

NATHALIA MEJÍA SÁNCHEZ

Caracterización inmunoquímica y
enzimática del veneno de la serpiente
Porthidium nasutum

São Paulo, Brasil

2007

Dedicación

*A mis padres por su apoyo, amor y
la infinita confianza que siempre
tuvieron en mí.*

*A mi familia por las continuas
enseñanzas y vivencias.*

*A Julián Esteban por su fortaleza,
cariño y apoyo incondicional.*

Agradecimientos

Al INSTITUTO BUTANTAN por darme la oportunidad de realizar mi trabajo de grado en sus instalaciones.

A la Dra. Katia Cristina Barbaro, por la orientación y apoyo en la realización de este proyecto, así como sus continuas enseñanzas dentro del laboratorio.

Al Centro de Ofidismo y Escorpionismo de la Universidad de Antioquia, por la donación del veneno.

Al Prof. Dr. Rafael Otero de la Universidad de Antioquia, por toda su colaboración en la realización del trabajo.

A Julio Cesar Torres, director del programa Licenciatura en Biología y Educación Ambiental por su invaluable ayuda académica a lo largo de toda mi carrera.

A mi compañera de laboratorio y amiga, Bianca Távora por su agradable compañía y ánimo para seguir con mis proyectos futuros.

A los funcionarios del Laboratorio de Inmunopatología del Instituto Butantan por el apoyo técnico.

NATHALIA MEJÍA SÁNCHEZ

Caracterización inmunoquímica y enzimática del veneno de
la serpiente *Porthidium nasutum*

Trabajo presentado para optar por el título
de Licenciado en Biología y Educación
Ambiental, Universidad del Quindío.

Orientador:

Dra. Katia Cristina Barbaro. Laboratorio
de Inmunopatología, Instituto Butantan.

São Paulo, Brasil

2007

PREFACIO

En el trabajo de pre-grado “Caracterización inmunoquímica y enzimática del veneno de la serpiente *Porthidium nasutum*”, presentado al programa de Licenciatura en Biología y Educación Ambiental de la Universidad del Quindío, se estudiaron algunas propiedades enzimáticas del veneno de *Porthidium nasutum*, además de sus características inmunoquímicas utilizando el antiveneno botrópico producido por el Instituto Butantan en São Paulo, Brasil. El presente estudio, que además fue presentado y nominado a mejor trabajo de pregrado en la Reunión Científica Anual realizada por el mismo instituto en diciembre de 2007, reúne las investigaciones desarrolladas sobre dicho veneno en un periodo de seis meses donde se intentó ampliar los conocimientos existentes sobre algunas de las características presentes en el veneno de la serpiente *Porthidium nasutum*, que posee una alta incidencia entre los accidentes ofídicos reportados en Colombia.

CONTENIDO

	pág.
LISTA DE ABREVIATURAS.....	2
RESUMEN.....	3
ABSTRACT.....	4
1. INTRODUCCIÓN.....	5
1.1 <i>Porthidium nasutum</i>	6
1.2 Epidemiología.....	8
1.3 El veneno.....	10
1.4 El suero.....	13
2. OBJETIVOS.....	17
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	18
3.1 Veneno.....	18
3.2 Suero.....	18
3.3 Electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE).....	19
3.4 Zimografía.....	20
3.4.1 Actividad hialuronidásica.....	20
3.4.2 Actividad caseinolítica, gelatinolítica y fibrinogenolítica.....	21
3.5 Inmunoensayo (ELISA).....	22
3.6 Western Blotting.....	23
4. RESULTADOS.....	24
4.1 Análisis del veneno de <i>Porthidium nasutum</i> por SDS–PAGE.....	24
4.2 Estudio de las actividades enzimáticas del veneno de <i>Porthidium nasutum</i> por Zimografía.....	26

4.2.1 Actividad hialuronidásica.....	26
4.2.2 Análisis de las actividades caseinolítica, gelatinolítica y fibrinogenolítica	28
4.2.2.1 Actividad caseinolítica.....	28
4.2.2.2 Actividad gelatinolítica.....	30
4.2.2.3 Actividad fibrinogenolítica.....	31
4.3 Reactividad cruzada ente los venenos de <i>Porthidium nasutum</i> y <i>Bothrops jararaca</i> revelada por ELISA.....	32
4.4 Reactividad antigénica cruzada entre los venenos de <i>Porthidium nasutum</i> y <i>Bothrops jararaca</i> revelada por Western Blotting.....	34
5. DISCUSIÓN.....	36
6. CONCLUSIONES.....	40
7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	41

LISTA DE ABREVIATURAS

BSA	Bovine Serum Albumin (Albumina de suero bovino)
ELISA	Enzyme linked immunosorbent assay (Ensayo Inmunoenzimático)
OPD	Orthophenylene diamine (Orto-fenil-diamina)
PAGE	Polyacrilamide gel electrophoresis (Electroforesis en gel de poliacrilamida)
PBS	Phosphate Buffered Saline (Salina en tampón fosfato)
SDS	Sodium dodecyl sulfate (Dodecil sulfato de sodio)
TRIS	Hydroxymethyl – aminomethane (Hidroximetil amino metano)

RESUMEN

Caracterización inmunoquímica y enzimática del veneno de la serpiente *Porthidium nasutum*

Nathalia Mejía Sánchez. Código: 77620. Directora: Katia Cristina Barbaro. 11 de diciembre de 2007

Licenciatura en Biología y Educación Ambiental
Facultad de Educación

El envenenamiento por *Porthidium nasutum* causa principalmente dolor, edema, hemorragia y necrosis en el lugar de la mordedura y en algunos casos, se puede presentar deficiencia renal aguda. El objetivo de este trabajo, fue caracterizar algunas actividades inmunoquímicas y enzimáticas del veneno de *P. nasutum*. La caracterización bioquímica se llevó a cabo por medio de electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de SDS (12,5%). Caseína, gelatina, fibrinógeno y ácido hialurónico fueron adicionados como sustrato en SDS-PAGE (12,5%), para determinar las actividades enzimáticas. Se realizaron ELISA y Western Blotting para verificar el reconocimiento del veneno por parte del suero antibotrópico producido por el Instituto Butantan. Para todos los experimentos, se utilizó veneno de *Bothrops jararaca* como control positivo. El perfil electroforético del veneno de *P. nasutum* mostró por lo menos 12 bandas teñidas con nitrato de plata, los componentes situados por debajo de 32 kDa, tuvieron masa molecular semejante a los componentes del veneno de *B. jararaca*. Los resultados de la zimografía demostraron que el veneno de *P. nasutum*, no presenta actividades fibrinogenolítica ni hialuronidásica y las actividades caseinolítica y gelatinolítica, fueron pobremente detectadas en este veneno, con bandas localizadas cerca de 35 kDa en el caso de la caseína y 50, 38 y 32 kDa cuando se usó gelatina como sustrato. Anticuerpos contra el veneno de *P. nasutum* (título 512.000) fueron detectados usando el suero antibotrópico que reconoció mínimo 12 bandas en el veneno de *P. nasutum* por Western Blotting, las principales entre 70 y 30 kDa. Las actividades enzimáticas estudiadas fueron levemente detectadas en el veneno de *P. nasutum*. Sin embargo, fue interesante observar que los anticuerpos presentes en el suero antibotrópico reconocen fuertemente los componentes del veneno de *P. nasutum*. Estos resultados sugieren que el suero antibotrópico producido en Brasil, puede neutralizar algunas actividades tóxicas del veneno de *Porthidium nasutum*.

Palabras clave: *Porthidium nasutum*, veneno, envenenamiento, antiveneno.

ABSTRACT

MEJÍA SÁNCHEZ, N. Immunochemical and enzymatic characterization of *Porthidium nasutum* venom snake. – Laboratório de Imunopatologia, Instituto Butantan, São Paulo, SP. Brasil. 2007.

Porthidium nasutum snake (Hog-nosed pit viper) inhabits tropical, wet and moist forests from southern Mexico to Ecuador. In Colombia, *Porthidium* and *Bothrops* genera are responsible for about 95% of snakebites. Envenomation by *Porthidium nasutum* causes mainly pain, edema, haemorrhage and necrosis at the site of the bite and, in a few cases, acute renal failure can be present. This work aims to characterize some immunochemical and enzymatic activities of *P. nasutum* venom. Biochemical characterization was performed using polyacrylamide gel electrophoresis – sodium dodecyl sulphate (12.5%). Casein, gelatin, fibrinogen and hyaluronic acid were incorporated as substrates in SDS-PAGE (12.5%) to determinate the enzymatic activities. In addition, ELISA and Western Blotting were performed to verify the recognizing of *P. nasutum* venom using antiotheropic serum produced by Butantan Institute. For all experiments, it was used *Bothrops jararaca* venom as a positive control. The electrophoretic profile of *P. nasutum* venom, showed at least 12 bands stained by silver nitrate, components below 32 kDa had molecular weights similar to components of *B. jararaca* venom. Zymography results demonstrated that *P. nasutum* venom did not have fibrinogenolytic and hyaluronidasic activities. Both gelatinolytic and caseinolytic activities were poorly detected in *P. nasutum* venom, with bands located around 35 kDa for gelatin y 50, 38 y 32 kDa when casein was used as substrate. Antibodies titer against *P. nasutum* (titer 512,000) venom was detected using antiotheropic serum. This serum recognized at least 12 bands by Western Blotting, the major ones being situated between 70 y 30 kDa. Enzymatic activities of *P. nasutum* venom were poorly detected. Furthermore, it was interesting to observe that antibodies present in antiotheropic serum strongly recognize *P. nasutum* venom components. These results suggest that antiotheropic serum produced in Brazil could neutralize some toxic activities of *P. nasutum* venom.

