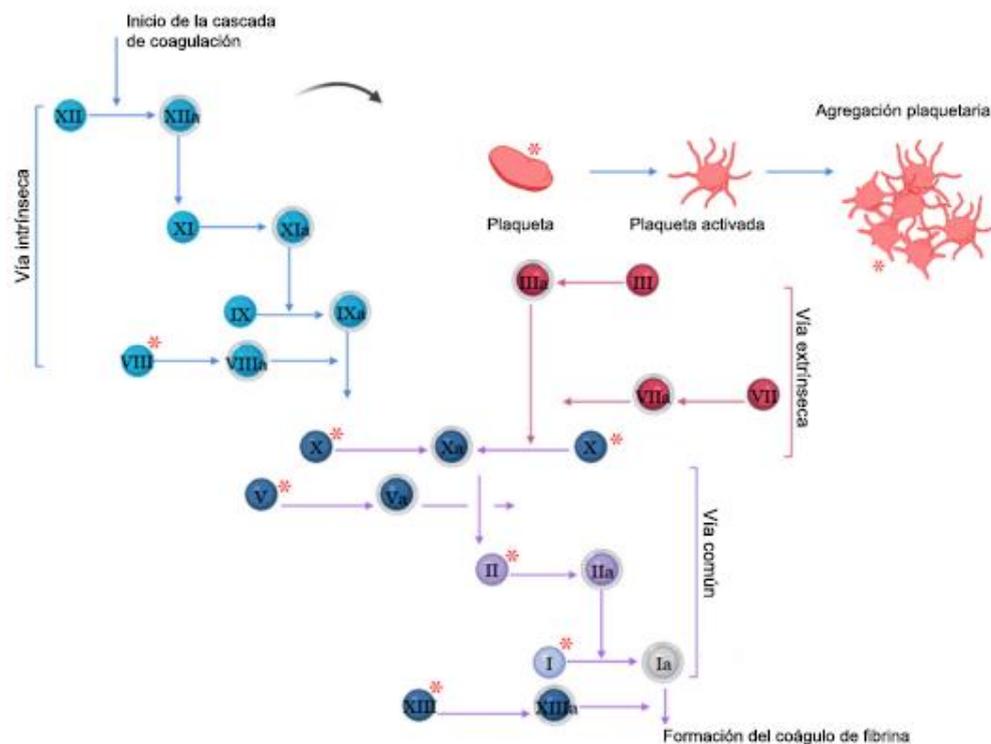


Figura 11. Esquematación de la cascada de coagulación, se detallan las vías intrínseca, extrínseca y común. (*): indica cada uno de los componentes afectados por las toxinas bothrópicas. Modificado de Cavalcante et al., (2023).

1.4.1. Metaloproteasas (SVMP)

Las metaloproteasas (SVMP, por sus siglas en inglés “Snake Venom Metalloproteinases”) son proteínas de estructura compleja, con múltiples dominios, que tienen acción sobre el sistema hemostático. Se trata de enzimas de acción proteolítica dependientes de zinc cuya presencia se encuentra descrita en los venenos de varias serpientes, especialmente dentro de la familia Viperidae (Fox & Serrano, 2009). Debido a que suelen ser un componente predominante a nivel de los venenos tienen gran relevancia en la fisiopatología del envenenamiento, por lo que han sido muy estudiadas mediante diferentes abordajes y caracterizadas en varias especies dentro del género *Bothrops* (Rucavado et al., 2004; Moura-da-Silva et al., 2011). Al ser dependientes de zinc, su actividad es eficientemente inhibida por agentes quelantes como el EDTA (Mackessy, 2010).



Estructuralmente, se caracterizan por un dominio de unión a zinc y un dominio metaloproteasa, pueden presentar más dominios y abarcan un variado rango de pesos moleculares. Actualmente, según la revisión de Olaba y colaboradores (2020) pueden subdividirse en tres clases según la organización de sus dominios: PI, PII y PIII. Las SVMP dentro de PI constituyen el tipo más “simple” constando únicamente de un dominio metaloproteasa, las PII poseen además un dominio desintegrina y las PIII agregan un dominio rico en cisteína (Figura 12). Las desintegrinas son capaces de alterar las adhesiones mediadas por integrina (uniones celulares), inhibiendo la agregación plaquetaria, poseen un motivo característico de reconocimiento de integrinas: RGD (Arginina-Lisina-Aspartato) en su extremo C-terminal (Markland, 1998). Los dominios ricos en cisteína actúan como ligandos de factores de coagulación (Serrano et al., 2006).

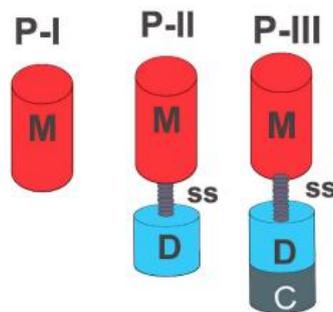


Figura 12. Estructura de las tres clases de metaloproteasas presentes en los venenos de serpiente: PI, PII y PIII. M: dominio metaloproteasa, D: dominio desintegrina, C: dominio rico en cisteína, ss: puente de disulfuro. Extraído de (Olaoba et al., 2020).

Son capaces de clivar proteínas de la matriz extracelular. El efecto principal que provoca su acción en cuanto a su hemotoxicidad es la hemorragia. Las SVMPs actúan degradando componentes de la matriz extracelular tales como fibronectina, laminina, colágeno IV y proteoglicanos a nivel de la membrana basal -capa más interna- de los endotelios vasculares (Mackessy, 2010). Sin embargo, la actividad proteolítica de estas enzimas no se limita a la acción sobre componentes de la matriz extracelular, pueden actuar degradando factores que intervienen en la cascada de coagulación. Entre ellos, el factor von Willebrand, lo que afecta la agregación plaquetaria, ya que es una proteína de interacción con la fibronectina -también afectada por las SVMPs- que permite estabilizar la unión de las plaquetas (Markland, 1998; Mackessy, 2010). Otro de los factores afectados es el fibrinógeno (factor I), precursor de la fibrina (factor Ia) que permite la formación de coágulos.

En síntesis, las metaloproteasas de matriz degradan la matriz extracelular, dañando el vaso sanguíneo y a su vez, cuando el mecanismo endógeno de respuesta, la cascada de coagulación es gatillado, consume los factores asociados. Esto potencia la gravedad del cuadro hemorrágico. Resumidamente, su acción a nivel de la membrana basal la digiere y al interactuar con factores de coagulación se inhibe la actividad plaquetaria.

1.4.2. Serinoproteasas (SVSP)

Las serinoproteasas (SVSPs por sus siglas en inglés: “Snake Venom Serine Proteinases”) son enzimas con actividad proteolítica capaces de clivar mediante hidrólisis enlaces peptídicos y contienen en su sitio activo de forma conservada un residuo de serina altamente reactivo. No poseen un único sustrato y su acción repercute en varios procesos fisiológicos vinculados al sistema hemostático como la cascada de coagulación, el sistema fibrinolítico -degradación de coágulos- y el sistema calicreína-



cinina -vinculado a las inflamaciones-, generando un desbalance de gran relevancia (Kini, 2005a; Serrano, 2013). Dentro de este grupo se encuentran proteasas procoagulantes, activadoras de los factores VII, X y II (protrombina), enzimas de tipo trombina, proteasas anticoagulantes y fibrinolíticas, activadoras de plasminógeno - enzima que cataliza la disolución de coágulos-.

1.4.2.1. Enzimas de tipo trombina

Las enzimas de tipo trombina (“Thrombin-like”) son un grupo de toxinas bien caracterizadas en los venenos de ofidios pertenecientes a las SVSPs (Matsui et al., 2000; Kini, 2005a). La trombina (factor IIa) es una proteína que se encuentra a nivel del plasma en forma de protrombina (factor II) -inactiva- es activada al desencadenarse la cascada de coagulación y cataliza la conversión de fibrinógeno (factor I) en fibrina (factor Ia) permitiendo la formación de coágulos.

Como su nombre lo indica, las enzimas de tipo trombina tienen una acción similar a esta proteína, siendo capaces de reconocer secuencias de corte a nivel del fibrinógeno y catalizar su conversión a fibrina. Debido a que la secuencia de clivaje de este tipo de toxinas difiere de la secuencia de la trombina, la fibrina generada a partir de esta reacción presenta una conformación anormal. En consecuencia, su acción fisiológica se ve alterada ya que requiere de factores de estabilización (factor XIII) que no son capaces de interaccionar estabilizando el coágulo, por lo que se genera un consumo de fibrinógeno sanguíneo alterando gravemente la homeostasis del sistema hemostático (Mackessy, 2010).

1.4.3. Fosfolipasas A₂ (PLA₂)

Las fosfolipasas A₂ (PLA₂, por sus siglas en inglés “Phospholipase A₂”) son enzimas capaces de hidrolizar enlaces éster a nivel de los glicerofosfolípidos con la consecuente liberación de ácidos grasos. Entre ellos se encuentran el ácido araquidónico y lisofosfatídico, ambos mediadores de diversos procesos fisiológicos ya que intervienen como moléculas de señalización (Hiu & Khun, 2020).

El calcio es un cofactor necesario para la catálisis por lo tanto estas enzimas presentan un dominio de unión a Ca²⁺ altamente conservado. Estructuralmente se componen por tres hélices alfa y dos láminas beta antiparalelas que son entrecruzadas por puentes de disulfuro (Scott, 1997). El sitio activo es de carácter hidrofóbico, facilitando la afinidad con su sustrato, los fosfolípidos. Las PLA₂ halladas en los venenos de serpientes se clasifican en dos grandes grupos respecto a la ubicación de los puentes de disulfuro, diferenciándose en GIPLA2 y GIIPLA2 (Mackessy, 2010). Las GIPLA2 presentan entre seis y ocho puentes de disulfuro y una masa molecular de entre 13 y 15 KDa, son características de los venenos de los elápidos. Las GIIPLA2 son exclusivas de los venenos de los vipéridos, presentan siete puentes de disulfuro y una extensión a nivel del C-terminal con una organización particular propia de este grupo (Xiao et al., 2017).

Las PLA₂ son enzimas altamente conservadas en los animales, desde invertebrados hasta mamíferos. Participan de varios procesos fisiológicos como la proliferación y diferenciación celular, así como también de procesos inflamatorios crónicos (Hiu & Khun, 2020). Los fosfolípidos son componentes centrales de las membranas biológicas, la acción de las PLA₂ de los venenos ofídicos interrumpe su integridad, llevando a una pérdida de la homeostasis que provoca en última instancia la muerte celular. La fisiopatología generada por las PLA₂ es diversa, existen desde toxinas presinápticas -



neurotóxicas- hasta miotóxicas, anticoagulantes y formadoras de edema, como las presentes en especies del género *Bothrops* (Mackessy, 2010).

1.4.4. L-amino oxidasas (LAAO)

Las L-amino oxidasas (LAAO, por sus siglas en inglés “L-amino acid oxidase”) catalizan la desaminación oxidativa de L-aminoácidos a cetoácidos con la consecuente liberación de peróxido de hidrógeno y amonio (Du & Clemetson, 2002). Estructuralmente, se trata de flavoenzimas homodiméricas de unión covalente a FAD (flavina-adedina, cofactor), cada subunidad posee una masa molecular de entre 50 y 70 KDa. Presenta tres dominios principales; el sitio activo (de unión al sustrato), el dominio de unión a FAD y un dominio helicoidal (Pawelek et al., 2000).

Se trata de enzimas ampliamente distribuidas en los venenos de serpiente y se encuentran relativamente conservadas, constituyen entre el 1 y el 4% del pool de toxinas de los venenos bothróticos (Larréché et al., 2021). Su acción puede desencadenar la formación de edemas, promover o inhibir la agregación plaquetaria, tener efectos anticoagulantes e incluso anti-bacteriales (Mackessy, 2010). Sin embargo, el mecanismo de acción de las LAAO no es del todo claro, las hipótesis principales sugieren que su toxicidad se debe a la acumulación de peróxido de hidrógeno, generando un importante estrés oxidativo del cual derivan los efectos observados (Hiu & Khun, 2020).

1.4.5. Otros componentes

Fuera de los componentes principales, existen otros dentro de los venenos de las especies del género *Bothrops* que han sido identificados y se encuentran en pequeña proporción dentro del pool general de toxinas. Entre ellos se encuentran desintegrinas, lectinas de tipo C y otros, aún sin identificar (Öhler et al., 2010; Rangel et al., 2022). El cuadro clínico asociado al envenenamiento bothrótico consiste en un desbalance neto del sistema hemostático por la acción conjunta de -principalmente- los componentes descritos anteriormente. Por esta razón, se hizo especial énfasis en éstos a nivel de los ensayos desarrollados en el presente proyecto.



2. Objetivos

2.1. Objetivo general

Realizar un análisis comparativo de la actividad de los componentes de las toxinas presentes en los venenos de *Bothrops alternatus* (Crucera) y *Bothrops pubescens* (Yarará) e identificar diferencias entre las especies que puedan repercutir sobre el cuadro clínico del envenenamiento.

2.1.2. Objetivos específicos

- Poner a punto los ensayos bioquímicos que permitan evaluar la existencia de diferencias a nivel de la composición y actividad de los venenos entre ambas especies del género *Bothrops* presentes en Uruguay: *B. alternatus* y *B. pubescens*.
- Evaluar y comparar la actividad de ambos venenos en términos de fosfolipasas A₂ utilizando ensayos de hemólisis indirecta y metaloproteasas mediante ensayos de actividad gelatinasa y zimograma de gelatina.
- Evaluar y comparar la actividad de tipo trombina y L-amino oxidasa de los venenos de ambas especies de ofidios mediante la realización de ensayos específicos para este tipo de componentes.
- Detectar diferencias respecto a la composición proteica de ambos venenos mediante electroforesis de proteínas.
- Profundizar en la caracterización de los venenos de ambas especies y dilucidar componentes que permitan diferenciar entre ellas, con el fin de optimizar el tratamiento en el caso de accidentes ofídicos.



3. Materiales y métodos

3.1. Venenos

Las muestras de veneno utilizadas de las especies *Bothrops alternatus* y *Bothrops pubescens* se obtuvieron de ejemplares pertenecientes al Serpentario del Instituto de Higiene (Facultad de Medicina-Facultad de Ciencias, UdelaR). Las mismas se encontraban almacenadas en el Laboratorio de Desarrollo Biotecnológico. Se partió de dos muestras liofilizadas con una masa inicial de 8 mg (*B. alternatus*) y 13.5 mg (*B. pubescens*) llevándolas a una concentración de [10 mg/ml] con buffer PBS (Phosphate saline buffer). Esta fue la totalidad de muestras empleadas durante la realización de todos los ensayos y las diluciones realizadas durante el transcurso de los mismos partieron de ambas. Con el fin de corroborar la correcta dilución de las muestras, ya que los ensayos se basan en la comparación entre las *B. alternatus* y *B. pubescens*, se midió la absorbancia a 280 nanómetros utilizando un espectrofotómetro de microvolúmenes (Nanodrop) obteniendo así una medida precisa de la concentración de proteína.

