

CARACTERIZACIÓN TÓXICA DEL VENENO DE *Bothrops (Rhinocerothis) alternatus* DE DIFERENTES REGIONES DE LA PROVINCIA DE CÓRDOBA (ARGENTINA).

Daniela M. Rocco¹; Gustavo Reati²; Vanessa Costa de Oliveira^{1,3}; Laura C. Lanari³; Rodrigo D. Laskowicz³; Adolfo R. de Roodt^{1,3}.

Resumen

Los venenos serpientes pueden presentar variabilidad en sus características bioquímicas y toxicológicas aún en ejemplares de una misma especie. La localización geográfica de los ejemplares es uno de los factores que puede influenciar estas variaciones. Por este motivo se estudió el veneno de ejemplares *Bothrops (Rhinocerothis) alternatus* ("crucera", "yará grande"), una de las serpientes de mayor importancia médica de Argentina, de tres regiones diferentes de Córdoba. Se estudió la potencia letal, la actividad hemorrágica, coagulante en plasma y trombina similar y el patrón electroforético de ejemplares de Calamuchita, Traslasierras y del Este de la provincia. El veneno de las serpientes de las tres regiones presentó las actividades características de los venenos de la mayoría de las *Bothrops*, causando hemorragias y alteraciones en el sistema hemostático, afectando tanto al plasma como actuando directamente sobre el fibrinógeno mediante una actividad trombina similar. Las distintas muestras fueron muy similares en cuanto a sus características bioquímicas ya sus potencias tóxicas, a diferencia de lo observado con veneno de ejemplares *B. alternatus* de distintas regiones de otras provincias de la Argentina. El antiveneno Bivalente utilizado por el Ministerio de Salud de Córdoba para tratar los accidentes por *Bothrops* neutralizó, en todos los casos las actividades tóxicas ensayadas en rangos de potencias neutralizantes muy similares

Palabras clave: *Bothrops*, *Rhinocerothis*, veneno, envenenamiento, variabilidad, antiveneno, tratamiento, toxicidad.

Abstract

Snake venoms can show biochemical and toxicological variability even in specimens from the same specie. The geographical localization of the snakes is one of the factors that can influence those variations. By these reasons the venom from specimens of *Bothrops (Rhinocerothis) alternatus* ("crucera", "yará grande"), one of the snakes of highest medical importance in Argentina, from three different regions of Córdoba was studied. Lethal potency, hemorrhagic, coagulant on plasma and thrombin like activities as well as the electrophoretic patterns of venom from snakes of Calamuchita, Traslasierras and the East of the province were determined. The venom from the snakes of the three regions showed the characteristic activities of the venom of the majority of *Bothrops*, causing hemorrhage, hemostatic disturbances acting on plasma or directly on fibrinogen with a "thrombin like activity". The different samples were very similar regarding their biochemical characteristics and toxic potencies at difference of previous observations on venoms from the same specie in different regions of other provinces fro Argentina. Bivalent antivenom, the one used by the Provincial Ministry of Health to treat the bothropic accidents, neutralized in all the cases the toxic activities of the venom in very similar range of neutralizing potency.

Key Words: *Bothrops*, *Rhinocerothis*, venom, envenoming, variability, antivenom, treatment, toxicity.

1 Laboratorio de Toxinopatología, Centro de Patología Experimental y Aplicada, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires. Uriburu 950, 5º piso, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires, Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina; aderoodt@gmail.com.

2 Centro de Zoología Aplicada, Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales, Universidad Nacional de Córdoba.

3 Área Investigación y Desarrollo, Instituto Nacional de Producción de Biológicos, Administración Nacional de Laboratorios e Institutos de Salud "Dr. Carlos G. Malbrán". Velez Sarsfield 463, Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina;

Autor a quien deberá dirigirse toda correspondencia:

Adolfo R. de Roodt

LabToxPat, FM-UBA / INPB-ANLIS "Dr. Carlos G. Malbrán".

Correo electrónico: aderoodt@gmail.com

Teléfono: 011 4301 2888.