Key words: *Porthidium nasutum*, venom, envenomation, antivenin.

1. INTRODUCCIÓN

Existen diferencias entre animales venenosos y ponzoñosos. Los primeros; no presentan estructuras como dientes ó aguijones para inyectar toxinas y el envenenamiento ocurre normalmente por su ingestión. Ya en el segundo caso, el animal se considera ponzoñoso cuando produce la secreción tóxica en células ó glándulas altamente especializadas y es capaz de inyectar el veneno a través de una picada o ponzoña (De Freitas 1997; Russel, 2001; Mebs, 2002). Sin embargo, en la literatura no se hace distinción entre un tipo de animal y otro. Por lo tanto, a todo animal que posee algún tipo de sustancia tóxica, se le conoce vulgarmente con el nombre de animal venenoso, quienes normalmente, utilizan este tipo de secreciones para cazar las presas y ayudar en su pre-digestión, además de servir de defensa contra predadores (Mebs, 2002).

Con excepción de los pájaros, en la naturaleza se encuentran todo tipo de animales venenosos y ponzoñosos. Se calcula que hay aproximadamente 1.500 especies descritas, incluyendo especímenes marinos, artrópodos (como escorpiones y arañas) y cerca de 400 especies de serpientes que son de importancia médica para el hombre (Russel, 2001).

1.1 *Porthidium nasutum*

La serpiente *Porthidium nasutum* (Fig.1), descrita por primera vez por Bocourt en 1868, pertenece al Reino Animalia, Phylum Chordata, Clase Reptilia, Orden Squamata, Familia Viperidae y Subfamilia Crotalinae. Anteriormente recibía los nombres de *Bothrops nasuta* (Bocourt, 1868); *Bothriopsis proboscideus* (Cope, 1876) y *Thanatophis sutus* (Posada-Arango, 1889) entre otros y fue re-clasificada por la Convención Internacional para el manejo de especies de fauna y flora silvestre en 1989 bajo el nombre de *Porthidium nasutum* (Schier *et al.*, 2003).



www.afpmb.org/pubs/living_hazards/snakes.html

Figura 1 - *Porthidium nasutum*

Como el resto de los vipéridos, *P. nasutum* conocida popularmente como serpiente nariz de cerdo o veinticuatro, presenta dentición solenoglifa (Fig. 2). Tiene el cuerpo moderadamente robusto, mide entre 460 – 630 mm de longitud, con cabeza triangular diferenciada del cuello y pupilas verticales

elípticas. El color de fondo es pardo o canela, una serie de 15 a 23 manchas rectangulares o triangulares recorren su cuerpo (Fig. 1) y en juveniles; la punta de la cola es amarillenta. El tipo de reproducción es vivíparo, teniendo de 8 a 18 crías por parto (Campbell, 1998). Presenta hábitos diurnos y nocturnos y por su coloración es casi imperceptible en el suelo de la selva.



Figura 2 - Dentición solenoglifa

La serpiente *Porthidium nasutum*, se encuentra con frecuencia entre la hojarasca y en ocasiones trepa arbustos y matorrales a más de un metro del suelo, pues prefiere las zonas de selva poco perturbadas. Habita en la selva húmeda tropical (1200 m de altitud) desde el sur de México (Chiapas), hasta el sur de Ecuador (Porrás *et al.*, 1981; Schätti & Kramer, 1993; Campbell & Lamar, 2004; Cisneros-Heredia, 2004), pasando por la región occidental de Colombia en los departamentos de Antioquia, Chocó, Atlántico, Tolima, Huila y Meta (Fig. 3).

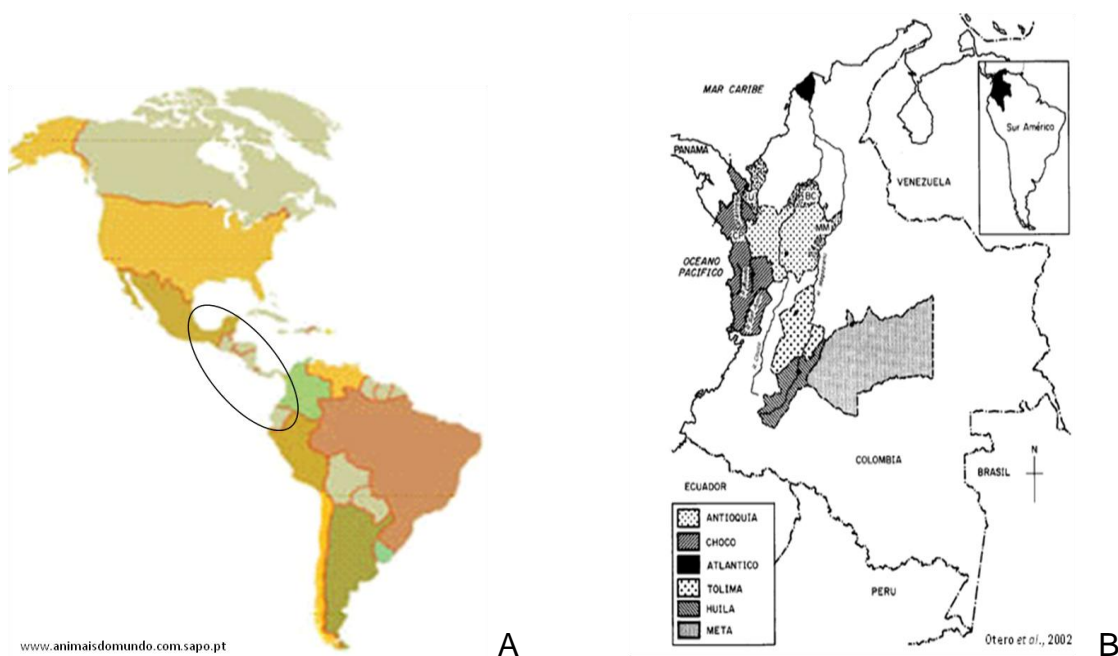


Figura 3 - (A) Distribución geográfica de *Porthidium nasutum* en el mundo. **(B)** en Colombia.

1.2 Epidemiología

La incidencia de accidentes ofídicos en el mundo es estimada alrededor de cinco millones de personas cada año, con una mortalidad de 125.000 habitantes/año. Más de la mitad de personas picadas por serpientes venenosas, necesitan cuidados médicos y aproximadamente 100.000 quedan con algún tipo de secuela (Chippaux, 1998). Por el gran número de casos reportados, se considera que este es un problema de salud pública sobre todo en los países tropicales (Who, 1981) y se refleja principalmente en jóvenes trabajadores del sector rural de sexo masculino (Gutiérrez *et al.*, 2006).

Porthidium nasutum; junto a *Bothrops asper*, ocasiona aproximadamente el 95% de los accidentes ofídicos en Colombia. Estos incidentes causan mortalidad de 5% y secuelas de 6%; atribuibles a complicaciones generadas por los rápidos efectos de los venenos y por la tardía iniciación del tratamiento específico (Otero *et al.*, 1992b).

Estudios clínicos muestran que el veneno de *Porthidium nasutum* induce efectos locales como edema, el cual puede extenderse a lo largo del miembro comprometido, hemorragia, ampollas y mionecrosis (Otero *et al.*, 1992 a; 1992 b), al igual que los accidentes botrópicos (França & Málaque, 2003). También se presentan signos sistémicos como alteraciones en la cascada de coagulación, presentes también en numerosos animales venenosos como las serpientes *Bothrops* (Santoro & Sano-Martins, 2003). Igualmente, hemorragias distantes del sitio de la mordedura (gingivorragia), hipotensión, trombocitopenia y nefrotoxicidad (Otero *et al.*, 1992a; Otero *et al.*, 1996). El óbito puede darse debido a complicaciones como insuficiencia renal aguda e infecciones secundarias (Otero *et al.*, 1992b).

Como lo explicaron Otero-Patiño y colaboradores (1998), la sintomatología clínica que presentan los pacientes después de la mordedura de *Porthidium nasutum*, es clasificada según la gravedad de los síntomas en tres grupos; leve; con daños locales presentes, moderado; caracterizado por los signos locales y trastornos en la coagulación y grave; que incluye los síntomas

anteriormente descritos junto a necrosis local e insuficiencia renal aguda ó crónica.

1.3 El veneno

El estudio de los venenos animales es un campo supremamente amplio. Existen innumerables publicaciones alrededor del mundo, que abordan el tema desde diversas perspectivas; desde la clínica hasta la biología molecular, pasando por la bioquímica, farmaceutica y fisiología en modelos experimentales (Picolo *et al.*, 2002; Barbaro *et al.*, 2005; De Roodt *et al.*, 2007; Da Silva *et al.*, 2007) y humanos (Otero *et al.*, 1996; Richardson *et al.*, 2007; Xu *et al.*, 2007; Kochar *et al.*, 2007), así como estudios *in vitro* (Francischetti *et al.*, 1998; Hung & Chiou, 2001; Machado *et al.*, 2005; Calvete *et al.*, 2007; Wei *et al.*, 2007).