3.2. Suero antiofídico

Se utilizó suero antiofídico (saof) de tipo polivalente y heterólogo (anticuerpos de origen equino) de dos procedencias. Elaborado en Uruguay (Instituto de Higiene, Facultad de Medicina, UdelaR) y procedente de Argentina (Instituto Biológico Argentino, Laboratorio BIOL). Este último es el saof que se emplea actualmente para el tratamiento en los casos de accidentes ofídicos en nuestro país.

El saof producido por el Instituto de Higiene tiene en su pool a las especies *B. alternatus* y *B. pubescens*, 10 ml neutralizan 15 mg de *B. pubescens* y 25 mg de *B. alternatus* (Pino, 2012). En el caso del saof de BIOL Argentina, su pool contiene a las especies *Crotalus durissus terrificus*, *Bothrops alternatus* y *Bothrops diporus*, 10 ml neutralizan 4 mg de *C. durissus terrificus*, 12,5 mg de *B. alternatus* y 12,5 mg de *B. diporus* (Instituto Biológico Argentino S.A.I.C., 2006).

3.3. Sangre ovina

Se utilizó sangre ovina (Biokey, Uruguay), de la cual se extrajo plasma sanguíneo para la realización de los ensayos de actividad trombina-like y glóbulos rojos lavados empleados para los ensayos de hemólisis indirecta. La extracción de plasma se realizó partiendo de un volumen inicial de 1000 μ L y realizando dos centrifugaciones contiguas de 2 minutos cada una, a 2500 rpm y una temperatura de 23 °C. Pasado este procedimiento, los glóbulos rojos, blancos y plaquetas precipitaron, generando fases discretas y pudo extraerse el plasma sanguíneo.



3.4. Ensayos

3.4.1. SDS-Page

Se llevó a cabo una electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) de acuerdo con el método de Laemmli (Laemmli, 1970). Se cargaron muestras de veneno no reducidas de *B. alternatus* y *B. pubescens* en concentraciones de [10 mg/ml] (5 μ l y 10 μ l) y de [1 mg/ml] (10 μ l) con un volumen final de 15 μ l. Se empleó el marcador de peso molecular "Precision Plus Protein Dual Color Standards" (BIO-RAD, #1610374). Se realizó un gel de acrilamida al 12,5% y se corrieron en una unidad de electroforesis en gel vertical SE 260 mini (Amersham Bioscience) a 25 mA durante 90 minutos. Para revelar se tiñó con azul brillante de Coomassie (Sigma-Aldrich), sumergiendo el gel hasta el día siguiente. Finalmente, se lavó el gel y se tomaron fotografías utilizando un transiluminador (G:Box, Syngene). Se llevó a cabo una densitometría sobre las bandas obtenidas y estimación de los pesos moleculares utilizando el software de uso libre GelAnalyzer (versión 23.1). Para estimar los pesos moleculares de las bandas observadas se realizó una curva de calibración con el marcador de peso molecular. Fueron seleccionados los carriles 2 y 5, correspondientes a venenos de concentración [10 mg/ml] con un volumen sembrado de 5 μ L para presentar los datos de densitometría debido a que son los que presentaron una mejor resolución de las bandas.

3.4.2. Ensayo de actividad gelatinasa

Se incubó por 24 horas a 37°C solución de gelatina al 2% (2 g en 10 mL, marca comercial) y agua destilada en volúmenes de 150, 200 y 300 μ L, adicionando 5 μ L de veneno de *B. alternatus* y *B. pubescens* con una concentración de [10 mg/ml] y 150 μ L de Buffer PBS adicionado con calcio (CaCl_2 [10 mM]). Tras la incubación se adicionaron a cada tubo 200 μ L de TCA (ácido tricloroacético, Sigma-Aldrich) al 50% para precipitar las proteínas no digeridas por el veneno y se realizó una centrifugación a 2500 rpm por 2 minutos. Para cuantificar los péptidos digeridos por el veneno, se incubaron 25 μ L de sobrenadante con una solución de BCA (BCA Protein Assay Kit, Sigma-Aldrich) a 37°C por 30 minutos (Fig. 13). Transcurrido este intervalo se midió la absorbancia de las muestras a 562 nm -espectro de absorción del complejo BCA-Cu^{2+} .

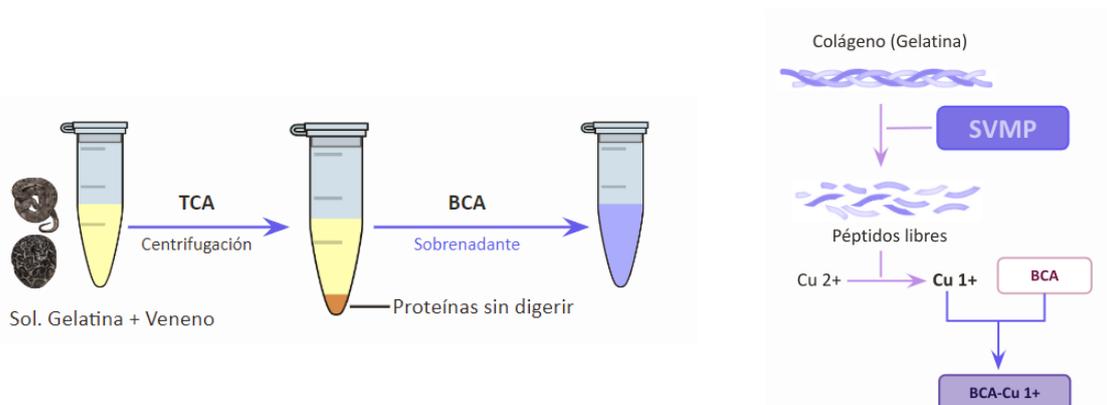


Figura 13. Esquemización del ensayo de actividad gelatinasa. *Bothrops pubescens* (ilustración superior), *Bothrops alternatus* (ilustración inferior). Se detecta la formación del complejo BCA-Cu^{1+} el cual genera una coloración violeta cuantificada al medir la absorbancia a 562 nm. SVMP: metaloproteasas de los venenos.



3.4.3. Zimograma

Se adicionó al SDS-Page en gel de acrilamida (10%) gelatina en una concentración final de [2 mg/ml]. Se cargaron muestras de veneno de *B. alternatus* y *B. pubescens* (35 µg) con buffer de carga y se realizó una corrida electroforética (20 mA). El gel se lavó cada 30 minutos con una solución conteniendo Triton X-100 al 2%. Luego se incubó a 37 °C overnight en Buffer PBS.

Finalmente, para revelar se usó la tinción con azul brillante de Coomassie (Sigma). Se identificó la actividad proteolítica en las zonas sin teñir sobre el fondo azul. Se evaluaron las diferencias entre el perfil de acción de las metaloproteasas entre ambas especies de forma cualitativa (Fig. 14).

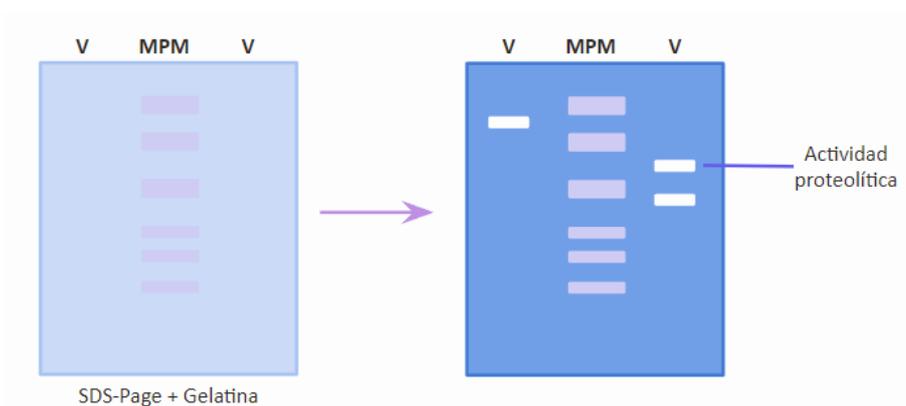


Figura 14. Esquemización de la realización del zimograma. MPM: Marcador de peso molecular; V: Veneno.

3.4.4. Ensayo de actividad de tipo trombina

Se cargaron en una microplaca 5 µL de veneno de *B. alternatus* y *B. pubescens* ([0.5-1-10 µg/ml]) adicionando 15 µL de Chromozym TH (Sigma-Aldrich) en Buffer PBS, llevando a un volumen final de 150 µL y se midió la absorbancia a 405 nm utilizando un lector de placa (MRXII, Dynex) en intervalos regulares, cada 10 minutos. Chromozym TH es un sustrato preferencial de trombina, por lo tanto, se adaptó el protocolo del fabricante para la puesta a punto en su uso con las muestras de veneno. Todas las muestras se cargaron por duplicado y se promediaron para la realización de los gráficos de actividad correspondiente. A su vez, en todos los casos se corrigió con la condición de blanco.

Sobre la base detallada anteriormente, se realizaron distintas aproximaciones experimentales, variando parámetros y buscando contestar distintas preguntas (Fig. 15):

- 1. Ensayo de neutralización.** Adición de de suero antiofídico (10 µL, BIOL Argentina) con el fin de testear la neutralización de este tipo de actividad. Previo a cargar las muestras, 20 µL de veneno de *B. alternatus* y *B. pubescens* ([0.5 mg/ml]) se pre-incubaron con 20 µL de suero antiofídico (BIOL Argentina) para cargar duplicados en la microplaca con una proporción de 10 µL veneno - 10 µL saof. La incubación se realizó a 37 °C por 25 minutos. Adicionalmente se realizaron ensayos sin la etapa de preincubación.
- 2. Actividad en presencia de plasma normal de oveja.** Adición de plasma sanguíneo (10 µL) para visualizar su efecto sobre la actividad de este tipo de componentes.



3. **Efecto de la temperatura.** Variación de la temperatura de ensayo; 23 °C, 37 °C y 4 °C.
4. **Uso de inhibidores.** Se utilizó EDTA (Ácido etilendiaminotetraacético) y PMSF (Fluoruro de fenilmetilsulfonilo), inhibidores de metaloproteasas y serinoproteasas, respectivamente. Se adicionaron 10 µL de EDTA [100 mM] en Buffer PBS, utilizando una concentración de veneno de [0.5 mg/ml] para ambas especies y 2-5 µL de PMSF [200 mM] con una concentración de veneno de [1 mg/ml]. En ambos casos el volumen de veneno utilizado fue de 5 µL. Se realizaron ensayos de inhibición para cada uno de los inhibidores por separado y utilizando ambos en simultáneo.

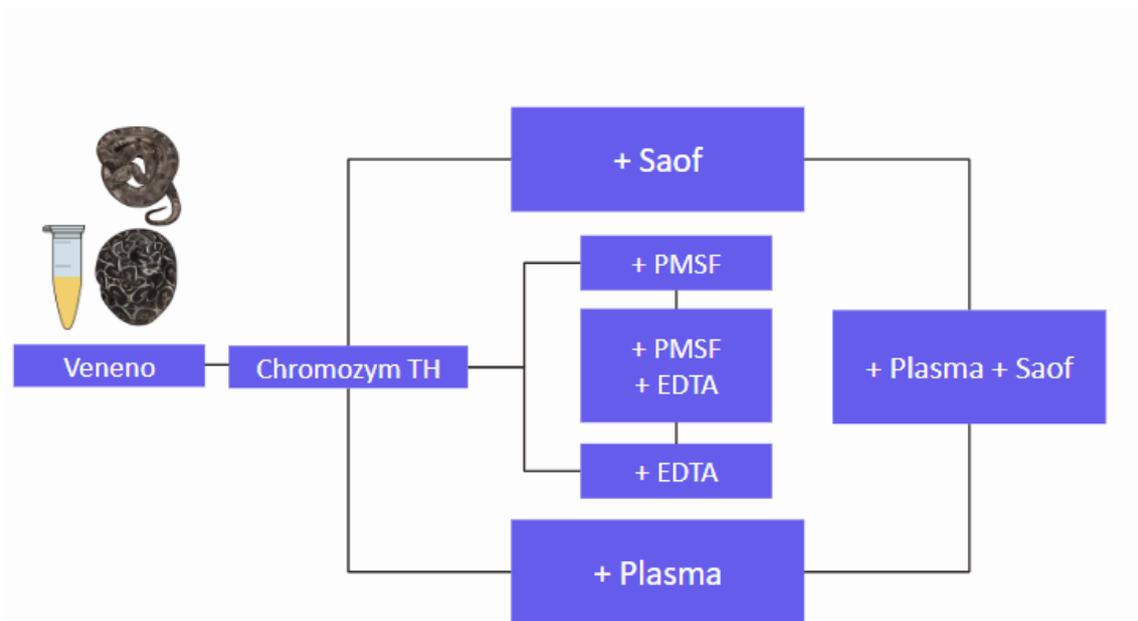


Figura 15. Esquematación de los ensayos de actividad de tipo trombina. Se partió de muestras de veneno de *Bothrops pubescens* (ilustración superior) y *B. alternatus* (ilustración inferior). Saof: Suero antiofídico; Chromozym TH: sustrato de trombina; Plasma: Plasma sanguíneo ovino, PMSF/EDTA: inhibidores de serinoproteasas y metaloproteasas, respectivamente.

3.4.5. Ensayo de hemólisis indirecta

Protocolo modificado de (Martins et al., 2009), se partió de una muestra de sangre ovina (2 mL) que se centrifugó para separar plasma de glóbulos, posteriormente se lavaron con PBS dos veces y resuspendieron.

Se incubaron 200 µL de glóbulos rojos en suspensión con 10 µL de veneno de *B. alternatus* y *B. pubescens* con una concentración de [1 mg/ml] y 10 µL de Lecitina [0.4 mg/mL] (Sigma-Aldrich, Fig. 16). Finalmente se llevó a un volumen final de 0.5 mL con Buffer PBS y se incubó durante media hora a 37 °C. Luego se centrifugaron los tubos y se midió la absorbancia a 420 nm del sobrenadante a la media hora y a las tres horas. De esta manera se cuantifica la hemoglobina liberada en respuesta a la lisis de los eritrocitos por acción de los venenos. Como control negativo se emplearon 200 µL de glóbulos rojos resuspendidos en PBS, los valores de absorbancia para ambas



especies se tomaron por duplicado y se graficó el promedio corregido con los valores del blanco.