Introducción

Los venenos de serpientes son las secreciones con mayor concentración de enzimas y toxinas en la naturaleza^{1,2}. Son producidos por glándulas labiales modificadas y tienen secreciones muy similares a las del sistema digestivo, en especial a la pancreática³. Su función primaria es la paralización de las presas que constituyen su dieta, interviniendo también en el proceso digestivo. El veneno inoculado actúa desde el interior de las presas en las cuales ha sido inyectado comenzando la hidrólisis de tejidos, hasta que los jugos digestivos puedan alcanzar la totalidad de los tejidos adecuadamente, debido a que estos animales no pueden masticar a sus presas⁴.

La composición de los venenos de serpientes varía entre las diferentes Familias, Géneros y Especies, existiendo también variaciones intraespecíficas. Además las variaciones, pueden ser de orden geográfico, estacional, ontogénico o individual, o debidas a otras causas difíciles de individualizar o clasificar. La variabilidad de los venenos es mayor cuanto más complejo son estos, es decir cuanto mayor es la cantidad de componentes que poseen⁵. Esto implica que en el caso de los venenos botrópicos pueda esperarse una complejidad importante. En el veneno de *Bothrops alternatus*, se han identificado más de 100 componentes diferentes⁶.

Dentro de las serpientes venenosas de alta importancia médica en Argentina, las *Bothrops* (conocida en general como “yará”, con siete especies diferentes en el país) son las responsables de aproximadamente el 98% de los accidentes por serpientes venenosas⁷.

En Argentina, *Bothrops alternatus* (DUMÉRIL, BIBRON & DUMÉRIL, 1854) (“yará grande”, “cruceira”, “víbora de la cruz”, “urutú”) y *Bothrops diporus* (“yará chica”, “yará overa”, “cabeza candado”, “yará pintada”) son las causantes de la mayoría de los accidentes ofídicos en todas las provincias⁷. Actualmente a estas dos serpientes se sugirió clasificarlas como *Rhinocephphis alternatus* y *Bothropoides diporus*⁸, si bien otros autores sugieren que se consideren como sinonimia⁹.

En estudios previos observamos variaciones importantes en los efectos tóxicos del veneno de ejemplares de *Bothrops alternatus* de diferentes regiones^{10,11,12,13}, mientras que no encontramos tanta variación entre los venenos de ejemplares de *Bothrops diporus*^{14,15}. También observamos que la neutralización por antivenenos de uso terapéutico sobre venenos de *Bothrops alternatus* de distintas regiones del país, si bien efectiva, no es del mismo grado para todos los venenos de esta especie¹⁶.

Bothrops alternatus es una de las serpientes venenosas de mayor aparición en la provincia de Córdoba junto con *Bothrops diporus*^{17,18,19}. Se encuentran distribuidas en todo el territorio de la provincia, aunque en zonas geográficamente diferentes¹⁸. Esta

especie en Córdoba prefiere ambientes amplios de pastizales, húmedos o asociados a cursos de agua, aunque también habita en valles serranos protegidos y con mayor grado de humedad. Desde un punto de vista biogeográfico llama la atención su presencia en el valle de Traslasierras, en el este de la provincia, una zona aislada geográficamente en el oeste del resto del territorio por las cadenas montañosas. Debido a las diferencias en toxicidad y neutralización de actividades tóxicas del veneno de *Bothrops alternatus* de ejemplares de diferentes regiones y aún de una misma provincia, como en los casos de la provincia de Buenos Aires o Entre Ríos^{10,11,13,16}, se decidió estudiar la toxicidad del veneno de ejemplares de diferentes regiones de la provincia de Córdoba. Las serpientes cordobesas de este género, debido al aislamiento geográfico en estas poblaciones, podrían presentar características diferenciales. En este trabajo se estudiaron algunas características tóxicas de venenos de *Bothrops alternatus* provenientes de tres diferentes regiones de la provincia de Córdoba y la neutralización de estas actividades tóxicas por el antiveneno terapéutico mayoritariamente utilizado en esa provincia.