Boquet (1992), en su libro “History of snake venom research”, cuenta que en el siglo XVI, Van Helmont propuso en su escrito llamado “Orthus Medicinae”, publicada después de su muerte en 1648, que los venenos de las serpientes eran “espíritus irritados”, que la bestia expulsaba cuando mordía y que coagulaban la sangre en las venas y detenían la circulación. También señala que fue hasta 1664 cuando Redi, en su publicación “Observatione Intorno Alle Vipera”, determinó que el jugo extraído de las glándulas venenosas de una serpiente, viva o muerta, causaba un daño letal. Debió pasar un siglo antes de

que Fontana, en su libro publicado en 1781, confirmara con resultados experimentales las observaciones de Redi, poniendo de esta forma fin a la “Teoría de los Espíritus”. A finales del siglo XVIII, Lavoisier, convirtió a la química en una ciencia experimental y un siglo después bajo la influencia de Claude Bernard, ocurrió el desarrollo de la fisiología en donde se comenzó a relacionar el entendimiento de las estructuras y las funciones en un sistema que definía las condiciones esenciales para el mantenimiento de la vida. Los químicos fueron los primeros en considerar los venenos como objetos de interés, esforzándose por definir su composición. Sometieron a los venenos a reacciones con diferentes tipos de reactivos e intentaron separar sus componentes. Observaron que algunos tipos de sustancias los destruían, mientras que otras los precipitaban. En 1878, ocurrió un nuevo hallazgo en la investigación de los venenos de las serpientes, cuando Pelder, propuso que los venenos eran sustancias “tipo proteínas” y luego utilizando el veneno de *Crotalus adamanteus*, determinó que su naturaleza no era homogénea, relata Boquet. Los exámenes realizados a las víctimas motivaron a los fisiólogos a reproducir experimentalmente en animales, los fenómenos observados en el hombre, con la finalidad de estudiarlos más detalladamente. Debido a que estos fenómenos eran el resultado de las alteraciones en una o más funciones, los fisiólogos trataron de disociar cada síntoma del envenenamiento y relacionarlo con la función más afectada. De esta manera fueron aumentando la comprensión de los fenómenos observados mediante experimentos *in vivo* en sistemas biológicos seleccionados. En las observaciones realizadas a

animales de laboratorio, picados por serpientes venenosas, llegaron a la conclusión que esos venenos habían tenido un efecto sobre la sangre circulante. Bajo algunas condiciones, el envenenamiento inhibía la coagulación y bajo otras condiciones, al realizar la autopsia del animal abriendo los vasos sanguíneos, se encontraba que la sangre estaba totalmente coagulada (Boquet, 1992).

Es bien conocido que las serpientes de la familia Viperidae, presentan como una de sus manifestaciones más agresivas a través de diversos efectos farmacológicos, las alteraciones sobre la cascada de coagulación (Scarborough *et al.*, 1993; Fujimura *et al.*, 1995; Fuly *et al.*, 1997; Clissa *et al.*, 2001). Las proteínas presentes en este tipo de venenos, pertenece a un grupo molecular heterogéneo con diversas propiedades físicas y bioquímicas, encontrándose tanto proteínas como glicoproteínas con masas moleculares que oscilan entre 5.000 y más de 200.000 Daltons, con presencia o ausencia de actividades enzimáticas (Kini & Evans, 1990).

Hablando específicamente del veneno de *P. nasutum* (anteriormente llamada *Bothrops nasutus*), Gené y colaboradores (1989), al trabajar con modelos murinos, encontraron que el veneno de *Porthidium nasutum* no presenta actividad coagulante ni desfibrinante según los protocolos usados, más tiene poca actividad fibrinolítica y fibrinogenolítica debido a que cliva la sub-unidad α

del fibrinógeno, dejando intactas las sub-unidades β y γ . En trabajos realizados por Otero *et al.* (1992a; 2002), usando ratones como modelo experimental, reportaron que el veneno de la *P. nasutum*, posee actividad letal, hemorrágica, edematizante, mionecrosante y hemolítica indirecta más no desfibrinante, como en el caso de las otras serpientes pertenecientes al género *Bothrops*.

1.4 El suero

El tratamiento que se le da al envenenamiento por vipéridos en Latinoamérica, se basa en la administración intravenosa de antivenenos mono ó polivalentes (Amaral *et al.*, 1991; Fan & Cardoso, 1995; Gutiérrez, 1995). Hasta el momento, la sueroterapia continúa siendo el tratamiento específico para este tipo de accidentes desde su descubrimiento en 1894 por Albert Calmette (Bon, 1996). Por recomendación de la Organización Mundial de la Salud (OMS), los antivenenos utilizados en un país deben ser evaluados en su capacidad neutralizante no sólo del efecto letal, sino también de otras actividades farmacológicas presentes en los venenos (Otero *et al.*, 2002). Actualmente, se producen en Colombia dos tipos de antiveneno; “Suero Antiofídico Polivalente” liofilizado de Laboratorios PROBIOL LTDA (antibotrópico, anticrotálico y antilachésico), y el “Suero Antiofídico Polivalente” del Instituto Nacional de Salud de Colombia (antibotrópico y anticrotálico), líquido que requiere refrigeración. Igualmente, es importado el suero líquido “Ativipmin[®]” del laboratorio mexicano BIOCLON, que neutraliza el veneno de serpientes de los

géneros *Bothrops*, *Crotalus*, *Agkistrodon*, *Lachesis* y *Sistrurus*. Sin embargo, no se encuentra disponible en el mercado colombiano el suero antiofídico producido por el Instituto Butantan que neutraliza específicamente, las acciones de los venenos botrópicos.

Hace algún tiempo, los investigadores vienen estudiando desde diversas perspectivas; principalmente el poder neutralizante de algunos sueros antiofídicos con relación a las actividades tóxicas del veneno de las serpientes del género *Porthidium*. Pese a esto, no se encuentran datos en la literatura sobre las características enzimáticas e inmunoquímicas del veneno de *Porthidium nasutum* y debido a sus semejanza en la clínica con los accidentes botrópicos, se determinó realizar estudios de zimografía utilizando los mismos sustratos empleados en el estudio de los venenos del género *Bothrops*.

Gené y colaboradores (1989), estudiaron entre otros aspectos, la neutralización de varios venenos, incluido el de *Porthidium nasutum* (*Bothrops nasuta*), con el suero polivalente producido por el Instituto Clodomiro Picado de Costa Rica, hallando que el plasma hiper-inmune utilizado, neutraliza las actividades tóxicas del veneno de *P. nasutum* en el modelo experimental murino. En 1999, Otero *et al.*, en un reporte clínico, analizaron la correlación entre seguridad y características bioquímicas de dos antivenenos; purificados por diferente vía, producidos por el Instituto Clodomiro Picado de Costa Rica, encontrando una

diferencia significativa entre las reacciones adversas que presentan los pacientes luego de la sueroterapia con algunos de los dos antivenenos analizados.

La capacidad neutralizante de las actividades letal, hemorrágica y coagulante del suero antibotrópico producido por el Instituto Butantan y el antiveneno polivalente fabricado por el Instituto Clodomiro Picado, frente a dieciséis especies diferentes de serpientes encontradas en centro y Sudamérica, donde está incluida *P. nasutum*, fué analizada por Bogarín *et al.* (2000). Los resultados expuestos por este grupo, sugieren que el veneno de *P. nasutum* de Costa Rica, no presenta actividad coagulante en el plasma humano y que sus actividades tóxicas fueron eficazmente neutralizadas por los dos antivenenos estudiados.

Utilizando otros antivenenos, Otero y colaboradores (2002), realizaron pruebas de neutralización para algunas actividades toxicas de los venenos de *P. nasutum* y *B. asper*, con la diferencia que emplearon antivenenos producidos en Colombia, México y Venezuela. En este estudio, se describieron las actividades letal, hemorrágica, edematizante, mionecrosante y hemolítica indirecta del veneno de *P. nasutum* y la eficiente neutralización de sus actividades tóxicas por parte de los antivenenos producidos en Colombia y México y en menor medida del suero venezolano. Finalmente, Schier *et al.* (2003), publicaron un reporte clínico de un accidente producido por el

envenenamiento de *Porthidium nasutum*, que fue neutralizado parcialmente por un antiveneno crotálico polivalente disponible en Estados Unidos.

La realización de este trabajo arrojó resultados importantes, pues no sólo se estudiaron algunas de las propiedades enzimáticas del veneno de una de las serpientes con mayor importancia clínica en el país, sino también, se analizó la reactividad inmunoquímica del veneno frente al suero antibotrópico producido por el Instituto Butantan en Brasil, que podría actuar como herramienta alternativa en la sueroterapia en Colombia.

2. OBJETIVOS

Los objetivos propuestos para desarrollar este trabajo fueron:

- Determinar el perfil electroforético de los componentes proteicos presentes en el veneno de *Porthidium nasutum*.
- Estudiar algunas actividades enzimáticas del veneno de *P. nasutum* por zimografía.
- Verificar el reconocimiento de los componentes del veneno de *P. nasutum* por el suero antibotrópico producido por el Instituto Butantan por ELISA y Western Blotting.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Veneno

El veneno de *Porthidium nasutum*, cedido gentilmente por la Doctora Vitelbina Núñez; directora del Centro de Ofidismo y Escorpionismo de la Universidad de Antioquia, fue obtenido por ordeño manual de 45 ejemplares juveniles y adultos procedentes de diferentes regiones de Antioquia y Chocó en Colombia. Para todos los experimentos fue usado como control positivo el veneno de la serpiente brasilera *Bothrops jararaca*; escojido por presentar una clínica semejante al envenenamiento de *P. nasutum* y por encontrarse dentro del “pool” de inmunización de los caballos con los cuales es producido el suero antibotrópico a ser estudiado. Los venenos se centrifugaron a 3000 g por 20 minutos, el sobrenadante se homogenizó, liofilizó y congeló a -20°C hasta su uso. La concentración de proteínas contenidas en el “pool” del veneno, fue determinada usando ácido bicinconinico (SIGMA®) de acuerdo con Smith *et al.* (1985) usando como patrón albumina de suero bovino (SIGMA®).