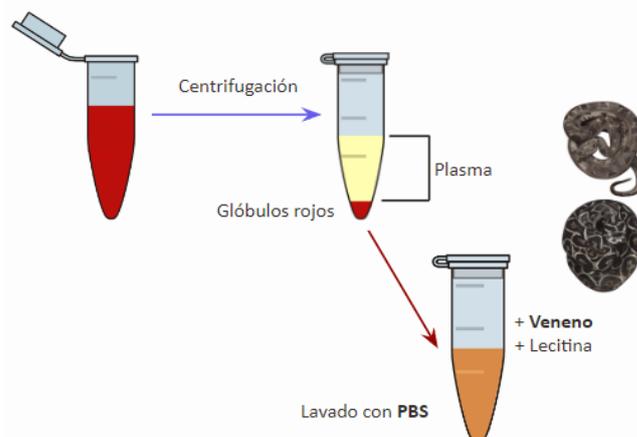


Figura 16. Esquematación de las etapas iniciales del ensayo de hemólisis indirecta partiendo de sangre ovina. Se utilizó veneno de las especies *Bothrops alternatus* (ilustración inferior) y *B. pubescens* (ilustración superior). Se detectan cambios en la absorbancia en respuesta a la lisis de los glóbulos rojos por acción de las fosfolipasas de los venenos sobre la lecitina.

3.4.6. Ensayo de actividad L-amino oxidasa

Se preparó la solución reactiva disolviendo una tableta de OPD (O-fenilendiamina, Sigma-Aldrich) en 10 mL de Buffer PBS 1X [1,5 M] agregando 15 μ L de L-Leucina [5 mM] y 15 μ L de peroxidasa (0.8 U/mL, Sigma) (Kishimoto & Takashi, 2001).

Se mezcló 90 μ L de solución reactiva con 10 μ L de cada veneno (*Bothrops alternatus* y *B. pubescens*) en concentraciones de [1-10 mg/ml]. Finalmente, se incubó por 60 minutos a 37 $^{\circ}$ C y se midió la absorbancia a 492 nm -espectro de absorción del OPD- a los 25 minutos de iniciada la reacción y posteriormente en intervalos regulares, cada 10 minutos. Se trata de un método de determinación de actividad indirecta, basándose en reacciones acopladas (Fig. 17). Se tomaron todos los valores por duplicado, para ambas especies, se corrigió con la condición blanco y se graficaron curvas de actividad para ambas especies.

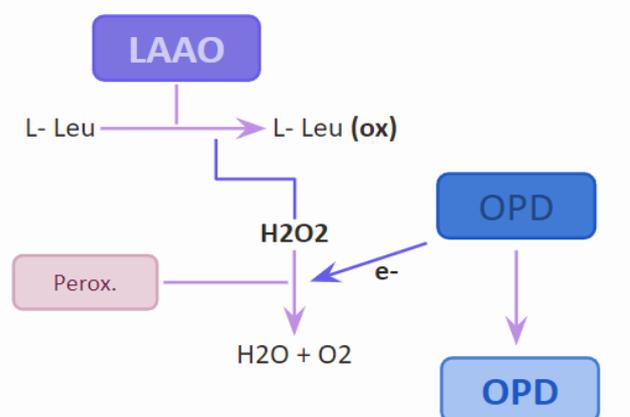


Figura 17. Esquematación de las reacciones acopladas que permiten medir la actividad L-amino oxidasa. Se detecta el cambio de coloración del OPD, midiendo la absorbancia a 492 nm. LAAO: L-amino oxidasa; Perox: Peroxidasa; L-Leu: L-Leucina; OPD: O-fenilendiamina.



3.5. Análisis de datos

Para realizar el procesamiento estadístico de los datos se utilizó el software de uso libre RStudio (versión 4.3.1, 2023.09.1). Se realizó el test de normalidad de Shapiro-Wilk sobre los resultados obtenidos lo cual permitió constatar la distribución normal y aplicar estadística paramétrica. Enfocado en la comparación entre los componentes de los venenos de *B. alternatus* y *B. pubescens* se realizaron análisis de varianza (ANOVA) para determinar la existencia de diferencias significativas entre las especies en relación a la actividad L-amino oxidasa y actividad trombina-like. En cuanto a la actividad gelatinasa y la actividad fosfolipasa A₂ (actividad hemolítica indirecta) se utilizó el test t de Student.



4. Resultados

4.1. Composición de los venenos

4.1.2. SDS-Page

Se presenta a continuación la electroforesis SDS-Page realizada con el fin de comparar los perfiles de bandas de los venenos de *Bothrops alternatus* y *B. pubescens* (Fig. 18).

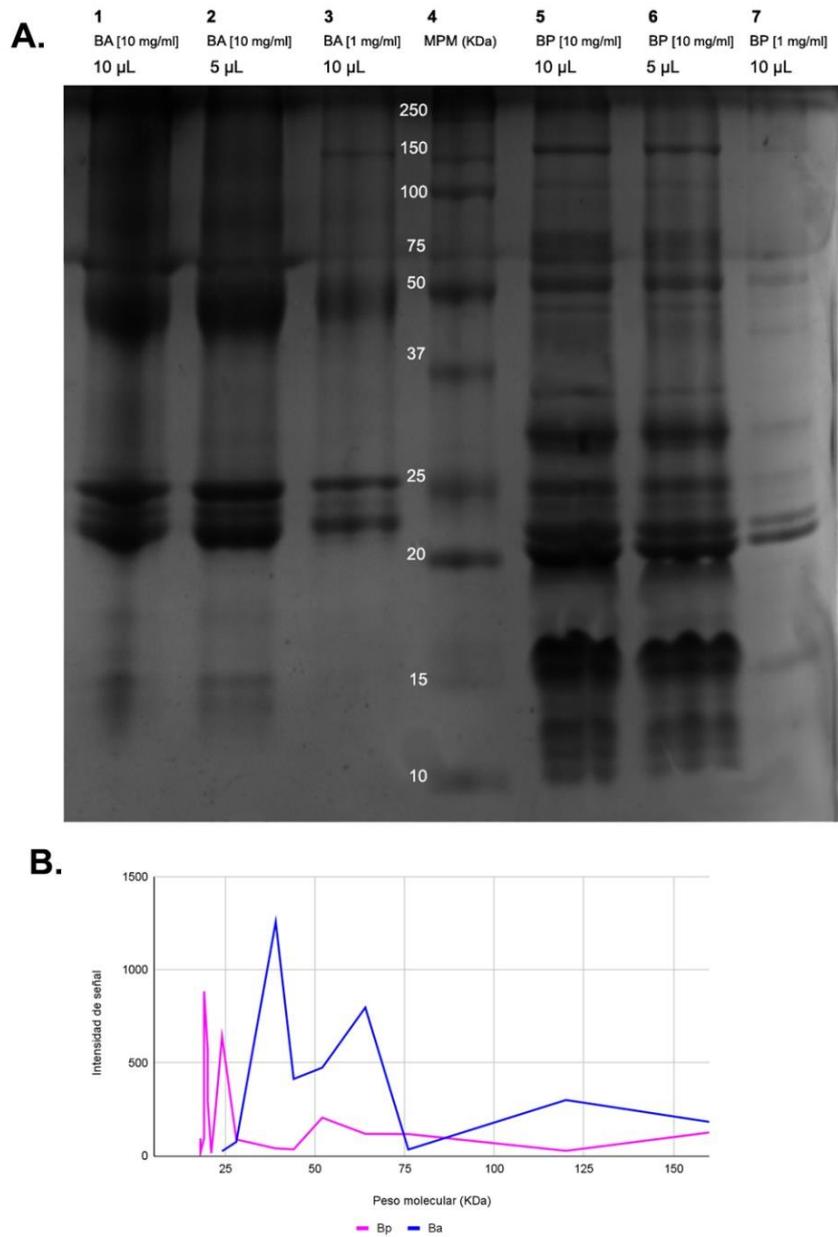


Figura 18. A. Electroforesis SDS-Page (acrilamida al 12,5%) con los perfiles de corrida de ambos venenos. BA: *Bothrops alternatus* (carriles 1-3); BP: *Bothrops pubescens* (carriles 5-7); MPM:



Marcador de peso molecular (KDa). **B.** Densitometría de los carriles 2 y 5. Ba: *Bothrops alternatus*, Bp: *Bothrops pubescens*.

Se observan diferencias entre los perfiles de ambos venenos, *B. pubescens* presenta una mayor cantidad de bandas que *B. alternatus* con diecisiete bandas frente a nueve, respectivamente. Las bandas de mayor concentración se encuentran en el caso de *B. alternatus* entre 20 y 25 y entre 50 y 100 KDa mientras que para *B. pubescens* se ubican por debajo de los 37 KDa. *B. pubescens* presenta bandas de bajo peso molecular (entre 10 y 15 KDa) que se encuentran ausentes en *B. alternatus*.

Así mismo, por debajo de los 37 KDa y encima de los 25 KDa se observa otra banda que se encuentra presente en *B. pubescens*, pero no en *B. alternatus* en la muestra de concentración [1 mg/ml] pero aparecen de forma muy tenue a concentraciones de [10 mg/ml]. Por otro lado, en el caso de las bandas que son compartidas entre ambas especies, difieren en su concentración, lo que se corresponde con una distinta proporción de estos componentes dentro del pool total de toxinas de los venenos. Para inferir la posible identidad de los componentes correspondientes a cada banda, se realizó una revisión bibliográfica sobre las enzimas caracterizadas dentro del género *Bothrops*, haciendo énfasis en trabajos realizados sobre las especies de interés: *B. alternatus* y *B. pubescens* (Tabla 1).

Toxina	Peso molecular (KDa)	Referencia
PLA ₂	18-23	(Geoghegan et al., 1999; Ponce-Soto et al., 2007*; Queiroz et al., 2008)
	14-15	(Öhler et al., 2010)*
	~16 _n	(Cardoso et al., 2010)*
SVSP	26-67	(Öhler et al., 2010*; Serrano et al., 2013)
LAAO	66-69; 140	(Mackessy, 2010)
	50-57	(Öhler et al., 2010)*
	114	(Rangel et al., 2022)**
SVMP		
PI	23-26	(Öhler et al., 2010)*
PII	30-60	(Markland & Swenson, 2013)
PIII	47-55	(Gay et al., 2005)*
	55-60; 70-100	(Öhler et al., 2010)*
ETT	35-38	(Mackessy, 2010)
DS	12-13	(Öhler et al., 2010)*

Tabla 1. Revisión de los pesos moleculares (KDa) de los diferentes componentes de los venenos bothrópicos. Se indican en negrita aquellas enzimas cuyo peso molecular corresponde a un estado dimérico. PLA₂: Fosfolipasas A₂, SVSP: Serinoproteasas, LAAO: L-amino oxidasas, SVMP: Metaloproteasas; PI, PII, PIII: Clases de metaloproteasas, ETT: Enzimas de tipo trombina, IT: Inhibidores de trombina, DS: Desintegrinas, *: La caracterización se realizó en la especie *Bothrops alternatus*; **: La caracterización se realizó en la especie *Bothrops pubescens*, n: Indica que la enzima presenta actividad neurotóxica.



4.2. SVMP

4.2.1. Ensayo de actividad gelatinasa

En ambas especies se observó actividad gelatinasa y la misma fue comparable, no encontrándose diferencias significativas entre *B. alternatus* y *B. pubescens* (t test, $t=0.2305$, $p>0.05$; Figura 19). Valores de distribución normal (SW, $W=0.8716$, $p>0.05$).

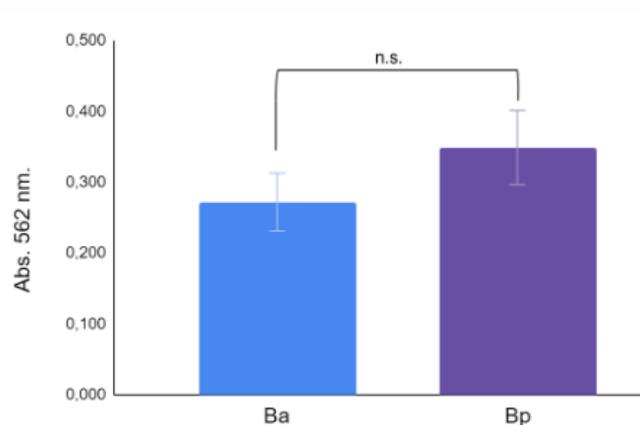


Figura 19. Ensayo de actividad gelatinasa. Media de actividad de los venenos para ambas especies. Ba: *Bothrops alternatus*, Bp: *Bothrops pubescens*. Se presenta la desviación estándar. n.s: las diferencias observadas no son significativas, $p>0.05$, test t de Student.

4.2.2. Zimograma

Se presenta el zimograma de gelatina realizado para los venenos de *B. alternatus* y *B. pubescens* (Figura 20). Se encontraron diferencias respecto a los perfiles de bandas de digestión de ambos venenos, *B. alternatus* presentó dos bandas mientras que en *B. pubescens* se observó una banda extra. Esta tercera banda presente en *B. pubescens* es la de menor peso molecular y se encuentra ubicada entre 20 y 25 KDa. Respecto al resto de las bandas de digestión observadas, en el caso de *B. pubescens* se encuentran entre 37 y 75 KDa mientras que en *B. alternatus* se ubican entre 50 y 75 KDa. Al contrastar con la electroforesis SDS-Page permite identificar los componentes ubicados en los pesos moleculares donde se encuentran las bandas de digestión como metaloproteasas.

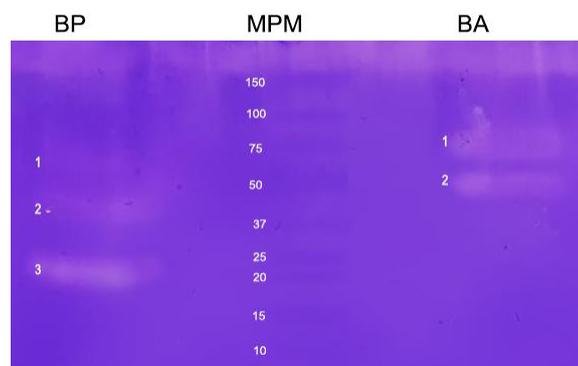


Figura 20. Zimograma de gelatina. Se presentan los perfiles de bandas para los venenos de



ambas especies. Se enumeran las bandas de digestión. BP: *Bothrops pubescens*, BA: *Bothrops alternatus*, MPM: Marcador de peso molecular (KDa).

4.3. SVSP

4.3.1. Ensayo de actividad de tipo trombina

Se obtuvo actividad de tipo trombina-like para los venenos de ambas especies. No se observaron diferencias significativas entre *Bothrops alternatus* y *B. pubescens* en ninguna de las concentraciones utilizadas, únicamente se vio modificada la velocidad a la cual la reacción se saturaba alcanzando una asíntota, siendo más rápida a mayores concentraciones: [0.5-10 mg/ml]. Se muestra la curva correspondiente a [10 mg/ml] ($F = 60.8$, $p > 0.05$, Figura 21.1). Valores de distribución normal (SW, $W = 0.9421$, $p > 0.05$).