Materiales y Métodos

Área de estudio: los venenos provienen de serpientes capturadas en la Provincia de Córdoba (Figura 1). Córdoba incluye un área central montañosa (altura máx 2790 m/snm [sobre el nivel del mar]) rodeada por una vasta planicie levemente ondulada de 600 - 900 m de altura. Las temperaturas siguen un gradiente norte-sur, con una media anual entre 18-10°C, una máxima media entre 27° y 14° C, y una mínima media entre 11° y 5° C. Las precipitaciones decrecen de este a oeste, con una media anual de 900 mm en el este a menos de 400 mm en el oeste; las lluvias están concentradas en el verano (octubre-marzo)²⁰. La región en estudio comprende tres eco regiones diferentes: a) Chaco Serrano (en las montañas centrales) con vegetación seca de bosques y arbustales entre 300 – 1350 m/snm, y pastizales de altura (sobre los 1350 m/snm); b) bosques y arbustales chaqueños secos (norte, centro y oeste de la provincia), y c) pastizales pampeanos, (este y sur) actualmente usados para agricultura y ganadería (Figura 1)²¹.

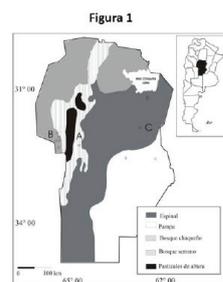


Figura 1: Vegetación de la Provincia de Córdoba (tomado de Luti et al., 1979) y ubicación de localidades origen de ejemplares de *Bothrops alternatus*. A, valle de Calamuchita; B, valle de Traslasierras; C, este de Córdoba.

Venenos: se utilizó veneno de ejemplares adultos de *Bothrops alternatus* provenientes de tres diferentes regiones de la provincia: del Valle de Calamuchita (Villa General Belgrano y El Durazno), grupo del valle de Traslasierras (Villa Dolores, Nono, La Travesía y Las Rabonas) y grupo del Este de Córdoba (Balnearia, Noethinger, Villa María, Trinchera y Las Varillas), alojados en el Serpentario del Centro de Zoología Aplicada de la Universidad Nacional de Córdoba (Figura 1). El veneno en todos los casos fue obtenido por extracción manual mediante estimulación eléctrica, desecado al vacío y guardado a -20°C hasta su uso. Se utilizaron venenos provenientes de dos extracciones realizadas con una diferencia de un mes entre una y otra. Para todos los estudios el veneno fue resuspendido y diluido en NaCl 0.15 M.

Animales de experimentación: se trabajó con ratones de la cepa CF-1 (18-22 g) y ratas Wistar (250 g) provenientes del bioterio del Instituto Nacional de Producción de Biológicos de la Administración Nacional de Laboratorios e Institutos de Salud "Dr. Carlos G. Malbrán", del Ministerio de Salud de la Nación (INPB). Los animales fueron alimentados con alimento para roedores y agua ad libitum, con períodos de luz / oscuridad de 12 horas. Para el trabajo con animales se siguieron los lineamientos sugeridos por el National Institute of Health ²².

SDS-PAGE: se realizó la electroforesis en gel de poli-acrilamida con presencia de dodecilsulfato de sodio (acrilamida / bisacrilamida al 12.5%) según métodos convencionales²³, sembrando 10 μg de veneno de las diferentes zonas. Las muestras de veneno se corrieron juntamente con marcadores de masa molecular de amplio rango (Promega, wide range) en una cuba Mini Protean II (Bio Rad). Una vez corridos, los geles se fijaron y tiñeron con azul brillante de Coomassie.

Antiveneno: se utilizó antiveneno antibotrópico Bivalente (Lote 259; X/2006), del INPB. Este antiveneno se produce inmunizando equinos con venenos de *Bothrops alternatus* y *Bothrops diporus* y su presentación farmacéutica es a fragmentos F(ab')₂ de inmunoglobulinas equinas, en forma líquida⁷.