3.2 Suero

El antiveneno botrópico (Lote: 0611203), cedido por la “Sección de Plasma Hiperimmune” del Instituto Butantan, fue obtenido después de la inmunización repetitiva de caballos con una mezcla de venenos de *Bothrops jararaca* (50%), *Bothrops alternatus* (12,5%), *Bothrops neuwiedii* (12,5%), *Bothrops jararacussu* (12,5%) y *Bothrops moojeni* (12,5%). Los fragmentos de inmunoglobulina F(ab)₂, fueron purificados por digestión de pepsinas y precipitación con sulfato de amonio (Raw *et al.*, 1991).

3.3 Electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

Las proteínas de los venenos de *Porthidium nasutum* y *Bothrops jararaca*, fueron separadas por electroforesis, según lo descrito por (Laemmli, 1970), en gel de poliacrilamida (bisacrilamida y acrilamida producidas por SIGMA[®]) en presencia de SDS (BIO-RAD), con una concentración de 12,5% (para el gel de corrida) y 4% (para el gel espaciador), utilizando un sistema para electroforesis Dual Gel Caster, Hoefer[®]. El veneno (5 µg), se diluyó en un mismo volumen de tampón de muestra (BIO-RAD) compuesto por TRIS/HCl 125 mM, pH 6,8 al 2,5% (p/v) de SDS, 20% de glicerol, 4 mM EDTA y 0,05% de azul bromofenol. Las muestras fueron hervidas por 3 minutos y aplicadas en el gel, que después de la corrida a 135 V y 30 mA por 2 horas, se tiñó con nitrato de plata (Blum *et al.*, 1987). Los marcadores de masa molecular (Kaleidoscope prestained standards, Bio-Rad, Hercules, CA) utilizados fueron: miosina, β-galactosidasa,

albumina de suero bovino, anhidrasa carbónica, inhibidor de tripsina, lisozima y aprotinina.

3.4 Zimografía

3.4.1 Actividad hialuronidásica

Se incorporaron como sustrato 170 µg/ml de ácido hialurónico (SIGMA®) a un gel con 12,5% de poliacrilamida (Miura *et al.*, 1995; Barbaro *et al.*, 2005). Las muestras de los venenos de *P. nasutum* y *B. jararaca* (20 µg/15 µl), junto al veneno de la araña marrón *Loxosceles laeta* (20 µg/15 µl) que se empleó como control positivo sólo en este ensayo; se diluyeron en tampón de muestra (BIO-RAD) compuesto por TRIS/HCl 125 mM, pH 6,8, 2,5% (p/v) de SDS, 20% de glicerol, 4 mM EDTA y 0,05% de azul bromofenol y el gel se corrió a 30 mA. Después de la electroforesis, el SDS (BIO-RAD) fue removido del gel con una solución de Triton X-100 (Pharmacia LKB Biotechnology) 2,5% durante 40 minutos a temperatura ambiente. El gel se encubó a 37°C por 16 horas, en un tampón de 20 mM Tris pH 7,4 conteniendo 0,5 mM de cloruro de calcio. Las proteínas residuales fueron removidas por la incubación del gel en tampón 20 mM Tris pH 7,4 con 0,5 mM de cloruro de calcio y 0,2 mg/ml de proteasas obtenidas de *Streptomyces griseus* (SIGMA®) durante 150 minutos a 37°C. El gel fue teñido con Alcian Blue (SIGMA®) (0,5%) y decolorado con 25% de etanol y 10% de ácido acético para retirar el exceso de colorante. La visualización de áreas no teñidas en el gel, fue indicativa de la presencia de

actividad enzimática. Los marcadores de masa molecular fueron los mismos que se describieron anteriormente para el ensayo de electroforesis.

3.4.2 Actividad caseinolítica, gelatinolítica y fibrinogenolítica

Las proteínas de los venenos de *Porthidium nasutum* y *Bothrops jararaca*, fueron separadas por electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de SDS (BIO-RAD) y las actividades enzimáticas, se realizaron según lo descrito por Heussen & Dowdle (1980) y Barbaro *et al.* (2005). Al gel de resolución al 12,5%, se le adicionaron 2,0 mg/ml de caseína (MERK®), 2,0 mg/ml de gelatina (SIGMA®) ó 0,5 mg/ml de fibrinógeno (SIGMA®) de acuerdo con la actividad enzimática deseada. Se utilizó un gel espaciador con 4% de poliacrilamida. Los venenos (40 µg/15 µl), se diluyeron en tampón de muestra (BIO-RAD) que contiene TRIS/HCl 125 mM, pH 6,8, 2,5% (p/v) de SDS, 20% de glicerol, 4 mM EDTA y 0,05% de azul bromofenol. El gel se corrió a 30 mA hasta el término de la electroforesis. A continuación, el gel se lavó dos veces por 20 minutos con Triton X-100 (Pharmacia LKB Biotechnology) 2,5% para remover el SDS y posteriormente, se incubó a 37°C por 16 horas en una solución de Tris 20 mM con cloruro de calcio 0,5 mM. La coloración del gel se realizó con Coomassie blue (SIGMA®) y decoloró con una solución de 44% etanol (Synth) y 10% de ácido acético (MERCK) para retirar el exceso de colorante. La visualización de áreas no coloreadas en el gel fue indicativa de la presencia de actividad

enzimática. Los marcadores de masa molecular fueron los mismos descritos en el numeral 3.3.

3.5 Inmunoensayo (ELISA)

Siguiendo el protocolo estandarizado en el Laboratorio de Inmunopatología del Instituto Butantán para estudio de venenos botrópicos, la placa de poliestireno de 96 pozos y fondo plano (Nunc-Immuno™), fue sensibilizada (100 µl/pozo) con una solución de los venenos de *Porthidium nasutum* y *Bothrops jararaca* (10 µg/ml) e incubada durante 18 horas a 4°C en cámara húmeda. Después de enjuagar con tampón de lavada que contiene PBS (BIO-RAD) pH 7,4 y Tween 20 (SIGMA®) al 0,05%, se agregaron 200 µl de solución bloqueadora compuesta por tampón carbonato pH 9,6 con 3% de albumina de suero bovino (INIAB) en todos los pozos y se incubó la placa por dos horas a 37°C dentro de cámara húmeda. Se hizo una segunda lavada igual que la anterior y se aplicaron diluciones seriadas (comenzando con 1:4000) del suero antibotrópico en tampón de incubación (PBS pH 7,4, 1% BSA y 0,05% de Tween 20). Se incubó por 1 hora a 37°C. Después de un nuevo lavado, se agregó el conjugado inmuno-enzimático marcado con peroxidasa, producido por el laboratorio SIGMA® (anti-IgG de caballo), diluido en tampón de incubación y nuevamente se incubó la placa por 1 hora a la misma temperatura que las

anteriores. Después de un último lavado, se agregó el sustrato cromógeno (OPD y H₂O₂) diluido en tampón citrato pH 5,0 (100 µl/pozo) y se permitió que ocurriera la reacción durante 5 minutos aproximadamente. Posteriormente, la reacción se detuvo con H₂SO₄ (MERCK) al 30% (50 µl/pozo). La absorbancia fue leída a una densidad óptica de 492 nm en un lector de ELISA Multiskan plus.

3.6 Western Blotting

Se realizó la electroforesis como está descrito anteriormente y enseguida, se efectuó la transferencia de las proteínas a 130 V y 385 mA por 2 horas desde el gel de poliacrilamida a la membrana de nitrocelulosa (BIO-RAD), en una cámara Te Series Transphor electrophoresis Unit de Hoefer[®] siguiendo el protocolo propuesto por Towbin *et al.* (1979). La membrana, se dejó “overnight” a 4°C sobre agitación en solución bloqueadora (leche en polvo descremada 5% y Tris-salina). Al día siguiente, se adicionó el suero antibotrópico en concentraciones 1:250 y 1:2500. Luego se incubó sobre agitación por 2 horas a temperatura ambiente. Después de lavar con Tris-salina tres veces por cinco minutos cada una, se aplicó el conjugado inmunoenzimático en solución bloqueadora y se incubó por 2 horas más a temperatura ambiente sobre agitación. Luego de un último lavado, se agregó el sustrato cromógeno 4-cloro-1-naftol (MERCK). La reacción se detuvo utilizando agua corriente. Los marcadores de masa molecular utilizados fueron los mismos que se describieron anteriormente.

4. RESULTADOS

4.1 Análisis de los componentes del veneno de *Porthidium nasutum* por SDS-PAGE

Con el objetivo de analizar el perfil electroforético del veneno de *Porthidium nasutum*, fue utilizada la técnica de electroforesis en gel de poliacrilamida (12,5%), en presencia de SDS y coloración por nitrato de plata.

La figura 4, muestra el perfil electroforético de los venenos de *P. nasutum* (Pn) y *B. jararaca* (Bj). Por lo menos 12 componentes, fueron revelados en los dos venenos. El veneno de *P. nasutum*, presentó bandas fuertemente coloreadas alrededor de 130, 80, y 50 kDa. Componentes localizados por debajo de 32 kDa, estuvieron presentes tanto en el veneno de *P. nasutum* como en el de *B. jararaca*, que presentó bandas mayoritarias con masa molecular aproximada de 125, 85 y 70 kDa. El veneno de *P. nasutum* presenta una única banda con

masa molecular cercana a 50 kDa, que no está presente en el veneno de *B. jararaca*, el cual muestra una fuerte banda en la región de 70 kDa. Diversas bandas teñidas débilmente, fueron observadas en los dos venenos.