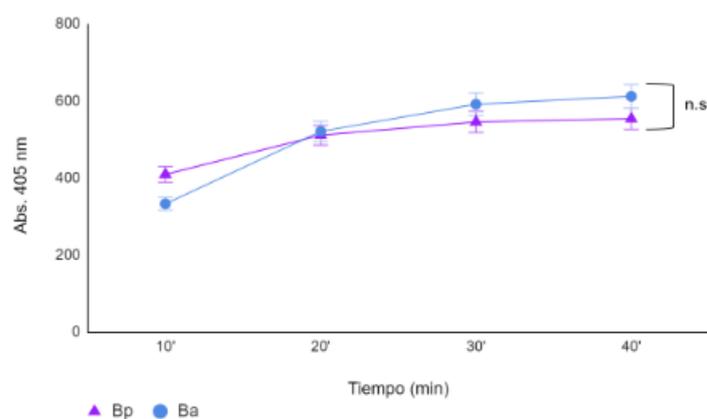


Figura 21.1. Media de actividad de tipo trombina para los venenos de *Bothrops alternatus* y *B. pubescens* a una concentración de [10 mg/ml]. Se presenta la desviación estándar. Ba: *Bothrops alternatus*, Bp: *Bothrops pubescens*. n.s: la diferencia observada no es significativa, $p > 0.05$, ANOVA.

Se realizó el ensayo a 37 °C y a 4° (resultados no presentados), no se observaron diferencias entre las especies para ninguna de las dos condiciones. A 37 °C la actividad aumenta más deprisa, a 4 °C no difiere con la actividad obtenida al realizar el ensayo a temperatura ambiente.

Al adicionar plasma sanguíneo al ensayo se obtuvo un incremento significativo de la actividad de tipo trombina para ambas especies ($F = 13.21$, $p < 0.05$; Figura 21.2). Se infiere que dicho incremento podría atribuirse a la activación de otros componentes del veneno, como las enzimas activadoras de trombina a nivel del plasma. Valores de distribución normal (SW, $W = 0.8437$, $p > 0.05$).

En cuanto a la neutralización de este tipo de componentes por parte del suero antiofídico, se observó un decremento significativo de la actividad tanto para *B. alternatus* como para *B. pubescens*, indicando que el ensayo reviste de utilidad para reflejar la capacidad neutralizante por parte del suero antiofídico, demostrando ser capaz de inhibir la actividad de tipo trombina en ambas especies. Se testeó el ensayo con ambos sueros antiofídicos, obteniendo el mismo efecto. Por esta razón se continuó empleando únicamente el suero antiofídico BIOL. El suero es capaz de neutralizar la actividad de tipo trombina en los venenos de ambas especies. Al adicionar plasma al ensayo además del suero antiofídico se sigue conservando la capacidad neutralizante



del suero ($F = 14.21$, $p < 0.05$; Figura 21.3). Valores de distribución normal (SW, $W = 0.9331$, $p > 0.05$).

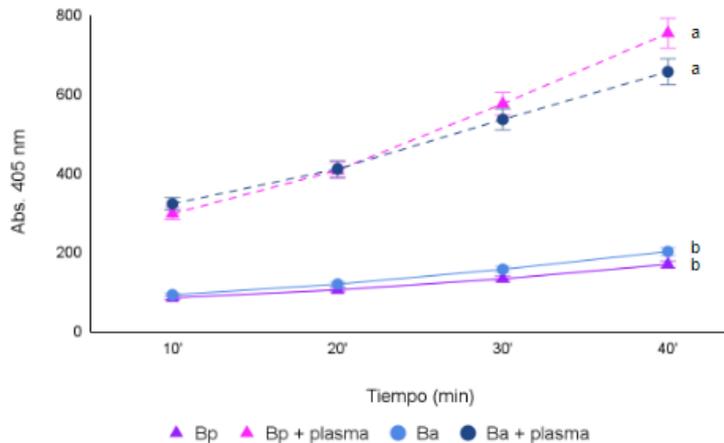


Figura 21.2. Media de actividad de tipo trombina de los venenos de *Bothrops alternatus* y *B. pubescens* de concentración [0.5 mg/ml] (5 μ L) en presencia de plasma sanguíneo ovino (10 μ L). Se presenta la desviación estándar. Ba: *Bothrops alternatus*, Bp: *Bothrops pubescens*, plasma: plasma normal de oveja. b: $p < 0.05$, respecto a la adición de plasma para ambas especies, ANOVA.

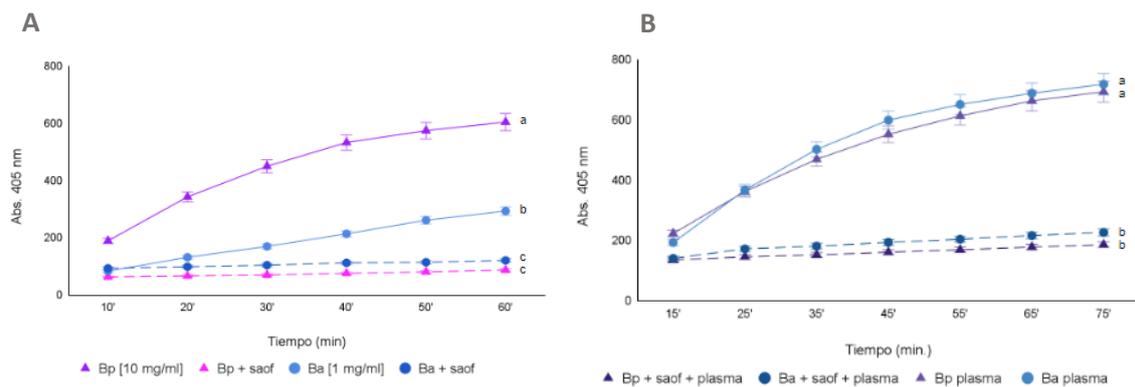


Figura 21.3. Media de actividad de tipo trombina de los venenos de *Bothrops alternatus* y *B. pubescens* en presencia de suero antiofídico: 10 μ L de veneno - 10 μ L de suero. **A.** venenos preincubados con suero antiofídico, *B. pubescens* [1 mg/ml] y *B. alternatus* [0.5 mg/ml]; **B.** venenos de concentración [0.5 mg/ml] preincubados con suero antiofídico y plasma. Ba: *Bothrops alternatus*, Bp: *Bothrops pubescens*, saof: suero antiofídico, plasma: plasma sanguíneo ovino. Se presenta la desviación estándar. b,c: $p < 0.05$, respecto a la adición de suero antiofídico para ambas especies, ANOVA.

Al adicionar inhibidores se observaron diferencias en cuanto a la respuesta de la curva de actividad entre *B. alternatus* y *B. pubescens*. La adición de EDTA (ácido etilendiaminotetraacético) en ambas especies se observa un decremento significativo de la actividad, sin llegar a inhibirse completamente ($F = 26.35$, $p < 0.05$; Figura 21.4). Valores de distribución normal (SW, $W = 0.8442$, $p > 0.05$).

En cuanto a la adición de PMSF (fluoruro de fenilmetilsulfonilo), inhibidor de serinoproteasas se obtuvo un decremento de actividad en el caso de *B. pubescens* ($F = 14.52$, $p < 0.05$) y una caída total de la actividad en el caso de *B. alternatus* ($F = 14.21$, $p < 0.05$; Figura 21.5). Valores de distribución normal (SW, $W = 0.81333$, $p > 0.05$).



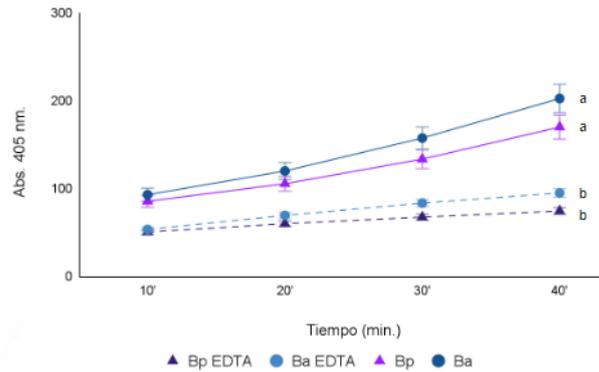


Figura 21.4. Media de actividad de tipo trombina de los venenos de *Bothrops alternatus* y *B. pubescens* de concentración [0.5 mg/ml] en presencia de EDTA, inhibidor de metaloproteasas. Ba: *Bothrops alternatus*, Bp: *Bothrops pubescens*. Se presenta la desviación estándar. b: $p < 0.05$ respecto a la adición de EDTA, ANOVA.

Para ambos volúmenes utilizados de PMSF (2-5 μ L) se obtuvo una abrupta caída en la actividad de *B. alternatus*, mientras que en *B. pubescens* ambas concentraciones causaron una inhibición parcial, que fue más marcada a mayor concentración del inhibidor.

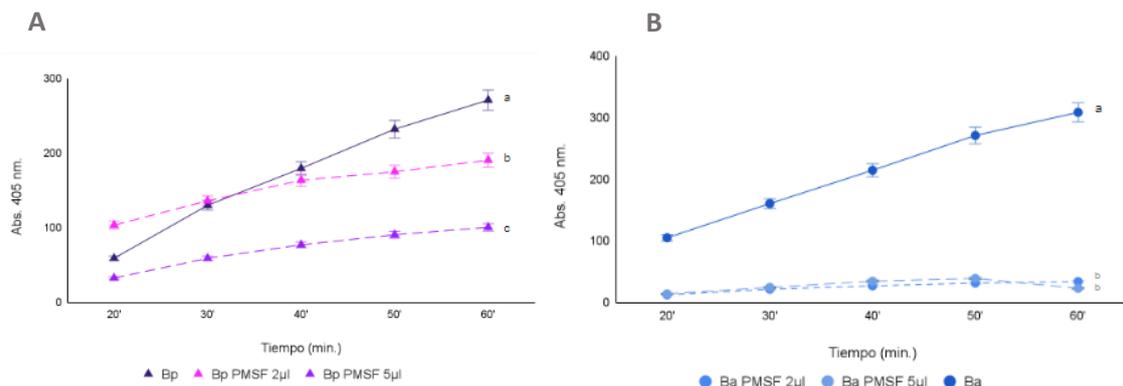


Figura 21.5. Media de actividad de tipo trombina de los venenos de *Bothrops pubescens* (A) y *B. alternatus* (B) en presencia de PMSF, inhibidor de serinoproteasas. Se presenta la desviación estándar. Ba: *Bothrops alternatus*, Bp: *Bothrops pubescens*. b,c: $p < 0.05$ respecto al uso de PMSF. ANOVA.

4.4. PLA₂

4.4.1. Ensayo de hemólisis indirecta

Tanto *B. alternatus* como *B. pubescens* presentaron actividad hemolítica indirecta, indicando la presencia de fosfolipasas A₂ como componente activo de ambos venenos.

Si bien ambas especies se observó a la media hora de comenzado el ensayo una actividad comparable, a los 180 minutos de reacción la actividad de *B. pubescens* se incrementó el doble respecto a *B. alternatus* ($t = 0.8727$, $p < 0.05$; Figura 22). Se realizaron ensayos de hemólisis directa, sin adicionar lecitina, pero ninguna de las especies presentó actividad de este tipo. Valores de distribución normal (SW, W = 0.9215, $p > 0.05$).



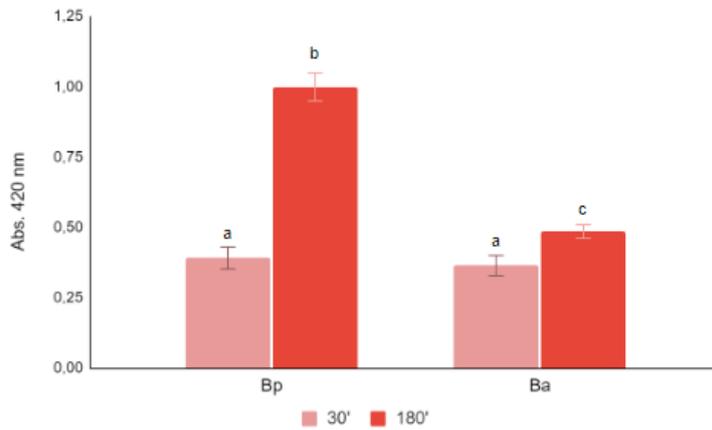


Figura 22. Ensayo de hemólisis indirecta Media de actividad de fosfolipasas A₂ a los 30 y 180 minutos de comenzar el ensayo. Bp: *Bothrops pubescens*; Ba: *Bothrops alternatus*. Se presenta la desviación estándar. b,c: $p < 0.05$ de la actividad de *B. pubescens* respecto a *B. alternatus*, test t de Student.

4.5. LAO

4.5.1. Ensayo de actividad L-amino oxidasa

Tanto *B. alternatus* como *B. pubescens* presentaron actividad de tipo L-amino oxidasa, siendo comparable. No se encontraron diferencias significativas entre las especies ($F = 18.02$, $p > 0.05$; Figura 23). Valores de distribución normal (SW, $W = 0.9903$, $p > 0.05$).

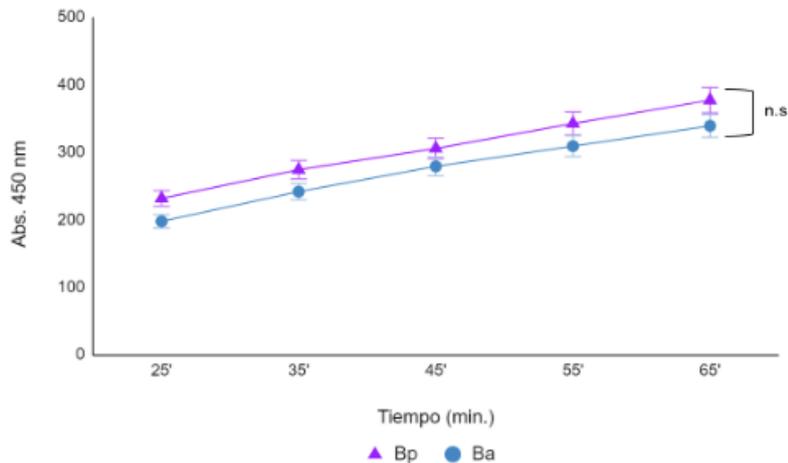


Figura 23. Media de actividad L-amino oxidasa para los venenos de *Bothrops alternatus* y *B. pubescens*. Bp: *Bothrops pubescens*, Ba: *Bothrops alternatus*. Se presenta la desviación estándar. n.s: las diferencias observadas no son significativas, $p > 0.05$, ANOVA.



5. Discusión

Bothrops alternatus y *Bothrops pubescens* son las dos especies de ofidios de importancia médica que causan accidentes ofídicos en Uruguay. El promedio anual es de 60 casos, no registrándose una muerte por esta causa desde 1986 (MSP, 2023). El tratamiento, se aplica de forma indistinta al ocasionarse el accidente por una u otra especie ya que es capaz de neutralizar ambos venenos. Muchas veces sin conocer cuál fue la causante del accidente, debido a su similitud morfológica y superposición de distribuciones. Sin embargo, los perfiles de bandas observados de los venenos de *B. alternatus* y *B. pubescens* sugieren que a nivel de composición general presentan diferencias en cuanto a sus componentes tóxicos. Respecto a muchas de las toxinas halladas mediante métodos de transcriptómica y proteómica, se desconoce hasta hoy en día su función y acción a nivel del veneno. Conocer la funcionalidad e identidad de estos componentes resulta central para comprender la acción sintomatológica consecuencia del envenenamiento ocasionado por estas especies.