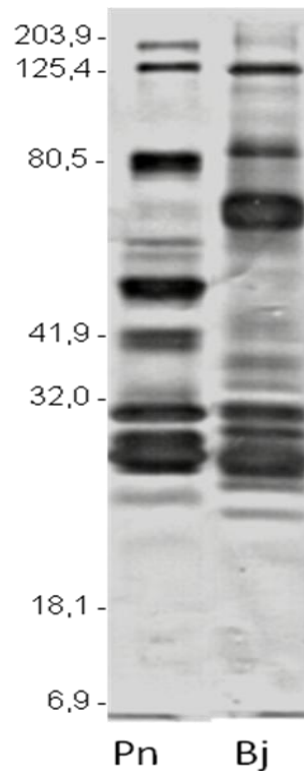


Figura 4 - Perfil electroforético de los venenos de *Porthidium nasutum* (Pn) y *Bothrops jararaca* (Bj), después del análisis por SDS-PAGE y coloración por nitrato de plata. Los números a la izquierda indican la posición de los marcadores de masa molecular que corresponden a: miosina (203,9 kDa), β -

galactosidasa (125,4 kDa), albumina de suero bovino (80,5 kDa), anhidrasa carbónica (41,9 kDa), inhibidor de tripsina (32,0 kDa), lisozima (18,1 kDa) y aprotinina (6,9 kDa).

4.2 Estudio de las actividades enzimáticas del veneno de *Porthidium nasutum* por zimografía

4.2.1 Actividad hialuronidásica

Para la determinación de esta actividad, los venenos de *Porthidium nasutum* y *Bothrops jararaca*, fueron sometidos a electroforesis en gel de poliacrilamida 12,5%, teniendo ácido hialurónico como sustrato.

La actividad hialuronidásica no estuvo presente en el veneno de *P. nasutum* ni en el control (*B. jararaca*), como lo muestra la figura 5; la única banda clara que se observa alrededor de 40 kDa, es propia del veneno de la araña marrón, *Loxosceles laeta* que fue usado como control positivo en este experimento.

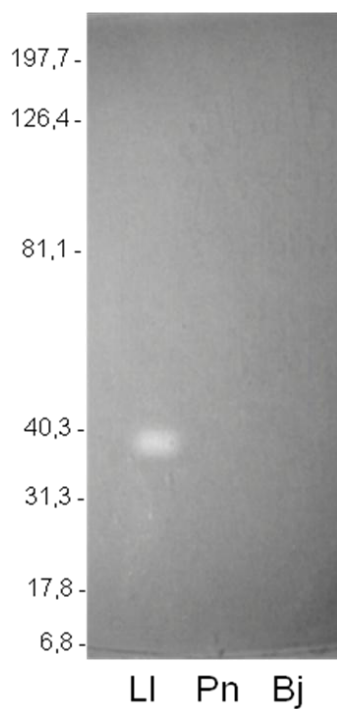


Figura 5 - Zimografía en gel de poliacrilamida (12,5%) de los venenos (20 µg) de *Porthidium nasutum* (Pn), *Bothrops jararaca* (Bj) y *Loxosceles laeta* (LI) teniendo ácido hialurónico (170 µg/ml) como sustrato y coloración por Alcian

blue. El veneno de la araña marrón; *Loxosceles laeta* (LI), fue usado como control positivo. Las áreas claras del gel indican la ocurrencia de actividad enzimática. Los números a la izquierda, indican la posición de los marcadores de masa molecular que corresponden a: miosina (197,7 kDa), β -galactosidasa (126,4 kDa), albumina de suero bovino (81,1 kDa), anhidrasa carbónica (40,3 kDa), inhibidor de tripsina (31,3 kDa), lisozima (17,1 kDa) y aprotinina (6,8 kDa).

4.2.2 Análisis de las actividades caseinolítica, gelatinolítica y fibrinogenolítica

A fin de caracterizar algunas propiedades enzimáticas relacionadas al mecanismo de acción del veneno de *Porthidium nasutum*, sobre proteínas, componentes de la matriz extracelular ó factores de coagulación sanguínea, fueron adicionados a los geles de poliacrilamida (12,5%), substratos como; gelatina, caseína ó fibrinógeno.

4.2.2.1 Actividad caseinolítica

En la zimografía representada por la Figura 6, es posible observar que el veneno de *P. nasutum*, presenta poca actividad caseinolítica, mostrando una única banda débil al rededor de 35 kDa. Por otro lado, el veneno de *Bothrops jararaca* tuvo una fuerte actividad proteolítica sobre la caseína en un rango de 190 – 26 kDa, con dos bandas mayoritarias situadas en las regiones de 110 – 70 y 60 – 26 kDa.

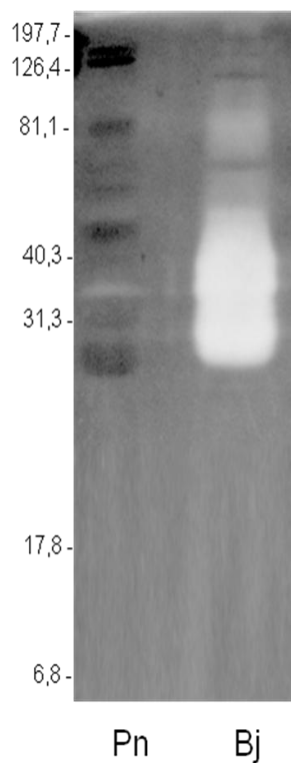


Figura 6 - Zimografía en gel de poliacrilamida (12,5%) de los venenos (40 µg) de *Porthidium nasutum* (Pn) y *Bothrops jararaca* (Bj), teniendo caseína (2

mg/ml) como sustrato y coloración por Coomassie blue. Las áreas claras del gel indican la ocurrencia de actividad enzimática. Los números a la izquierda, indican la posición de los marcadores de masa molecular que corresponden a: miosina (197,7 kDa), β -galactosidasa (126,4 kDa), albumina de suero bovino (81,1 kDa), anhidrasa carbónica (40,3 kDa), inhibidor de tripsina (31,3 kDa), lisozima (17,1 kDa) y aprotinina (6,8 kDa).

4.2.2.2 Actividad gelatinolítica

Por zimografía se observa que el veneno de *P. nasutum* presenta baja actividad degradativa sobre el sustrato de gelatina (Figura 7), observándose tres bandas débiles con masa molecular de 50, 38 y 32 kDa. De otro lado, en la muestra de *B. jararaca* se tienen bandas fuertes y definidas en tres rangos de masa molecular diferentes, 120 – 75, 48 – 38 y 35 – 26 kDa.

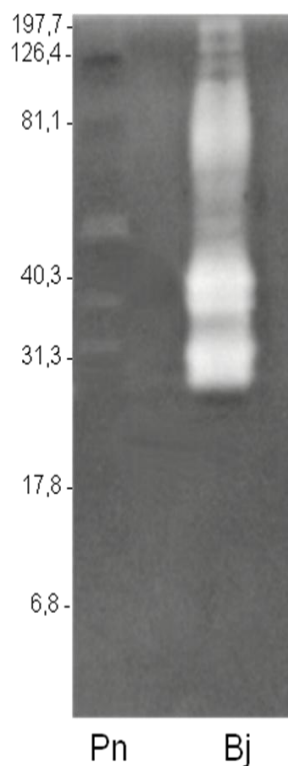


Figura 7 - Zimografía en gel de poliacrilamida (12,5%) de los venenos (40 µg) de *Porthidium nasutum* (Pn) y *Bothrops jararaca* (Bj), teniendo gelatina (2 mg/ml) como sustrato y coloración por Coomassie blue. Las áreas claras del gel indican la ocurrencia de actividad enzimática. Los números a la izquierda, indican la posición de los marcadores de masa molecular que fueron descritos anteriormente.

4.2.2.3 Actividad fibrinogenolítica

En la zimografía representada por la figura 8, se observa que el veneno de *P. nasutum* no presenta actividad fibrinogenolítica. Entre tanto, el veneno de *B. jararaca*, presenta enzimas capaces de degradar el sustrato de fibrinógeno con masa molecular entre 45 y 24 kDa.

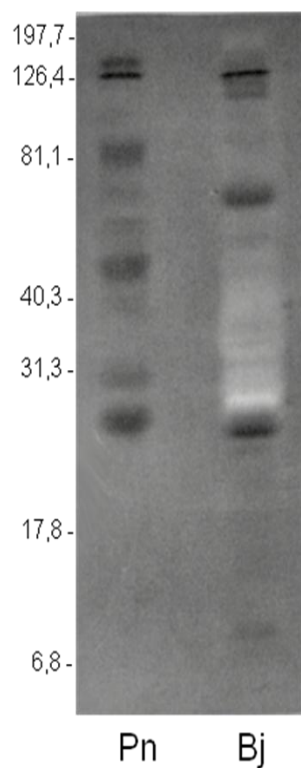


Figura 8 - Zimografía en gel de poliacrilamida (12,5%) de los venenos (40 μ g) de *Porthidium nasutum* (Pn) y *Bothrops jararaca* (Bj), teniendo fibrinógeno (0,5 mg/ml) como sustrato y coloración por Coomassie blue. Las áreas claras del gel indican la ocurrencia de actividad enzimática. Los números a la izquierda, indican la posición de los marcadores de masa molecular que se describieron con anterioridad.

4.3 Reactividad cruzada ente los venenos de *Porthidium nasutum* y *Bothrops jararaca* revelada por ELISA

En este experimento, fue realizado el estudio comparativo de la reactividad antigénica de los venenos de *Porthidium nasutum* y *Bothrops jararaca*, usando la técnica ELISA.