En cuanto al análisis comparativo de composición mediante electroforesis SDS-Page (Fig. 18), se identificaron para *B. alternatus* nueve bandas, número similar al encontrado mediante un abordaje proteómico en esta especie, donde se identificaron diez tipos diferentes de familias de toxinas (Öhler et al., 2010). En cuanto a *B. pubescens*, se identificaron diecisiete bandas, número mayor al encontrado en abordajes proteómicos para esta especie, donde se habían identificado previamente catorce familias distintas de toxinas (Rangel et al., 2022) y casi el doble de la diversidad de las toxinas obtenidas para *B. alternatus*. En ambos casos, tanto como para realizar estudios de proteómica como electroforesis, se parte de una muestra de veneno que refleja un momento puntual y particular del animal, fenómeno que podría explicar las diferencias observadas respecto al número neto de toxinas. Está descrito, que la composición del veneno es sensible y varía en función de la ontogenia, sexo, región geográfica, dieta e incluso estacionalidad (Queiroz et al., 2008; Freitas-deSousa et al., 2020; Machado-Braga et al., 2020).

Esto se refleja en un trabajo realizado por Morais y colaboradores (2006) donde se detectaron diferencias interespecíficas en el veneno de *B. pubescens*, incluyendo una banda de 40 KDa que se encontraba únicamente en algunos ejemplares, sin correlacionarse con una variable clara. Por lo tanto, resulta relevante destacar el rol informativo de los venenos sobre la biología de las especies; este tipo de abordajes, conociendo el origen y condición de los animales de los que se extrae el veneno podrían arrojar luz sobre la modulación de la presencia, ausencia o proporción de toxinas. En el caso del presente proyecto, se trabajó con veneno de ejemplares que pertenecieron al Serpentario del Instituto de Higiene (Facultad de Medicina, UdelaR) por lo que se encontraban en condiciones controladas, tanto de temperatura y humedad como de dieta -ratones proporcionados por el bioterio del mismo edificio-. Siguiendo por esta misma línea, la mayor diversidad de toxinas halladas en el veneno de *B. pubescens* podría responder a un elemento de su historia natural como lo es la dieta. Esta especie, presenta una dieta variable durante la ontogenia y se conoce que incorporan a la misma desde artrópodos -escolopendras-, anfibios y reptiles de pequeño porte mientras son juveniles hasta mamíferos, aves, reptiles y anfibios de mediano porte en su adultez (Carreira et al., 2005). A diferencia de su congénere, *B. alternatus*, que es esencialmente especialista en mamíferos. Podría inferirse que la mayor diversidad taxonómica que abarca *B. pubescens*, haya marcado su historia evolutiva con un arsenal más variado de componentes tóxicos y que incluso en condiciones controladas, como las del serpentario, esta diversidad se mantenga.



Las bandas de mayor concentración en *B. pubescens* (Fig. 18) se corresponden principalmente con metaloproteasas y en segundo lugar fosfolipasas A₂ (Tabla 1), siendo estos los componentes predominantes del veneno de esta especie. Este resultado, se aleja de la proporción relativa de este componente hallado por Rangel y colaboradores (2022) donde las fosfolipasas representan un 11% del total del pool de toxinas. En el caso de *B. alternatus*, el componente de mayor concentración se corresponde con metaloproteasas, distinguiéndose a priori, los tres tipos de clases; PI, PII y PIII (Tabla 1). En este caso, se acerca a los datos obtenidos mediante proteómica que sugieren una representación de las metaloproteasas del 43.1% (Öhler et al., 2010) y de transcriptómica, donde se estimó que un 81.4% de los transcritos de toxinas a nivel de la glándula de veneno pertenecen a este grupo (Cardoso et al., 2010). Resulta interesante destacar que ambas especies presentan una banda en torno a los 16 KDa, muy concentrada en *B. pubescens* y apenas visible en *B. alternatus*, que se corresponde por su peso molecular con una PLA₂ que se infiere presenta actividad neurotóxica, identificada por Cardoso y colaboradores (2010) para *B. alternatus* mediante transcriptómica de la glándula de veneno. Ambas especies presentaron tanto metaloproteasas como fosfolipasas A₂, difiriendo ampliamente en sus concentraciones relativas, por lo que, se infiere que estas toxinas se encuentran en diferentes proporciones dentro del pool de enzimas de los venenos.

Estos resultados se sustentan por los obtenidos en el ensayo de hemólisis indirecta, que permitió estimar la actividad de tipo fosfolipasa A₂. A los 180 minutos, *B. pubescens* presentó casi el doble de actividad de este tipo que *B. alternatus* (Fig. 22). Esto sugiere una mayor representación de las fosfolipasas A₂ dentro del pool de toxinas de *B. pubescens*, lo cual fue observado en el gel. Pese a tener una actividad de tipo hemolítica indirecta considerablemente menor que *B. pubescens*, *B. alternatus* muestra cierta actividad, estos resultados coinciden con los obtenidos por Queiroz y colaboradores (2008) donde se detectó actividad de tipo fosfolipasa A₂ en esta especie, significativamente menor en relación a otras del género *Bothrops*. Así mismo, Ponce-Soto y colaboradores (2007), purificaron una fosfolipasa A₂ del veneno de *B. alternatus*, con un peso molecular de aproximadamente 13 KDa, se obtiene una banda en esta región, que podría tratarse de esta enzima, denominada por los autores como BaTX. En el caso de BaTX, se detalla actividad miotóxica e inductora de edemas, sin embargo, este grupo de toxinas presentan una diversidad de blancos y efectos asociados al desbalance de la homeostasis del sistema hemostático. Dentro del género *Bothrops*, se han encontrado fosfolipasas que son capaces de afectar la agregación plaquetaria, la unión neuromuscular y poseer otros efectos citotóxicos, incluso se ha descrito un posible rol antitumoral, antiparasitario y antiviral (Soares et al., 2004). Este aspecto resulta crucial dado la diversidad observada respecto a fosfolipasas A₂ presentes en el veneno de *B. pubescens*, otro tipo de ensayos que permitan evaluar el tipo de actividad fosfolipasa a un nivel más específico podrían resultar en un gran aporte del entendimiento del rol que cumplen estas enzimas durante el curso del envenenamiento.

En cuanto a las metaloproteasas, se realizaron dos ensayos que permitieron realizar una aproximación funcional. Por un lado, el zimograma de gelatina, que permitió corroborar la presencia de metaloproteasas en ambos venenos. Tanto *B. pubescens* como *B. alternatus* presentaron bandas de digestión (Fig. 20). Las tres bandas observadas en *B. pubescens* podrían corresponder a las tres clases de metaloproteasas: PI, PII y PIII. Esta observación se desprende del valor de los pesos moleculares correspondientes a las bandas observadas, por encima de los 50 KDa se aprecia una banda muy tenue (banda 1), que podría corresponderse con la clase PII o PIII. Se observa una mayor concentración a nivel de la banda 3, de menor peso molecular, que puede corresponderse con la forma más simple de las metaloproteasas, la clase PI. Contrario a lo que ocurre en el veneno de *B. alternatus* donde la banda más concentrada es la de mayor peso molecular.



Resulta relevante destacar que es interesante la falta de una tercera banda en *B. alternatus*, debido a que las metaloproteasas son las enzimas más representadas en su veneno. Esto podría deberse a que las PI y PII se encuentren en una concentración muy baja, que no haya sido detectada por el ensayo. Una aproximación al pool de metaloproteasas mediante la construcción de una librería transcriptómica de *B. alternatus* sugiere que las metaloproteasas de clase PI son las que se encuentran en menor proporción, siendo apenas un 4% del total de las metaloproteasas, así mismo las PII en un 7% y las PIII en un 89% (de-Paula et al., 2014). Por esta razón y por el valor de sus pesos moleculares -sobre los 50 KDa-, es posible que las dos bandas observadas se deban a metaloproteasas del tipo más complejo, la clase PIII. Las metaloproteasas son uno de los componentes centrales que explican los efectos sistémicos y localizados de los venenos bothrópicos, se caracterizan por generar alteraciones en la coagulación y causar hemorragias (Mackessy, 2010). Así mismo, el hecho de que *B. alternatus* presente en gran medida metaloproteasas de la clase más compleja sugiere la participación de dominios de tipo desintegrina y ricos en cisteína, que se ha descrito potencian los efectos de la actividad metaloproteasa (Tanjoni et al., 2003).

Tanto *B. alternatus* como *B. pubescens* tuvieron actividad gelatinasa comparable (Fig. 19), no se encontraron diferencias significativas. Resulta interesante destacar que siendo la actividad gelatinasa un reflejo de la actividad de las metaloproteasas de los venenos -componentes capaces de degradar el colágeno- no se detectan diferencias a este nivel, pero sí respecto a la composición. En relación a los resultados obtenidos mediante SDS-Page y el zimograma de gelatina, se infiere que se debe a componentes estructuralmente distintos, ya que en principio no tendrían los mismos tipos de metaloproteasas y las concentraciones difieren entre ambas especies. Estos resultados, sugieren que existen diferencias a nivel de la composición estructural de las metaloproteasas presentes en los venenos de *B. alternatus* y *B. pubescens*, por lo que puede inferirse que no solo difieren en su proporción relativa.

El cuadro clínico desencadenado por la mordedura de *B. alternatus* o *B. pubescens*, hasta donde se conoce actualmente, presenta una fisiopatología similar, tanto a nivel local como sistémico (Carreira et al., 2006). Esto podría sugerir una compensación por parte de las concentraciones relativas de sus componentes principales, las metaloproteasas y el aporte de la gran proporción de fosfolipasas A₂ en el caso de *B. pubescens*. En este escenario, las metaloproteasas y fosfolipasas, componentes molecularmente distintos y con diferentes mecanismos de acción, tendrían blancos y vías en común. Generando en última instancia que a un mayor nivel sea difícil de distinguir cuál fue el agente causante de la sintomatología observada. Morais (2012) encontró esta misma relación respecto a la representación de metaloproteasas y fosfolipasas, siendo los componentes más abundantes de *B. alternatus* y *B. pubescens*, respectivamente. Generalmente, los accidentes más graves suelen ocurrir durante las estaciones frías, ya que los ofidios hibernan, pero continúan produciendo toxinas en sus glándulas, generando un veneno más concentrado y, en consecuencia, más peligroso (Carreira et al., 2005). Sin embargo, debido a que no se conoce en la gran mayoría de los casos de accidentes ofídicos que ocurren en Uruguay la especie involucrada, no es posible asumir que la estacionalidad sea la única variable determinante de la gravedad. Los casos clínicos más graves podrían relacionarse con una u otra especie.

Respecto al resto de componentes, se observa en *B. pubescens* una banda apenas por encima de los 100 KDa que podrían corresponderse con L-amino oxidasas, caracterizadas en este rango para esta especie (Tabla 1). *B. alternatus* presenta una franja muy tenue por debajo de los 75 KDa que podrían llegar a corresponderse con



este grupo de toxinas, pero la resolución del gel no es del todo clara. En contraste con este punto, se encontró actividad de tipo L-amino oxidasa comparable para ambas especies, no se vieron diferencias significativas, pero se corrobora su presencia en los venenos tanto de *B. alternatus* como de *B. pubescens* (Fig. 23). Estos resultados se acercan a lo obtenido por Rangel y colaboradores (2022) que ubican a las L-amino oxidasas como uno de los componentes más representados dentro del veneno de *B. pubescens*. En cuanto a *B. alternatus*, cuya actividad no difiere de *B. pubescens*, Öhler y colaboradores (2010) sugieren que las L-amino oxidasas son componentes menores, que se encuentran en muy baja proporción. Estos resultados sugieren que, a nivel regional, esta especie podría tener una mayor representación de estas enzimas en su veneno. Estas enzimas son particularmente interesantes ya que han demostrado tener un fuerte potencial antiviral (Zhang et al., 2003) y antitumoral, debido a su efecto citotóxico preferencial por células cancerosas (Tan et al., 2018). Esto las vuelve elementos clave para el desarrollo de fármacos. Destacando una vez más el rol de los venenos como un pool de posibles agentes terapéuticos de origen biológico. Los componentes de menor peso molecular -por debajo de los 15 KDa- podrían corresponderse con desintegrinas, las cuáles se encuentran ampliamente representadas en el veneno de *B. pubescens* y están ausentes o pobremente concentradas en *B. alternatus* (Fig. 18). En cuanto a las serinoproteasas, la bibliografía las ubica entre los 26 y 67 KDa (Tabla 1), al observar este rango de pesos moleculares en el gel obtenido, se encontró un gran número de bandas para *B. pubescens* y un número menor de bandas muy tenues para *B. alternatus*, lo que sugiere una representación diferencial de este tipo de componentes entre los venenos.

La presencia de enzimas de tipo trombina se encuentra descrita para los venenos de varias especies del género *Bothrops*, con un peso molecular estimado entre los 35 y 38 KDa (Costa et al., 2009; Mackessy, 2010). *B. pubescens* presenta una banda por debajo de los 37 KDa que podría atribuirse a este tipo de componentes, en el caso de *B. alternatus*, se ven bandas muy tenues en esta región (Fig. 18). De igual forma, una enzima de tipo trombina denominada Bhalternina fue aislada del veneno de *B. alternatus* por Costa y colaboradores (2010). Estas enzimas son serinoproteasas capaces de catalizar la conversión del fibrinógeno a fibrina, promoviendo la formación de coágulos, pero al desplazar el sitio de corte respecto a la trombina endógena, la fibrina no es estabilizada por factores accesorios como el factor XIII. Esto genera un consumo del fibrinógeno, generalmente potenciado por enzimas fibrinolíticas, promoviendo un gran desequilibrio del sistema hemostático. Tradicionalmente, esta actividad se medía mediante ensayos de coagulación sanguínea, sin embargo, estos ensayos no son específicos en determinar la actividad de este tipo de componentes. Durante la realización de este trabajo se desarrolló y realizó la puesta a punto de un ensayo que permite medir la actividad tipo trombina. El primer hallazgo relevante vinculado a este ensayo es la corroboración de actividad, hay actividad de tipo trombina en ambas especies, comparable, no se encontraron diferencias significativas entre la actividad de *B. pubescens* y *B. alternatus* (Fig. 21.1). Lo detallado anteriormente, sugiere que *B. alternatus* presenta este tipo de toxinas, hallazgo que condice con lo encontrado por Öhler y colaboradores (2010) en los análisis proteómicos realizados sobre el veneno de esta especie.

Se encontró un incremento significativo de la actividad de tipo trombina con el agregado de plasma exógeno ovino (Fig. 21.2), este resultado da la pauta de que podría estar ocurriendo la activación de trombina endógena -a nivel del plasma- por enzimas activadoras de protrombina. Este tipo de enzimas se encuentra descrito para los venenos de varias especies de ofidios, incluyendo especies del género *Bothrops* (Mackessy et al., 2010). Catalizan la conversión de protrombina sanguínea en trombina, la naturaleza de estas enzimas es variable, pudiendo ser metaloproteasas o serinoproteasas. Su efecto fisiológico induce a la coagulación sanguínea, consumo



desmedido de fibrinógeno -en sinergia con la activación de factores fibrinolíticos por otras enzimas de los venenos- y en última instancia llevan al desarrollo de coagulopatías graves (Kini, 2005). Silva y colaboradores (2003) aislaron una enzima activadora de protrombina del veneno de *Bothrops erythromelas* que representó un 5% del total de toxinas del veneno y un peso molecular aproximado de 78 KDa, así mismo, su actividad fue inhibida en presencia de EDTA lo que la identifica como una metaloproteasa. Los resultados obtenidos para este ensayo, sugieren que estas enzimas se encuentran presentes también en los venenos de *B. alternatus* y *B. pubescens*.

Debido a que el ensayo de actividad de tipo trombina refleja uno de los efectos centrales en la sintomatología asociada al envenenamiento bothrópico, se decidió testear la capacidad neutralizante del suero antiofídico sobre este tipo de componentes. Se encontró una neutralización por parte del suero antiofídico tanto en *B. alternatus* como en *B. pubescens* sobre la actividad de tipo trombina, la misma situación ocurre en presencia de plasma (Fig. 21.3). Este resultado sugiere que el ensayo es robusto en la determinación de compuestos neutralizantes, pudiendo ser aplicado para el testeo de otros compuestos alternativos al suero antiofídico como inhibidores de origen natural. El suero antiofídico es el único tratamiento disponible, a escala global, sin embargo, debido a los efectos adversos -entre ellos, el shock anafiláctico- provocados por el uso de anticuerpos heterólogos, incursionar en nuevas alternativas terapéuticas con este fin resulta un campo interesante de abordar (Perumal et al., 2012; Bastos et al., 2016).

Se encontraron diferencias a nivel del uso de inhibidores, tanto en el caso de *B. alternatus* como de *B. pubescens* el uso de EDTA -agente quelante- genera un decremento parcial de la actividad (Fig. 21.4). Este resultado, sugiere la posible participación de especies iónicas u otras enzimas dependientes de iones -como lo son las metaloproteasas- en la actividad de tipo trombina, que, de alguna forma, están contribuyendo a la imagen global de la actividad. Resultados similares fueron obtenidos por Costa y colaboradores (2010), donde el EDTA causó una inhibición parcial de la actividad de tipo trombina en *B. alternatus*, en base a los resultados obtenidos podría inferirse que *B. pubescens* presenta una enzima similar, inhibida parcialmente de la misma forma.

En cuanto al uso de PMSF se vio que inhibe la actividad en *B. alternatus*, pero no en *B. pubescens*, si bien la actividad decrece al aumentar la concentración del inhibidor (Fig. 21.5). Lo observado en *B. alternatus* fue lo esperable, dado que se trata de un inhibidor específico de serinoproteasas. El mecanismo de interacción de ambos inhibidores, EDTA y PMSF, no es del todo claro y la bibliografía no profundiza en las posibles causas. La misma inhibición total por PMSF fue obtenida por Costa y colaboradores (2010) para la enzima de tipo trombina purificada de esta especie. Si bien la falta de inhibición de la actividad en *B. pubescens* podría atribuirse a una diferente proporción de este tipo de toxinas, que sea un efecto de la cantidad, esto no se refleja en la actividad. Estos resultados sugieren que, si bien ambas especies presentan actividad de tipo trombina comparable, la naturaleza de estas enzimas es distinta. Esto podría deberse a diferencias estructurales que afecten la cinética de la reacción. Estudios y abordajes de corte estructural serán necesarios para poder afirmar este punto.

Diferenciar e identificar las especies de ofidios que causan accidentes, permite entender más no solo acerca del cuadro clínico del envenenamiento, sino también de la biología de las especies. En Uruguay, de las cuatro especies de ofidios considerados de importancia, solo dos causan accidentes, entender las características propias de estos animales que los llevan a generar esta problemática, puede en gran medida ayudar a prevenirla. Conocer qué especies, cómo y cuándo causan accidentes, ayudan a comprender la epidemiología del accidente ofídico (Bolon et al., 2020). Debido a la



similitud morfológica de *B. alternatus* y *B. pubescens*, una clave para su identificación podría estar en las diferencias respecto a sus toxinas y para ello, primero hay que conocer la identidad de las mismas.

En Uruguay, la cifra de complicaciones médicas a largo plazo a causa del accidente ofídico es desconocida. Estudios abordando esta problemática estiman una prevalencia del 13.7% de complicaciones de salud derivadas del accidente ofídico que permanecen a largo plazo, entre ellas, migrañas, fotosensibilidad, parálisis facial, dolor local y debilidad muscular (Subashini et al., 2018). Conocer estas cifras a escala nacional en paralelo con entender los componentes presentes en los venenos que podrían explicar la sintomatología observada, podría contribuir a la optimización del tratamiento y dilucidación de las causas. Se destaca la importancia y necesidad del trabajo y abordaje interdisciplinar para el manejo del ofidismo. Morais (2012) realizó la primera aproximación a la composición de los venenos de *B. alternatus* y *B. pubescens* en Uruguay, gran parte de este trabajo se nutre de los resultados obtenidos y profundiza en otro tipo de ensayos.

Pese a todas las implicancias negativas y percepción social general basada en estos aspectos, las serpientes son integrantes de nuestros ecosistemas como cualquier otro organismo. Inclusive, desde un punto de vista utilitario, representan importantes efectos benéficos para las personas como lo son el depredar sobre animales vectores de enfermedades o consideradas plagas, principalmente roedores (Carreira et al., 2006). Son presa de aves, mamíferos e incluso otros ofidios. Así mismo, no se trata de animales particularmente agresivos, los accidentes son, justamente, situaciones particulares. Ocurren al interactuar directamente por error, no desde una intencionalidad violenta del animal. Los ofidios y las personas pueden coexistir de manera pacífica y el compromiso en la elaboración medidas preventivas y conocimiento acerca de este grupo son necesarios para conseguirlo (Malhotra et al., 2021). El involucramiento de investigadores y por, sobre todo, la población más expuesta a sufrir este tipo de accidentes resulta fundamental (Durso et al., 2021). Una ejemplificación de este punto es el hecho de que tanto *B. alternatus* como *B. pubescens* son especies de caza libre en Uruguay. Esta categorización no tiene sustento científico y se ampara en criterios poco claros (Carreira et al., 2006). Esto no resulta inocuo, dado que muchos accidentes se producen cuando las personas intentan matar a estos animales. La última muerte confirmada a causa del ofidismo en nuestro país, en 1986, fue ocasionada por esta razón (Otheguy, 2021).

Así como las toxinas de los ofidios causan importantes daños cuando se pone la óptica en el accidente ofídico, son mucho más que eso. Entender los mecanismos y acción biológica que subyacen a la acción de las toxinas permite explotar su potencial terapéutico para el tratamiento de diversas patologías (Goswami et al., 2014), se espera que este trabajo contribuya a dicho entendimiento.



6. Conclusiones y perspectivas

En primer lugar, cabe destacar el rol y la potencialidad del uso de muestras liofilizadas, actualmente, estas muestras conservan de forma íntegra su actividad enzimática y la información que puede extraerse de las mismas es muy amplia de gran utilidad. Así mismo, presenta la enorme ventaja de no tener que realizar la manipulación de ejemplares y las respectivas maniobras de extracción. Estas maniobras exigen un alto grado de capacitación y exponen al usuario a situaciones de riesgo, así como al animal involucrado a cierto grado de estrés. Dado que las muestras almacenadas pertenecen a ejemplares mantenidos en condiciones controladas, tanto de dieta como temperatura y humedad, existe una gran potencialidad en la comparación con muestras pertenecientes a ejemplares extraídos de la naturaleza. Conocer sobre los venenos permite conocer sobre la biología de las especies, así como entender cuales las diferencias existentes respecto a las poblaciones naturales, que son las que causan los accidentes ofídicos. Así mismo, contemplando esta variabilidad e influencia de factores exógenos sobre las toxinas de los venenos, se destaca el hecho de partir de muestras donde la variabilidad observada puede responder a factores endógenos.

Se encontraron diferencias entre los venenos de *B. alternatus* y *B. pubescens* en la diversidad de toxinas y en la proporción relativa de sus componentes principales. Las diferencias en relación a la actividad se vieron reflejadas por el ensayo de hemólisis indirecta, ensayo general de actividad fosfolipasa A_2 y en la inhibición diferencial de la actividad de tipo trombina. Los resultados obtenidos en relación a la diversidad de fosfolipasas A_2 en *B. pubescens* podrían resultar en las principales diferencias respecto a la sintomatología del envenenamiento ocasionado por estas dos especies. Ensayos de actividad fosfolipasa de mayor especificidad, evaluando neurotoxicidad, citotoxicidad y miotoxicidad podrían colaborar en la identificación del rol de estos componentes. Otra diferencia, de corte estructural, se encontró a nivel de las clases de metaloproteasas presentes en los dos venenos. *B. alternatus* presenta una mayor concentración de metaloproteasas complejas, mientras que en el veneno de *B. pubescens* predominan las metaloproteasas en su forma más simple.

La caracterización realizada en el presente trabajo es de tipo preliminar. Es necesario testear la actividad sobre componentes aislados y realizar aproximaciones estructurales



para dilucidar la identidad de las toxinas de forma certera. A futuro, resultaría enriquecedor en contraste con los resultados obtenidos realizar estudios de transcriptómica y proteómica sobre los venenos de *B. alternatus* y *B. pubescens*. Debido a que, si bien se han realizado este tipo de abordajes para ambas especies, no a nivel nacional y se infiere que la región geográfica podría estar teniendo un rol en la composición de los venenos.

Se destacan las características de las toxinas presentes en los venenos de *B. alternatus* y *B. pubescens* que las vuelven potenciales blancos para el desarrollo de fármacos o agentes terapéuticos, abriendo posibles líneas de investigación que se centren en estos abordajes. Entre estas se encuentran las L-amino oxidasas y fosfolipasas A₂, con demostradas capacidades antitumorales y antivirales, ambas toxinas encontradas en los venenos de las dos especies del género *Bothrops* de nuestro país. Así mismo, se desarrolló un ensayo sensible a la actividad de tipo trombina, permite evaluar el efecto coagulante de los venenos de forma más práctica y simple respecto al ensayo de coagulación tradicional. Presenta también otras aplicaciones como pueden ser el testeo de compuestos inhibidores naturales, que han surgido en los últimos años como una posible solución o reemplazo de la utilización de suero antiofídico. Esta necesidad responde a las problemáticas asociadas tales como los efectos adversos ocasionados por el suero, sus costos de producción y de mantenimiento.

Bibliografía

Albuquerque, P. L. M. M., Paiva, J. H. H. G. L., Martins, A. M. C., Meneses, G. C., da Silva, G. B., Buckley, N., & Daher, E. F. (2020). Clinical assessment and pathophysiology of *Bothrops* venom-related acute kidney injury: a scoping review. *The journal of venomous animals and toxins including tropical diseases*, 26, e20190076. doi:10.1590/1678-9199-JVATITD-2019-0076

Araujo, M. S. & Martins, M. (2006). Defensive behaviour in pit vipers of the genus *Bothrops* (Serpentes, Viperidae). *Herpetological Journal*, 16 (3), 297-303.

Bastida, J., Crampet, A., Meneghel, M., Morais, V. (2019). Preliminary Biochemical and Venom Characterization of the Venom of *Phalotris lemniscatus* (Serpentes, Colubridae). *Current topics in medicinal chemistry*, 19(22), 1981–1989. doi:10.2174/1568026619666190802143252

Bastos, V., Gomes-Neto, F., Perales, J., Neves-Ferreira, A., & Valente, R. (2016). Natural Inhibitors of Snake Venom Metalloendopeptidases: History and Current Challenges. *Toxins*, 8(9), 250. doi:10.3390/toxins8090250

Bawaskar, H., S., Bawaskar, P., H. & Bawaskar, P., H. (2021). The Global Burden of Snake Bite Envenoming. *Journal of the Royal College of Physicians of Edinburgh*, 51(1):7-8. doi:10.4997/jrcpe.2021.102

Bawaskar, H. S., Bawaskar, P. H., & Bawaskar, P. H. (2017). Snake bite in India: a neglected disease of poverty. *The Lancet*, 390(10106), 1947–1948. doi:10.1016/s0140-6736(17)32175-x

Beolens, B., Watkins, M. & Grayson, M. (2011). The Eponym Dictionary of Reptiles. JHU Press. doi: 10.1353/book.1869.

Blaylock, R. (2004). Epidemiology of snakebite in Eshowe, KwaZulu-Natal, South Africa. *Toxicon*, 43(2), 159–166. doi: 10.1016/j.toxicon.2003.11.019

Bolon, I., Durso, A. M., Botero Mesa, S., Ray, N., Alcoba, G., Chappuis, F., & Ruiz de Castañeda, R. (2020). Identifying the snake: First scoping review on practices of communities



and healthcare providers confronted with snakebite across the world. *PLoS one*, 15(3), e0229989. doi: 10.1371/journal.pone.0229989

Calvete, J. J., Escolano, J., & Sanz, L. (2007). Snake Venomics of Bitis Species Reveals Large Intra-genus Venom Toxin Composition Variation: Application to Taxonomy of Congeneric Taxa. *Journal of Proteome Research*, 6(7), 2732–2745. doi:10.1021/pr0701714

Calvete, J. J., Borges, A., Segura, Á., Flores-Díaz, M., Alape-Girón, A., Gutiérrez, J. M., ... Sanz, L. (2009). Snake venomics and antivenomics of *Bothrops colubriensis*, a medically important pitviper of the complex endemic to Venezuela: Contributing to its taxonomy and snakebite management. *Journal of Proteomics*, 72(2), 227–240. doi: 10.1016/j.jprot.2009.01.005

Cardoso, K. C., Da Silva, M. J., Costa, G. G., Torres, T. T., Del Bem, L. E. V., Vidal, R. O., ... & Hyslop, S. (2010). A transcriptomic analysis of gene expression in the venom gland of the snake *Bothrops alternatus* (urutu). *BMC genomics*, 11, 1-22. doi: 10.1186/1471-2164-11-605

Carreira, S., Meneghel, M. & Achaval, F. (2005). Reptiles del Uruguay. (Eds). DIRAC, Facultad de Ciencias, UdelaR, Montevideo. 640 pp.

Carreira, S., Negrin, A., Tortorella, M. N., Pino, A., & Menéndez, C. (2006). Ofidismo en Uruguay: especies peligrosas y características del accidente ofídico. CID/CEUR, Montevideo. 96 pp.

Carreira, S. & Maneyro, R. (2013). Guía de Reptiles del Uruguay. Ediciones de la Fuga. Montevideo. 285 pp.

Carreira, S. & Maneyro, R. (2015). Lista Roja de los Anfibios y Reptiles del Uruguay. Una evaluación del estado de conservación de la herpetofauna de Uruguay sobre la base de los criterios de la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza. Dirección Nacional de Medio Ambiente, Montevideo.