Como lo muestra la figura 9, el veneno de la serpiente *Porthidium nasutum*, fue reconocido fuertemente por el antiveneno botrópico producido por el Instituto Butantan, sugiriendo la existencia de reactividad antigénica cruzada entre este veneno y el de *B. jararaca*. El título del suero antibotrópico frente al veneno de *P. nasutum* (título 512.000), no fue significativamente menor (cuando la diferencia encima de dos diluciones fue considerada como significativa), en relación al veneno homólogo (*B. jararaca*) con un título de anticuerpos igual a 1.024.000.

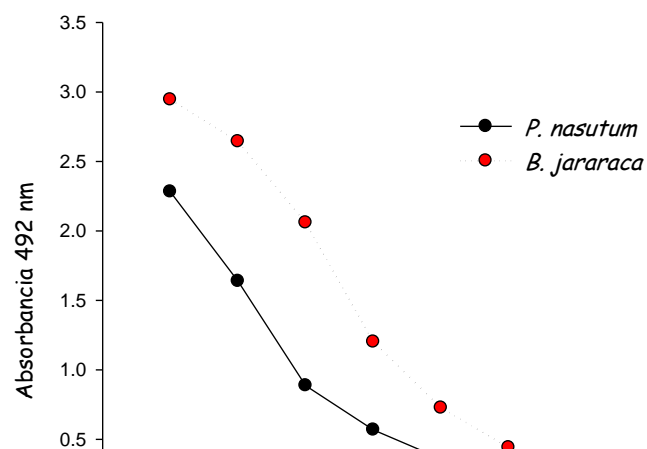


Figura 9 - Reactividad antigénica cruzada entre los componentes de los venenos de *Porthidium nasutum* y *Bothrops jararaca*, revelados por ELISA usando el suero antibotrópico producido por el Instituto Butantan, donde se observa el título de anticuerpos de la dilución máxima del suero frente al veneno homólogo y heterólogo en una lectura de absorbancia de 492 nm mayor que 0,200.

4.4 Reactividad antigénica cruzada entre los venenos de *Porthidium nasutum* y *Bothrops jararaca* revelada por Western blotting

La figura 10, muestra el resultado del “immunoblotting” de los venenos de *Porthidium nasutum* y *Bothrops jararaca*, revelado con el suero antibotrópico.

Componentes proteicos del veneno de *Porthidium nasutum*, fueron reconocidos por el antiveneno botrópico. Los elementos de masa molecular alrededor de 70,

40 y 30 kDa, fueron fuertemente reconocidos y en menor medida los componentes principalmente situados en la región de 125 kDa.

El suero antibotrópico producido por el Instituto Butantan, reconoció fuertemente los componentes del veneno de *B. jararaca* como era de esperarse, pues este es usado en la inmunización repetitiva de los caballos. Los componentes revelados se situaron en el rango de 150 a 15 kDa, pero la reacción fue tan intensa que aún utilizando la mayor dilución del suero 1:2500, fue imposible individualizar algunos de los componentes del veneno.

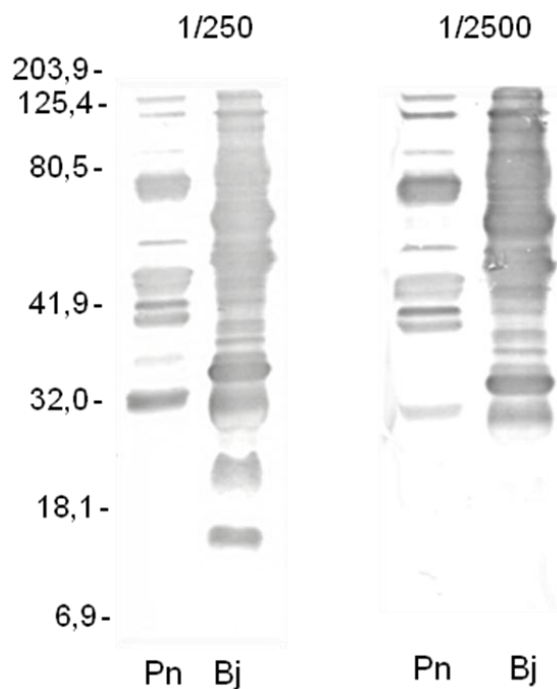


Figura 10 - Antígenos de los venenos de *Porthidium nasutum* (Pn) y *Bothrops jararaca* (Bj) fraccionados por SDS-PAGE y evidenciados por Western Blotting, utilizando el suero antibotrópico producido por el Instituto Butantan en una dilución de 1:250 y 1:2500. Los números a la izquierda indican la posición de los marcadores de masa molecular que corresponden a: miosina (203,9 kDa), β -galactosidasa (125,4 kDa), albumina de suero bovino (80,5 kDa), anhidrasa carbónica (41,9 kDa), inhibidor de tripsina (32,0 kDa), lisozima (18,1 kDa) y aprotinina (6,9 kDa).

5. DISCUSIÓN

El envenenamiento causado por las serpientes *Porthidium nasutum* y *Bothrops jararaca*, se caracteriza por presentar síntomas locales como edema, hemorragia y necrosis (Kamiguti *et al.*, 1996; Teibler *et al.*, 1999; Gutiérrez & Rucavado, 2000; Otero *et al.*, 2002; Gutiérrez & Lomonte, 2003) y algunos síntomas sistémicos como hemorragia sistémica, hematuria e hipotensión (Markland, 1998; Rathanath *et al.*, 1999; White, 2005).

Hace algún tiempo, la serpiente *Porthidium nasutum* era clasificada taxonómicamente dentro del género *Bothrops*. Sin embargo, por poseer diferencias morfológicas con el resto de las especies de este grupo, fue reclasificada dentro del género *Porthidium* (Schier *et al.*, 2003). Con el presente trabajo se demuestra que, además de la morfología, existen componentes en el veneno de la *P. nasutum* diferentes a los encontrados en un típico veneno botrópico como el de *Bothrops jararaca*.

Acorde a lo descrito por Anderson *et al.* (1993), en este estudio se observó que, el veneno de *P. nasutum* presenta componentes de alta, media y baja masa molecular. *P. nasutum* de Colombia y *B. jararaca* del Brasil no pertenecen al mismo género ni zona geográfica, más los venenos poseen algunas proteínas con masa molecular semejante por debajo de los 32 kDa. Componentes clínicamente importantes se han encontrado en venenos de otras especies de *Bothrops* dentro de la misma región de masa molecular, como es el caso de metaloproteinasas con actividad fibrinolítica y hemorrágica,

proteínas con actividad coagulante, fosfolipasas A₂ (Theakston & Kamiguti, 2002) y miotoxinas (Gutiérrez & Lomonte, 2003), sugiriendo entonces la posible existencia de estos componentes dentro del veneno de *P. nasutum*, que explicarían el severo daño local presentado por los pacientes picados por esta serpiente.

La sugestión anterior, se refuerza cuando por zimografía se detectó que el veneno de *P. nasutum* no presenta degradación enzimática de fibrinógeno ni de ácido hialurónico y muy poca actividad gelatinolítica y caseinolítica, indicativo de actividad residual inespecífica de enzimas que poseen esta masa molecular. Se puede pensar entonces que, el veneno de *P. nasutum* probablemente posee dentro de su composición, elementos como metaloproteinasas y fosfolipasas A₂, que degradan otros sustratos de la matriz extracelular y células musculares (Moura-da-Silva *et al.*, 1997; Gutiérrez, 1995; Gutiérrez & Lomonte, 1995; Six & Dennis, 2000; Gutiérrez & Rucavado, 2000), presentes en la víctima y que producen la grave sintomatología observada en los pacientes picados por esta serpiente.

Por otro lado, se tiene la muestra de *B. jararaca* que sí presentó fuerte actividad enzimática sobre los sustratos de gelatina, caseína y fibrinógeno por lo que se deduce que, a pesar de presentar signos clínicos de envenenamiento

similares, los mecanismos de acción de los venenos de *P. nasutum* y *B. jararaca*, son diferentes.

Al comparar los estudios hechos por zimografía del veneno de la *P. nasutum*, con los resultados obtenidos en otros venenos botrópicos como el de la *Bothrops insularis* (Lira *et al.*, 2007), se corroboran las diferencias en el mecanismo de acción que siguen los venenos, pues la *B. insularis* al igual que *Bothrops jararaca*, presenta fuerte actividad enzimática sobre los sustratos de gelatina, caseína y fibrinógeno, lo que no acontece en el caso de *P. nasutum*.

A través de la técnica ELISA, fue posible verificar que aún teniendo algunas diferencias antes nombradas, los venenos de *P. nasutum* y *B. jararaca*, presentaron reactividad antigénica cruzada cuando fue utilizado el suero antibotrópico producido por el Instituto Butantan. Estos datos se corroboraron por medio de Western Blotting, donde se observó que los anticuerpos presentes en el antiveneno botrópico, reconocen fuertemente los componentes del veneno de *Porthidium nasutum*, aún en la dilución mas alta del suero (1:2500).

Tomando en cuenta que *P. nasutum* pertenece a otro género, el presente estudio corrobora lo descrito por Ferreira *et al.*, (1992) y Lira *et al.*, (2007), quienes muestran la existencia de reactividad antigénica cruzada por ELISA y Western Blotting, utilizando el suero antibotrópico del Instituto Butantan con

otros venenos botrópicos diferentes a los encontrados en el pool de inmunización de los caballos. Estos resultados sugieren que el suero antibotrópico producido en Brasil, puede neutralizar algunas actividades tóxicas del veneno de *Porthidium nasutum* de Colombia.