Carreira, S. & Maneyro, R. (Eds.). (2019). Libro Rojo de los Anfibios y Reptiles del Uruguay. Biología y conservación de los Anfibios y Reptiles en peligro de extinción a nivel nacional. DINAMA, Montevideo.

Carreira, S. (2024). Lista sistemática de los reptiles de Uruguay. Sociedad Zoológica del Uruguay. Recuperado el 10 de marzo de 2024 de <https://szu.org.uy/lista-de-especies-reptiles/>

Cardoso, K. C., Da Silva, M. J., Costa, G. G., Torres, T. T., Del Bem, L., Vidal, R. O., ... Hyslop, S. (2010). A transcriptomic analysis of gene expression in the venom gland of the snake *Bothrops alternatus* (urutu). *BMC Genomics*, 11(1), 605. doi:10.1186/1471-2164-11-605

Castro, E. N., Lomonte, B., del Carmen Gutiérrez, M., Alagón, A., & Gutiérrez, J. M. (2013). Intraspecific variation in the venom of the rattlesnake *Crotalus simus* from Mexico: Different expression of crotoxin results in highly variable toxicity in the venoms of three subspecies. *Journal of Proteomics*, 87, 103–121. doi: 10.1016/j.jprot.2013.05.024

Cavalcante, J. S., de Almeida, D. E. G., Santos-Filho, N., A., Sartim, M., A., de Almeida, A., Brasileiro, ... & Ferreira, R., S. (2023). Crosstalk of Inflammation and Coagulation in *Bothrops* Snakebite Envenoming: Endogenous Signaling Pathways and Pathophysiology. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(14):11508. doi: 10.3390/ijms241411508

Chippaux, J-P. (2017). Incidence and mortality due to snakebite in the Americas. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 11(6), 1-39. doi: 10.1371/journal.pntd.0005662

Chippaux, J.-P. (2017). Snakebite envenomation turns again into a neglected tropical disease. *Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases*, 23(1). doi:10.1186/s40409-017-0127-6



Costa, F. L. S., Rodrigues, R. S., Izidoro, L. F. M., Menaldo, D. L., Hamaguchi, A., Homs-Brandeburgo, M. I., ... Rodrigues, V. M. (2009). Biochemical and functional properties of a thrombin-like enzyme isolated from *Bothrops pauloensis* snake venom. *Toxicon*, 54(6), 725–735. doi: 10.1016/j.toxicon.2009.05.040

Costa, J. de O., Fonseca, K. C., Neves Mamede, C. C., Beletti, M. E., Santos-Filho, N. A., Soares, A. M., ... Oliveira, F. de. (2010). Bhalternin: Functional and structural characterization of a new thrombin-like enzyme from *Bothrops alternatus* snake venom. *Toxicon*, 55(7), 1365–1377. doi: 10.1016/j.toxicon.2010.02.014

De Abreu, V. A., Leite, G. B., Oliveira, C. B., Hyslop, S., Furtado, M. de F. D., & Simioni, L. R. (2008). Neurotoxicity of *Micrurus altirostris* (Uruguayan coral snake) venom and its neutralization by commercial coral snake antivenom and specific antiserum raised in rabbits. *Clinical Toxicology*, 46(6), 519–527. doi:10.1080/15563650701647405

de-Paula, F. F. P., Ribeiro, J. U., Santos, L. M., de Souza, D. H. F., Leonardecz, E., Henrique-Silva, F., & Selistre-de-Araújo, H. S. (2014). Molecular characterization of metalloproteases from *Bothrops alternatus* snake venom. *Comparative Biochemistry and Physiology Part D: Genomics and Proteomics*, 12, 74–83. doi: 10.1016/j.cbd.2014.09.001

Decreto N° 164/996 de 1996 [con fuerza de ley]. Mantiénese en vigor la prohibición de la caza, tenencia, transporte, comercialización e industrialización de todas las especies zoológicas silvestres y sus productos. 2 de mayo de 1996. D.O No. 6.

Deufel, A., & Cundall, D. (2006). Functional plasticity of the venom delivery system in snakes with a focus on the poststrike prey release behavior. *Zoologischer Anzeiger - A Journal of Comparative Zoology*, 245(3-4), 249–267. doi: 10.1016/j.jcz.2006.07.002

Deutscher, J. (2018). Science graphics. Alithographica. Recuperado el 11 de marzo de 2024 de <https://www.alithographica.com/#/infographics/>

Du, X.-Y., & Clemetson, K. J. (2002). Snake venom l-amino acid oxidases. *Toxicon*, 40(6), 659–665. doi:10.1016/s0041-0101(02)00102-2

Durso, A. M., de Castañeda, R. R., Montalcini, C., Mondardini, M. R., Fernandez-Marques, J. L., Grey, F., ... Bolon, I. (2021). Citizen science and online data: Opportunities and challenges for snake ecology and action against snakebite. *Toxicon*, X(9). doi: 10.1016/j.toxcx.2021.100071

Fenwick, A. M., Gutberlet, JR, R. L., Evans, J., A., & PARKINSON, C. L. (2009). Morphological and molecular evidence for phylogeny and classification of South American pitvipers, genera *Bothrops*, *Bothriopsis*, and *Bothrocophias* (Serpentes: Viperidae). *Zoological Journal of the Linnean Society*, 156(3), 617–640. doi:10.1111/j.1096-3642.2008.00495.x

Fox, J. W., & Serrano, S. M. T. (2009). Timeline of key events in snake venom metalloproteinase research. *Journal of Proteomics*, 72(2), 200–209. doi: 10.1016/j.jprot.2009.01.015

Freitas-de-Sousa, L. A., Nachtigall, P. G., Portes-Junior, J. A., Holding, M. L., Nystrom, G. S., Ellsworth, ... & Moura-da-Silva, A. M. (2020). Size Matters: An Evaluation of the Molecular Basis of Ontogenetic Modifications in the Composition of *Bothrops jararacussu* Snake Venom. *Toxins*, 12(12):791. doi: 10.3390/toxins12120791

Fry, B. G., Wickramaratna, J. C., Hodgson, W. C., Alewood, P. F., Kini, R. M., Ho, H., & Wüster, W. (2002). Electrospray liquid chromatography/mass spectrometry fingerprinting of *Acanthophis* (death adder) venoms: taxonomic and toxinological implications. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 16(6), 600–608. doi:10.1002/rcm.613



Fry, B. G. (2005). From genome to “venome”: Molecular origin and evolution of the snake venom proteome inferred from phylogenetic analysis of toxin sequences and related body proteins. *Genome Research*, 15(3), 403–420. doi:10.1101/gr.3228405

Fry, B. G., Scheib, H., van der Weerd, L., Young, B., McNaughtan, J., Ramjan, S. F. R., ... Norman, J. A. (2007). Evolution of an Arsenal: structural and functional diversification of the venom system in the advanced snakes (Caenophidia). *Molecular & Cellular Proteomics*, 7(2), 215–246. doi:10.1074/mcp.m700094-mcp200

Fry, B. G., Vidal, N., van der Weerd, L., Kochva, E., & Renjifo, C. (2009). Evolution and diversification of the Toxicofera reptile venom system. *Journal of proteomics*, 72(2), 127–136. doi:10.1016/j.jprot.2009.01.009

Gay, C. C., Leiva, L. C., Maruñak, S., Teibler, P., & Acosta de Pérez, O. (2005). Proteolytic, edematogenic and myotoxic activities of a hemorrhagic metalloproteinase isolated from *Bothrops alternatus* venom. *Toxicon*, 46(5), 546–554. doi: 10.1016/j.toxicon.2005.06.019

Geoghegan, P., Angulo, Y., Cangelosi, A., Díaz, M., & Lomonte, B. (1999). Characterization of a basic phospholipase A2-homologue myotoxin isolated from the venom of the snake *Bothrops neuwiedii* (yarára chica) from Argentina. *Toxicon*, 37(12), 1735–1746. doi:10.1016/s0041-0101(99)00115-4

Goswami, P. K., Samant, M. A. Y. U. R. I., & Srivastava, R. S. (2014). Snake venom, anti-snake venom & potential of snake venom. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 6(5), 4-7.

Gracheva, E. O., Ingolia, N. T., Kelly, Y. M., Cordero-Morales, J. F., Hollopeter, G., Chesler, A. T., ... Julius, D. (2010). Molecular basis of infrared detection by snakes. *Nature*, 464(7291), 1006–1011. doi:10.1038/nature08943

Gutiérrez, J. M., & Lomonte, B. (1989). Local tissue damage induced by *Bothrops* snake venoms. A review. *Memórias do Instituto Butantan*, 51(4), 211-223.

Gutiérrez, J. (2000). Snake venom metalloproteinases: Their role in the pathogenesis of local tissue damage. *Biochimie*, 82(9-10), 841–850. doi:10.1016/s0300-9084(00)01163-9

Gutiérrez, J. M., Escalante, T., & Rucavado, A. (2009). Experimental pathophysiology of systemic alterations induced by *Bothrops asper* snake venom. *Toxicon*, 54(7), 976–987. doi:10.1016/j.toxicon.2009.01.039

Gutiérrez, J. M., Calvete, J. J., Habib, A. G., Harrison, R. A., Williams, D. J., & Warrell, D. A. (2017). Snakebite envenoming. *Nature Reviews Disease Primers*, 3, 17063. doi:10.1038/nrdp.2017.63

Habib, A. G., & Brown, N. I. (2018). The snakebite problem and antivenom crisis from a health-economic perspective. *Toxicon*, 150, 115–123. doi: 10.1016/j.toxicon.2018.05.009

Hiu, J., J. & Khun, M., K. (2020). Cytotoxicity of snake venom enzymatic toxins: phospholipase A2 and l-amino acid oxidase. *Biochemical Society Transactions*, 48 (2): 719–731. doi: 10.1042/BST20200110

Ibadullah, W. A. H. W., Azmi, M. F., Abas, M. I., Rahim, S. S. S. A., Jeffree, M. S., Azhar, Z. I., ... & Hassan, M. R. (2021). Determinants of snakebite mortality in Asia: A systematic review. *Annals of Medicine and Surgery*, 62, 16-20. doi: 10.1016/j.amsu.2020.12.040



Instituto Biológico Argentino S.A.I.C. (2006). Suero Antiofídico Polivalente BIOL. <https://www.ofidismo.biol.com.ar/suero.php>

Iordansky, N. N. (1989). Evolution of Cranial Kinesis in Lower Tetrapods. *Netherlands Journal of Zoology*, 40(1), 32–54. doi:10.1163/156854289x00174

Juanena, C., Saldun, P., Zelada, B., Negrin, A., Paciel, D. & Carreira, S. (2018). Mordedura por víbora de coral (*Micrurus altirostris*): primer caso en Uruguay. *Revista Médica del Uruguay*, 34(4), 154-167. doi:10.29193/rmu.34.4.9

Kardong, K., V. (1980). Evolutionary Patterns in Advanced Snakes. *American Zoologist*, 20(1), 269–282. doi: 10.1093/icb/20.1.269

Kardong, K. V. (1986). Kinematics of swallowing in the yellow rat snake, *Elaphe obsoleta quadrivittata*: a reappraisal. *Jap. J. Herpetol*, 11(3), 96-109.

Kardong, K. V., Dullemeijer, P., & Fransen, J. A. M. (1986). Feeding Mechanism in the Rattlesnake *Crotalus durissus*. *Amphibia-Reptilia*, 7(3), 271-302. doi: 10.1163/156853886X00055

Kini, R-M. (2003). Excitement ahead: structure, function and mechanism of snake venom phospholipase A2 enzymes. *Toxicon*, 42(8), 827–840. doi: 10.1016/j.toxicon.2003.11.002

Kini, R. M. (2005a). Serine Proteases Affecting Blood Coagulation and Fibrinolysis from Snake Venoms. *Pathophysiology of Haemostasis and Thrombosis*, 34(4-5), 200–204. doi: 10.1159/000092424

Kini, R. M. (2005b). The intriguing world of prothrombin activators from snake venom. *Toxicon*, 45(8), 1133–1145. doi:10.1016/j.toxicon.2005.02.0

Kishimoto, M., & Takahashi, T. (2001). A Spectrophotometric Microplate Assay for - Amino Acid Oxidase. *Analytical Biochemistry*, 298(1), 136–139. doi: 10.1006/abio.2001.5381

Kochva, E. (1987). The origin of snakes and evolution of the venom apparatus. *Toxicon*, 25(1), 65–106. doi:10.1016/0041-0101(87)90150-4

Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259), 680–685. doi:10.1038/227680a0

Larréché, S., Chippaux, J. P., Chevillard, L., Mathé, S., Résière, D., Siguret, V., & Mégarbane, B. (2021). Bleeding and thrombosis: Insights into pathophysiology of *Bothrops* venom-related hemostasis disorders. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(17), 9643. doi: 10.3390/ijms22179643

Lee, M. (2013). Serpentes (Snakes). doi: 10.1002/9780470015902.a0001543.pub2

Lee, M. (2021). Serpentes (Snakes). *Encyclopedia of Life Sciences*, (2), 111-117. doi: 10.1002/9780470015902.a0029264

Machado-Braga, J. R., de Moraes-Zani, K., Pereira, D. dos S., Sant'Anna, S. S., da Costa Galizio, N., Tanaka-Azevedo, A. M., ... Teixeira da Rocha, M. M. (2020). Sexual and ontogenetic variation of *Bothrops leucurus* venom. *Toxicon*. doi: 10.1016/j.toxicon.2020.05.028.

Mackessy, S.P. (Eds.). (2010). Handbook of Venoms and Toxins of Reptiles (1st ed.). CRC Press. doi: 10.1201/9781420008661



Mahler, D. L. & Kearney, M. (2006). The Palatal Dentition in Squamate Reptiles: Morphology, Development, Attachment, and Replacement. *Fieldiana Zoology*, 2006(108), 1-61. doi: 10.3158/0015-0754(2006)108[1:TPDISR]2.0.CO;2

Malhotra, A., Wüster, W., Owens, J. B., Hodges, C. W., Jesudasan, A., Ch, G., ... Murray, K. A. (2021). Promoting co-existence between humans and venomous snakes through increasing the herpetological knowledge base. *Toxicon: X*, 12, 100081.

Mamede, C. C. N., de Sousa, B. B., Pereira, D. F. da C., Matias, M. S., de Queiroz, M. R., de Moraes, N. C. G., ... de Oliveira, F. (2016). Comparative analysis of local effects caused by *Bothrops alternatus* and *Bothrops moojeni* snake venoms: enzymatic contributions and inflammatory modulations. *Toxicon*, 117, 37–45. doi: 10.1016/j.toxicon.2016.03.0

Markland, F. S. (1998). Snake venoms and the hemostatic system. *Toxicon*, 36(12), 1749–1800. doi:10.1016/s0041-0101(98)00126-3

Markland, F. S., & Swenson, S. (2013). Snake venom metalloproteinases. *Toxicon*, 62, 3–18. doi: 10.1016/j.toxicon.2012.09.004

Martins, L., de Araújo, P., Bon, C., Hyslop, S. & de Araújo, A. (2009). In vitro hemolytic activity of *Bothrops lanceolatus* (fer-de-lance) venom. *Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases*, 15(3), 498–508. doi:10.1590/S1678-91992009000300011

Matsui, T., Fujimura, Y., & Titani, K. (2000). Snake venom proteases affecting hemostasis and thrombosis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology*, 1477(1-2), 146–156. doi: 10.1016/s0167-4838(99)00268-x

Mattison, C. (1986). *Snakes of the World*. Blandford Press.

McCarthy, C. J. (1985). Monophyly of elapid snakes (Serpentes: Elapidae). An assessment of the evidence. *Zoological Journal of the Linnean Society*, 83(1), 79–93. doi: 10.1111/j.1096-3642.1985.tb00873.x

Ministerio de Salud Pública [MSP]. (31 de marzo de 2023). *Intoxicaciones: araneismo y ofidismo*. <https://www.gub.uy/ministerio-salud-publica/comunicacion/publicaciones/intoxicaciones-araneismo-ofidismo#>

Morais, V., Negrín, A., Tortorella, M. N., & Massaldi, H. (2012). Evolution of venom antigenaemia and antivenom concentration in patients bitten by snakes in Uruguay. *Toxicon*, 60(6), 990–994. doi: 10.1016/j.toxicon.2012.07.001

Morais, V., Berasain, P., Ifrán, S., Carreira, S., Tortorella, M. N., Negrín, A., & Massaldi, H. (2012). Humoral immune responses to venom and antivenom of patients bitten by *Bothrops* snakes. *Toxicon*, 59(2), 315–319. doi: 10.1016/j.toxicon.2011.12.006

Morais, V. (2012). Análisis comparativo de los venenos ofídicos de importancia clínica y estudio bioquímico del accidente ofídico en Uruguay [Tesis de doctorado, Facultad de Química, Universidad de la República]. Repositorio Colibrí: colibri.udelar.edu.uy/jspui/handle/20.500.12008/2672

Morais, V., Massaldi, H. (2009). Snake antivenom: adverse reactions and production technology. *J. Venom. Anim. Toxins incl. Trop. Dis.* 15, 2– 18. ISSN: 1678-9199

Morais, V., Baraibar, M., & Carreira, S. (2006). Intraspecific variation of *Bothrops pubescens* (Cope, 1869) venom in Uruguay (Serpentes: Viperidae). *Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases*, 12, 604-611. doi: 10.1590/S1678-91992006000400007

Moura-da-Silva, A. M., Furlan, M. S., Caporrino, M. C., Grego, K. F., Portes-Junior, J. A., Clissa, P. B., ... & Magalhães, G. S. (2011). Diversity of metalloproteinases in *Bothrops neuwiedi*



snake venom transcripts: evidences for recombination between different classes of SVMPs. *BMC genetics*, 12, 1-14. doi: 10.1186/1471-2156-12-94.

Murray, E. J., & Foote, F. (1979). The origins of fear of snakes. *Behaviour Research and Therapy*, 17(5), 489–493. doi:10.1016/0005-7967(79)90065-2

Mustapha, S. K., Mubi, B. M., & Askira, B. H. (2010). Bilateral blindness following snakebite. *Tropical Doctor*, 40(2), 117–118. doi:10.1258/td.2009.090429

Negrin, A., Battocletti, M. A., Juanena, C., & Morais, V. (2021). Reports of Doses Administered and Adverse Reactions to Snake Antivenom Used in Uruguay in 2018. *Frontiers in toxicology*, 3, 690964. doi:10.3389/ftox.2021.690964

Negrin, A., Morais, V., Carreira, S., & Tortorella, M.N. (2019). Mordedura de *Phalotris lemniscatus* (Duméril, Bibron & Duméril, 1854) (Squamata, Dipsadidae) en Uruguay. *Acta toxicológica argentina*, 27(2), 65-71.

Newman, E. A., & Hartline, P. H. (1982). The Infrared "Vision" of Snakes. *Scientific American*, 246(3), 116–127.

Olaoba, O. T., Karina Dos Santos, P., Selistre-de-Araujo, H. S., & Ferreira de Souza, D. H. (2020). Snake Venom Metalloproteinases (SVMPs): A structure-function update. *Toxicon: X*, 7, 100052. doi: 10.1016/j.toxcx.2020.100052

Otheguy, M. (30 de septiembre de 2021). *Mitos y verdades de las mordeduras de serpientes en Uruguay: nuevo estudio analiza y compara efectos adversos de los sueros antiofídicos*. La diaria ciencia. <https://ladiaria.com.uy/ciencia/articulo/2021/9/mitos-y-verdades-de-las-mordeduras-de-serpientes-en-uruguay-nuevo-estudio-analiza-y-compara-efectos-adversos-de-los-sueros-antiofídicos/>

Pawelek, P. D., Cheah, J., Coulombe, R., Macheroux, P., Ghisla, S. & Vrieling, A. (2000). The structure of L-amino acid oxidase reveals the substrate trajectory into an enantiomerically conserved active site. *EMBO Journal*. 19, 4204–4215. doi: 10.1093/emboj/19.16.4204

Perumal S. R., Gopalakrishnakone, P., & Chow, V. T. (2012). Therapeutic application of natural inhibitors against snake venom phospholipase A(2). *Bioinformation*, 8(1), 48–57. doi: 10.6026/97320630008048

Pino, A. C. (2012). *Producción de Suero Antiofídico para uso humano en el Instituto de Higiene "Prof. Arnoldo Berta" (Facultad de Medicina), Av. A. Navarro 3051, Montevideo, Uruguay*. Bioterio de Animales Ponzosñosos (Serpentario). <https://www.serpentario.edu.uy/produccion.html>

Ponce-Soto, L. A., Lomonte, B., Gutiérrez, J. M., Rodrigues-Simioni, L., Novello, J. C., & Marangoni, S. (2007). Structural and functional properties of BaTX, a new Lys49 phospholipase A2 homologue isolated from the venom of the snake *Bothrops alternatus*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 1770(4), 585–593. doi:10.1016/j.bbagen.2006.11.015

Prado-Franceschi, J., & Hyslop, S. (2002). SOUTH AMERICAN COLUBRID ENVENOMATIONS. *Journal of Toxicology: Toxin Reviews*, 21(1-2), 117–158. doi: 10.1081/txr-120004744

Praveen Kumar, K. V., Praveen Kumar, S., Kasturi, N., & Ahuja, S. (2015). Ocular Manifestations of Venomous Snake Bite over a One-year Period in a Tertiary Care Hospital. *Korean Journal of Ophthalmology*, 29(4), 256. doi: 10.3341/kjo.2015.29.4.256

Queiroz, G. P., Pessoa, L. A., Portaro, F. C. V., Furtado, M. de F. D., & Tambourgi, D. V. (2008). Interspecific variation in venom composition and toxicity of Brazilian snakes from *Bothrops* genus. *Toxicon*, 52(8), 842–851. doi: 10.1016/j.toxicon.2008.10.002



Rangel, D. L., Melani, R. D., Carvalho, E. L., Boldo, J. T., Gomes dos Santos, T., Kelleher, N., L. & Pinto, P. M. (2022). Venom characterization of the Brazilian Pampa snake *Bothrops pubescens* by top-down and bottom-up proteomics. *Toxicon*, 220. doi: 10.1016/j.toxicon.2022.106937

Roberts, L., S., Johnson, E., K., Zeng, S., M., Hamilton, E., B., Abdoli, A., Alahdab, F., ... & Liane, K., O. Global mortality of snakebite envenoming between 1990 and 2019. (2022). *Nature Communications*, 13(6160). doi: 10.1038/s41467-022-33627-9

Rodríguez, S., Negrin, A., & Burger, M. (2004). Efecto adverso por suero antiofídico. *Revista Médica del Uruguay*, 20(3), 228-232.

Rucavado, A., Escalante, T., & Gutiérrez, J. M. (2004). Effect of the metalloproteinase inhibitor batimastat in the systemic toxicity induced by *Bothrops asper* snake venom: understanding the role of metalloproteinases in envenomation. *Toxicon*, 43(4), 417–424. doi: 10.1016/j.toxicon.2004.01.016

Sajevic, T., Leonardi, A., & Križaj, I. (2011). Haemostatically active proteins in snake venoms. *Toxicon*, 57(5), 627–645. doi: 10.1016/j.toxicon.2011.01.006

Sant'Ana Malaque, C.M., Gutiérrez, J.M. (2015). Snakebite Envenomation in Central and South America. In: Brent, J., Burkhart, K., Dargan, P., Hatten, B., Megarbane, B., Palmer, R. (eds) *Critical Care Toxicology*. Springer, Cham. doi: 10.1007/978-3-319-20790-2_146-1

Scott, D. (1997). Phospholipase A2: structure and catalytic properties. In *Venom Phospholipase A2 Enzymes: Structure, Function and Mechanism*. (Kini, R.M., ed.), pp. 97–128, *John Wiley & Son Limited*, Chichester.

Serrano, S. M. T. (2013). The long road of research on snake venom serine proteinases. *Toxicon*, 62, 19–26. doi: 10.1016/j.toxicon.2012.09.00

Serrano, S. M., Kim, J., Wang, D., Dragulev, B., Shannon, J. D., Mann, H. H., Veit, G., Wagener, R., Koch, M., Fox, J. W. (2006). The cysteine-rich domain of snake venom metalloproteinases is a ligand for von Willebrand factor A domains: role in substrate targeting. *J Biol Chem*, 281(52):39746-56. doi: 10.1074/jbc.M604855200.

Sites, J. W., Reeder, T. W., & Wiens, J. J. (2011). Phylogenetic Insights on Evolutionary Novelty in Lizards and Snakes: Sex, Birth, Bodies, Niches, and Venom. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 42(1), 227–244. doi: 10.1146/annurev-ecolsys-102710-145051

Soares, A., Fontes, M., & Giglio, J. (2004). Phospholipase A2 Myotoxins from *Bothrops* Snake Venoms: Structure- Function Relationship. *Current Organic Chemistry*, 8(17), 1677–1690. doi:10.2174/1385272043369610

Soutullo A., Clavijo, C. & Martínez-Lanfranco, J. A. (Eds.). 2013. *Especies prioritarias para la conservación en Uruguay. Vertebrados, moluscos continentales y plantas vasculares. SNAP/DINAMA/MVOTMA y DICYT/ MEC*, Montevideo. 222 pp.

Suarez, N., & Morais, V. (2019). Identification of Venom-Specific Fingerprints of Clinically Relevant Uruguayan Snakes by MALDI-TOF. *American Journal of Biochemistry and Biotechnology*, 15(3), 119–124. doi:10.3844/ajbbbsp.2019.119.124

Subashini, J., Carukshi, A., Thashi, C. & Ariarane, G. (2018). Long-term health complications following snake envenoming, *Journal of Multidisciplinary Healthcare*, 11:, 279-285. doi: 10.2147/JMDH.S126648

Tan, K. K., Bay, B. H., & Gopalakrishnakone, P. (2018). L-amino acid oxidase from snake venom and its anticancer potential. *Toxicon*, 144, 7–13. doi:10.1016/j.toxicon.2018.01.015



- Tanjoni, I., Butera, D., Bento, L., Della-Casa, M. S., Marques-Porto, R., Takehara, H. A., ... Moura-da-Silva, A. M. (2003). Snake venom metalloproteinases: structure/function relationships studies using monoclonal antibodies. *Toxicon*, 42(7), 801–808. doi:10.1016/j.toxicon.2003.10.010
- Tashima, A. K., Sanz, L., Camargo, A. C. M., Serrano, S. M. T., & Calvete, J. J. (2008). Snake venomomics of the Brazilian pitvipers *Bothrops cotiara* and *Bothrops fonsecai*. Identification of taxonomy markers. *Journal of Proteomics*, 71(4), 473–485. doi:10.1016/j.jprot.2008.07.007
- Tsetlin, V. (1999). Snake venom alpha-neurotoxins and other “three-finger” proteins. *European Journal of Biochemistry*, 264(2), 281–286. doi:10.1046/j.1432-1327.1999.00623.x
- Tu, A. T. (1996). Overview of Snake Venom Chemistry. *Natural Toxins* 2, 37–62. doi:10.1007/978-1-4613-0361-9_3
- Uetz, P., Freed, P., Aguilar, R., Reyes, F., Kudera, J. & Hošek, J. (eds.) (2023). The Reptile Database. Recuperado el 10 de marzo de 2024 de <http://www.reptile-database.org>
- Vitt, L. J., & Caldwell, J. (2014). An introductory biology of amphibians and reptiles. *Herpetology*. doi: doi.org/10.1016/C2010-0-67152-5
- Williams, J.D., Vera, D.G. & Di Pietro, D.O. (2021). Lista comentada de las serpientes de la Argentina, con referencias a su sistemática, distribución geográfica, dieta, reproducción, potencial peligrosidad y etimologías. *Revista del Museo de La Plata*, 6(1), pp. 26-124. doi: 10.24215/25456377e142
- Williams, D. J., Faiz, M. A., Abela-Ridder, B., Ainsworth, S., Bulfone, T. C., Nickerson, A. D., ... Warrell, D. A. (2019). Strategy for a globally coordinated response to a priority neglected tropical disease: Snakebite envenoming. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 13(2). doi: 10.1371/journal.pntd.0007059
- Williams, D. J., Gutiérrez, J.-M., Calvete, J. J., Wüster, W., Ratanabanangkoon, K., Paiva, O., ... & Warrell, D. A. (2011). Ending the drought: New strategies for improving the flow of affordable, effective antivenoms in Asia and Africa. *Journal of Proteomics*, 74(9), 1735–1767. doi: 10.1016/j.jprot.2011.05.027
- White, J., Mahmood, M. A., Alfred, S., Thwin, K. T., Kyaw, K. M., Zaw, A., ... & Peh, C. A. (2019). A comprehensive approach to managing a neglected, neglected tropical disease; The Myanmar Snakebite Project (MSP). *Toxicon: X*(1), 100001. doi: 10.1016/j.toxcx.2018.100001
- Xiao, H., Pan, H., Liao, K., Yang, M. & Huang, C. (2017). Snake Venom PLA2, a promising target for broad-spectrum antivenom drug development. *Biomed Res Int*, 6592820. doi: 10.1155/2017/6592820
- Young, B., A., Lee, C., E., Kyle, M., D. (2002). Do Snakes Meter Venom? *BioScience*, 52(12), 1121–1126, doi: 10.1641/0006-3568(2002)052[1121:DSMV]2.0.CO;2
- Zhang, Y.-J., Wang, J.-H., Lee, W.-H., Wang, Q., Liu, H., Zheng, Y.-T., & Zhang, Y. (2003). Molecular characterization of *Trimeresurus stejnegeri* venom l-amino acid oxidase with potential anti-HIV activity. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 309(3), 598–604. doi:10.1016/j.bbrc.2003.08.044

Agradecimientos

:)