Siendo la serpiente *Porthidium nasutum* una especie de gran importancia médica en Colombia, se deben realizar otros estudios que ayuden a revelar los mecanismos de acción del veneno, así como el análisis de diferentes antivenenos que puedan reconocer los componentes del veneno y neutralizar sus actividades tóxicas para tener a disposición más herramientas útiles al momento de encarar un accidente ofídico como el causado por la *Porthidium nasutum* en nuestro país.

CONCLUSIONES

Este trabajo sugiere que:

- El perfil electroforético y el análisis por zimografía, no sólo ayudan a aumentar el conocimiento sobre los componentes y las propiedades enzimáticas inherentes de los venenos, sino que también pueden ser herramientas útiles al momento de clasificar un individuo ó grupo de individuos taxonómicamente.
- A pesar de las semejanzas encontradas en la clínica del envenenamiento, los mecanismos de acción enzimática del veneno de *Porthidium nasutum*, son diferentes a los encontrados en un típico veneno botrópico como el de la serpiente *Bothrops jararaca*.
- El suero producido por el Instituto Butantan, además de poseer anticuerpos que reconocen componentes de los venenos botrópicos, es capaz de identificar también los antígenos presentes en especies pertenecientes a otro grupo taxonómico y zona geográfica, como se observó con la serpiente *P. nasutum* de Colombia.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Amaral, C.F.S., Dourado, H.V., Kouyoumdjian, J.I., Cardoso, J.L.C., Campos, J.A., Azevedo-Marques, M.M., Lopes, P.F.A. 1991. Manual de diagnóstico e tratamento de acidentes ofídicos. Ministério de Saúde, Brasil, pp 53.

Anderson, S.G., Gutiérrez, J.M., Ownby, L. 1993. Comparison of the immunogenicity and antigenic composition of ten Central American snake venoms. *Toxicon* 38, pp 1051-1059.

Barbaro, K.C., Knysak, I., Martins, R., Hogan, C., Winkel, K. 2005. Enzymatic characterization, antigenic cross-reactivity and neutralization of dermonecrotic activity of five *Loxosceles* spider venoms of medical importance in the Americas. *Toxicon* 45, pp 489-499.

Blum, H., Beier, H., Gross, H.J. 1987. Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis* 8, pp 93-95.

Bocourt, F. 1868. *Bothrops nasuta*. *Ann. Sci. Nat., Paris (Zool.)* 10, pp 201-202.

Bogarín, G., Morais, J.F., Yamaguchi, I.K., Stephano, M.A., Marcelino, J.R., Nishikawa, A.K., Guidolin, R., Rojas, G., Hlgashi, H.G., Gutierrez, J.M. 2000.

Neutralization of crotaline snake venoms from Central and South America by antivenoms produced in Brazil and Costa Rica. *Toxicon* 38, pp 1429-1441.

Bon, C. 1996. Serum therapy was discovered 100 years ago. *Envenomings and their treatments*. First ed. Lyon: Editions Fondation Marcel Merieux, pp 3-9.

Boquet, P. 1992. History of Snake Venom Research. In: Chen-Yuan, L. *Snake Venoms Handbook of Experimental Pharmacology*. Board G.V.R Born Cambridge, Memphis, 52, pp 3-14.

Calvete, J.J., Escolano, J., Sanz, L. 2007. Snake venomics of *Bitis* species reveals large intragenus venom toxin composition variation: application to taxonomy of congeneric taxa. *J. Proteome Res.* 6, pp 2732-2745.

Campbell, J.A. 1998. *Amphibians and reptiles of Northern Guatemala, the Yucatán and Belize*. University of Oklahoma Press, pp 380.

Campbell, J.A., Lamar, W.W. 2004. *The venomous reptiles of the western hemisphere*. Ithaca, Comstock Publ. Assoc. Cornell Univ. Press, pp 870.

Chippaux, J.P. 1998. Snake-bites: appraisal of the global situation. *Bull World Health Organ.* 75, pp 515-524.

Cisneros-Heredia, D.F. 2004. *Porthidium nasutum*. Geographic distribution. Herp. Rev. 35, pp 293.

Clissa, P., Laing, G., Theakston, R., Mota, I., Moura da-Silva, A. 2001. The effect of jararhagin, a metalloproteinase from *Bothrops jararaca* venom, on proinflammatory cytokines released by murine peritoneal adherent cells. Toxicon 39, pp 1567-1573.

Cope, E.D. 1876. Report on the reptiles brought by Professor James Orton from the middle and upper Amazon, and Western Peru. J. Acad. Nat. Sci. Philadelphia 8, pp 159-188.

Da Silva, N.M., Arruda, E.Z., Murakami, Y.L., Moraes, R.A., El-Kik, C.Z., Tomaz, M.A., Fernandes, F.F., Oliveira, C.Z., Soares, A.M., Giglio, J.R., Melo, P.A. 2007. Evaluation of three Brazilian antivenom ability to antagonize mionecrosis and haemorrhage induced by *Bothrops* snake venoms in mouse model. Toxicon 50, pp 196-205.

De Freitas, J.C. 1997. Venenos e peçonha nomenclatura em toxicologia. In: Nicolella, A., Barros, E., Torres, J.B., Marques, M.G. Acidentes com animais peçonhentos consulta rápida. Ministério de Saúde do Brasil, pp 31-36.

De Roodt, A.R., Estevez-Ramírez, J., Litwin, S., Magaña, P., Olivera, A., Alagón, A. 2007. Toxicity of two North American *Loxosceles* (brown recluse spiders) venoms and their neutralization by antivenoms. *Clin. Toxicol.* 45, pp 678-687.

Fan, H.W., Cardoso, J.L. 1995. Clinical toxicology of snake bites in South America. In: Meier, J., White, J. (Eds.), *Handbook of clinical toxicology of animal venoms and poisons*. CRC Press, Boca Raton, Florida, pp 667-688.

Ferreira, M.L., Silva, A.M.M., Mota, I. 1992. Neutralization of different activities of venoms from nine species of *Bothrops* snakes by *Bothrops jararaca* antivenom. *Toxicon* 30, pp 1591-1602.

Francischetti, I.M., Castro, H.C., Zingali, R.B., Carlini, C.R., Guimarães, J.A. 1998. *Bothrops* sp. Snake venoms: comparison of some biochemical and physicochemical properties and interference in platelet functions. *Comp. Biochem. Physiol. C. Pharmacol. Toxicol. Endocrinol.* 119, pp 21-29.

França, F.O.S., Málaque, C.M.S. 2003. Acidente botrópico In: Cardoso, J.L.C., França, F.O.S, Wen, F.H., Maláque, C.M.S., Haddad Jr., V. *Animais peçonhentos no Brasil. Biologia, Clínica e Terapêutica dos Acidentes*. Sarvier, pp 72-86.

Fujimura, Y., Ikeda, Y., Miura, S., Yoshida, E., Shima, H., Nishida, M., Suzuki, M., Titán, K., Taniuchi, Y., Kawasaki, T. 1995. Isolation and characterization of jararaca GPIb-BP, a snake venom antagonist specific to platelet glycoprotein Ib. *Thromb Haemost* 74, pp 743-750.

Fuly, A., Machado, O., Alves, E., Carlini, C. 1997. Mechanism of inhibitory action on platelet activation of a phospholipase A_2 isolated from *Lachesis muta* (Bushmaster) snake venom. *Thromb Haemost* 78, pp 1372-1380.

Gené, J.A., Roy, A., Rojas, G., Gutiérrez, J.M., Cerdas, L. 1989. Comparative study on coagulant, defibrinating, fibrinolytic and fibrinogenolytic activities of Costa Rican crotaline snake venoms and their neutralization by a polyvalent antivenoms. *Toxicon* 27, pp 841-848.

Gutiérrez, J.M. 1995. Clinical toxicology of snakebite in Central America. In: Meier, J., White, J. (Eds.), *Handbook of Clinical Toxicology of Animal Venoms and Poisons*. CRC Press, Boca Raton, Florida, pp 645-665.

Gutiérrez, J.M., Lomonte, B. 1995. Phospholipase A_2 myotoxins from *Bothrops* snake venoms. *Toxicon* 33, pp 1405-1424.

Gutiérrez, J.M.; Rucavado, A. 2000. Snake venom metalloproteinase: their role in the pathogenesis of local tissue damage. *Biochimie* 82, pp 841–850.

Gutiérrez J.M., Lomonte, B. 2003. Efectos locales en el envenenamiento Ofídico en América Latina. In: Cardoso, J.L.C., França, F.O.S, Wen, F.H., Maláque, C.M.S., Haddad Jr., V. *Animais peçonhentos no Brasil. Biologia, Clínica e Terapêutica dos Acidentes*. Sarvier, pp 310-323.

Gutiérrez, J.M., Theakston, R.D.G., Warell, D.A. 2006. Confronting the neglected problem of snake bite envenoming: the need for a global partnership. *Plos. Med.* 3, pp 727-731.

Heussen, C., Dowdle, E.B., 1980. Electrophoretic analysis of plasminogen in polyacrylamide gels containing sodium dodecyl sulfate and copolymerized substrates. *Anal. Biochem.* 102, pp 196-202.

Hung, C.C., Chiou, S.H. 2001. Fibrinogenolytic proteases isolated from the snake venom of Taiwan habu: serine proteases with Kallikrein – like and angiotensin – degrading activities. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 281, pp 1012-1018.

Kamiguti, A.S., HAY, C.R.M., Theakston, R.G.D., Zuzel, M. 1996. Insights into the mechanism of haemorrhage caused by snake venom metalloproteinases. *Toxicon* 34, pp 627–642.

Kini, M., Evans, H. 1990. Effects of snake venom proteins on blood platelet. *Toxicon* 28, pp 1387-1422.

Kochar, D.K., Tanwar, P.D., Norris, R.L., Sabir, M., Nayak, K.C., Agrawal, T.D., Purohit, V.P., Kochar, A., Simpson, I.D. 2007. Rediscovery of severe saw-scaled viper (*Echis sochureki*) envenoming in the Thar desert region of Rajasthan, India. *Wildness Environ. Med.* 18, pp 75-85.

Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, pp 680-685.

Lira, M.S., Furtado, M.F., Martins, L.M., Lopes-Ferreira, M., Santoro, M.L., Barbaro, K.C. 2007. Enzymatic and immunochemical characterization of *Bothrops insularis* venom and its neutralization by polyspecific *Bothrops* antivenom. *Toxicon* 49, pp 982-94.

Machado, L.F., Laugesen, S., Botelho, E.D., Ricart, C.A., Fontes, W., Barbaro, K.C., Roepstorff, P., Sousa, M.V. 2005. Proteome analysis of brown spider venom: identification of loxnecrogin isoforms in *Loxosceles gaucho* venom. *Proteomics*. 5, pp 2167-2176.

Markland, F. 1998. Review paper, snake venoms and the haemostatic system. *Toxicon* 36, pp 1749-1799.

Mebis, D. 2002. *Venomous and poisonous animals: a handbook for biologists, toxicologists, physicians and pharmacists*. CRC Press, New York, pp 1-18.

Miura, R.O., Yamagata, S., Miura, Y., Harada, T., Yamagata, T. 1995. Analysis of glycosaminoglycan-degrading enzymes by substrate gel electrophoresis (Zymography). *Anal. Biochem.* 225, pp 333-340.

Moura-da-Silva, A.M., Theakston, R.D.G., Crampton, J.M. 1997. Molecular evolution of phospholipase A₂s and metalloproteinase/disintegrins from venoms of vipers. *Symp. Zool. Soc. Lond.* 70, pp 173-187.

Otero, R., Osorio, R., Valderrama, R., Giraldo, C.A. 1992a. Efectos farmacológicos y enzimáticos de los venenos de serpientes de Antioquia y Chocó (Colombia). *Toxicon* 30, pp 611-620.

Otero, R., Tobón, G.S., Gómez, L.F., Osorio, R.G., Valderrama, R., Hoyos, D. 1992b. Accidente ofídico en Antioquia y Chocó. Aspectos clínicos y epidemiológicos (marzo de 1989 - febrero de 1990) *Acta Méd. Colomb.* 17, pp 229- 249.

Otero, R., Gutiérrez, J.M., Nuñez, V., Robles, A., Estrada, R., Segura, M. 1996. A randomized double blind clinical trial of two antivenoms in patients bitten by *Bothrops atrox* in Colombia. Trans. Soc. Trop. Med. Hyg. 90, pp 696-700.

Otero-Patiño, R., Cardoso, J.L.C., Higashi, H.G., Nuñez, V., Díaz, A., Toro, M.F., García, M.E., Sierra, A., García, L.F., Moreno, A.M., Medina, M.C., Castaneda, N., Silva-Díaz, J.F., Murcia, M., Cárdenas, S.Y., Dias da Silva, W.D., The Regional Group on Antivenenom Therapy Reserch (REGATHER). 1998. A randomized, blinded, comparative trial of one pepsin-digested and two whole IgG antivenoms of *Bothrops* snakes bites in Urabá, Colombia. Am. J. Trop. Med. Hyg. 58, pp 183-189.

Otero, R., Gutiérrez, J.M., Rojas, G., Núñez, V., Díaz, A., Miranda, E., Uribe, A.F., Silva, J.F., Ospina, J.G., Medina, Y., Toro, M.F., García, M. E., León, G., García, M., Lizano, S., De la Torre, J., Márquez, J., Mena, Y., González, N., Arenas, L.C., Puzón, A., Blanco, N., Sierra, A., Espinal, M.E., Arboleda, M., Jiménez, J.C., Ramírez, P., Díaz, M., Guzman, M.C., Barros, J., Henao, S., Ramírez, A., Macea, U., Lozano, R. 1999. A randomized blinded clinical trial of two antivenoms, prepared by caprylic acid or ammonium sulphate fractionation of IgG, in *Bothrops* and *Porthidium* snake bites in Colombia: correlation between safety and biochemical characteristics of antivenoms. Toxicon 37, pp 895-908.

Otero, R., Nuñez, V., Baraona, J., Díaz, A., Saldarriaga, M. 2002. Características bioquímicas y capacidad neutralizante de 4 antivenenos polivalentes frente a los efectos farmacológicos y enzimáticos del veneno de *Bothrops asper* y *Porthidium nasutum* de Antioquia y Chocó. IATRIA 15, pp 5-15.

Picolo, G., Chacur, M., Gutiérrez, J.M., Teixeira, C.F., Cury, Y. 2002. Evaluation of antivenoms in the neutralization of hyperalgesia and edema induced by *Bothrops jararaca* and *Bothrops asper* snake venoms. Braz. J. Med. Biol. Res. 35, pp 1221-1228.

Porras, L., Mc Cranie, J.R., Wilson, L.D. 1981. The systematics and distribution of the Hognose Viper *Bothrops nasuta* (Serpientes: Viperidae). Occ. Pap. Tulane Univ. Mus. Nat. Hist. 22, 85-107.

Posada-Arango, A. 1889. *Thanatophis*. Bull. Soc. Zool. France 14, pp 343.

Rathanath, H., Parthasarathi, M., Subhadeep, S., Kunai, B. 1999. Snake venom hemorrhagins. Critical reviews in Toxicology 29, pp 1-19.

Raw, L., Guidolin, R., Higashi, H.G., Kelen, E.M.A. 1991. Antivenins in Brazil. In: Handbook of Natural Toxins, Reptile Venoms and Toxins. Tu, A.T. (Ed) 5, pp 557-581.

Richardson, W.H., Goto, C.S., Gutglass, D.J., Williams, S.R., Clark, R.F. 2007. Rattlesnake envenomation with neurotoxicity refractory treatment with crotaline Fab antivenom. Clin. Toxicol. 45, pp 472-475.

Russel, F.E. 2001. Toxic effects of terrestrial animal venoms and poisons. In: Klaassen, C.D. Casarett and Doull's toxicology: The basic science of poisons. 6^a edición. McGraw-Hill Co. Inc., New York, pp 945-964.

Santoro, M.L., Sano-Martins, I.S. 2003. Distúrbios hemostáticos em envenenamentos por animais peçonhentos no Brasil. In: Cardoso, J.L.C., França, F.O.S, Wen, F.H., Málaque, C.M.S., Haddad Jr., V. Animais peçonhentos no Brasil biologia, clínica e terapêutica dos acidentes. Sarvier, pp 289-309.

Scaborough, R., Rose, J., Naughton, M., Phillips, D., Nannizzi, N., Arften, A., Campbell, A., Charon, I. 1993. Characterization of the integrin specificities of desintegrins isolated from american pit viper venoms. J. Biol. Chem. 268, pp 1058-1065.

Schätti, B., Kramer, E. 1993. Ecuatorianische Grubenottern der Gattungen *Bothriechis*, *Bothrops* and *Porthidium* (Serpentes: Viperidae). *Revue Suisse Zool.* 100, pp 235-278.

Schier, J.G., Wiener, S.W., Touger, M., Nelson, L.S., Hoffman, R.S. 2003. Efficacy of crotalidae polyvalent antivenin for the treatment of hognosed viper (*Porthidium nasutum*) envenomation. *Ann. Emerg. Med.* 41, pp 391-395.

Six, D.A., Dennis, E.A. 2000. The expanding superfamily of phospholipase A₂ enzymes: classification and characterization. *Biochim. Biophys.* 1488, pp 1-19.

Smith, P.K., Krohn R.I., Hermanson G.T., Mallia A.K., Gartner F.H., Provenzano M.D., Fujimoto E.K., Goeke N.M., Olson B.J., Klenk D.C. 1985. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.* 150, pp 76-85.

Teibler, P., Acosta de Pérez, O., Maruñak, S., Ruiz, R., Koscinczuk, P., Sanchez Negrete, M., Mussart de Coppo, N. 1999. Lesiones locales y sistémicas inducidas por veneno de *Bothrops alternatus* (víbora de la cruz) de Argentina. *Acta Toxicol. Argent.* 7, pp 7–10.

Theakston, R.D.G., Kamiguti, A.S. 2002. A list of animal toxins and some other natural products with biological activity. *Toxicon* 40, pp 579-651.

Towbin, H., Staehelin, T., Gordon, J., 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76, pp 4350-4354.

Wei, W., Zhao, W., Wang, X., Teng, M., Niu, L. 2007. Purification, crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of saxatilis venom. *Acta Crystallogr. Sect. F. Struct. Biol. Cryst. Commun.* 63, pp 704-707.

White, J. 2005. Snake venoms and coagulopathy. *Toxicon* 45, pp 951–967.

Who, L. 1981. Progress in the characterization of venoms and standardization of antivenoms. *WHO Offset Publ. Geneva* 58, pp 1-44.

Xu, G., Liu, X., Zhu, W., Yin, Q., Zhang, R., Fan, X. 2007. Feasibility of treating hyperfibrinogenemia with intermittently administered batroxobin in patients with ischemic stroke/transient ischemic attack for secondary prevention. *Blood Coagul. Fibrinolysis.* 18, pp 193-197.