Determinación de la potencia letal: se utilizaron grupos de 6-8 ratones de la cepa CF-1, de 18 - 22 g de peso por nivel de dosis, que se inocularon con diferentes dosis de veneno diluidos en un volumen final de 0.5 ml de NaCl 0.15 M por la vía intraperitoneal (i.p.). A las 48 horas posteriores a la inoculación, se determinó el porcentaje de sobrevivientes en cada nivel de dosis y la Dosis Letal Media (DL50) se estimó a partir de la curva dosis-respuesta mediante análisis de regresión no lineal²⁴.

Determinación actividad Hemorrágica: se determinó de acuerdo a la técnica descrita por Theakston y Reid ²⁵. Brevemente, ratas Wistar de 250 g de peso, previamente sedadas con acetilpromacina-ketamina por la vía intramuscular, fueron inyectadas

por la vía intradérmica (i.d.) con 100 μl de solución de NaCl 0.15 M conteniendo 1.0 - 300.0 μg de veneno. El veneno fue disuelto en NaCl 0.15 M e inyectado en un volumen de 100 μl . A las 24 horas los animales fueron sacrificados por sobredosis anestésica y se midieron los diámetros mayores perpendiculares de las áreas hemorrágicas en la cara dérmica con un calibre. Se definió la Dosis Mínima Hemorrágica (DMH) como la cantidad de veneno que resulta en un área hemorrágica con un diámetro mayor promedio de 1.0 cm.

Determinación de la actividad procoagulante en plasma humano: se determinó tratando 0.4 ml de plasma humano normal conteniendo 2.8 g/L de fibrinógeno con diferentes concentraciones de veneno en 50 μl de NaCl 0.15 M. Una dosis procoagulante mínima en plasma humano (DMC-P) se definió como la dosis de veneno que produce la formación de un coágulo evidente en 60 segundos ²⁵.

Determinación de la actividad procoagulante en fibrinógeno: se determinó de acuerdo a Theakston y Reid⁽²⁵⁾, con algunas modificaciones, tratando 0.2 ml de una solución de 2.0 g% de fibrinógeno bovino (Sigma) en NaCl 0.15 M, con diferentes concentraciones de veneno en 50 μl de NaCl 0.15 M. Una dosis procoagulante mínima en fibrinógeno (DMC-F) se definió como la dosis de veneno que produce la formación de un coágulo evidente en 60 segundos. **Seroneutralización de la letalidad:** se realizó mediante la técnica recomendada internacionalmente para evaluar antivenenos²⁶, desafiando animales con una dosis constante de veneno pre-incubada con diferentes dosis de antiveneno. Para cada dosis se utilizaron grupos de 5 ratones CF-1, de 18-22 g de peso. Los ratones se inyectaron por vía i.p. con 5 DL50 de venenopre-incubado 30 min a 37°C en un volumen final de 0.5 ml/ratón en NaCl 0.15 M (control positivo) o con distintas cantidades de los diferentes antivenenos con el mismo volumen final. El grado de protección se estimó como DE50 (Dosis Efectiva 50%), que expresa la cantidad de antiveneno que reduce la mortalidad en un 50%, considerando los animales sobrevivientes a las 48 hs. La DE50 se estimó mediante el estudio por regresión no lineal, considerando la protección en función de la dosis de antiveneno. Además, se calculó la potencia neutralizante como la cantidad de mg de veneno neutralizados por 1 ml de antiveneno ²⁷.

Seroneutralización de la actividad hemorrágica: se realizó de la siguiente manera. Grupos de tres ratas Wistar de 250 g se inyectaron por vía i.d. con 2 DMH de cada veneno pre-incubado 30 min a 37°C con NaCl 0.15 M (control positivo) o con distintas cantidades del antiveneno Bivalente. El área de hemorragia se calculó de la forma mencionada y se le asignó un valor de 100 % a la media del área hemorrágica determinada en el grupo control positivo. Se determinaron las DE50 (dosis de veneno que re-

duce a la mitad el área hemorrágica respecto a los controles positivos) de cada antiveneno, mediante el estudio por regresión no lineal de la curva de área hemorrágica en función de las dosis de antiveneno.

Seroneutralización de la actividad procoagulante en plasma: se determinó utilizando la técnica descrita por Theakston & Reid ²⁵. Se pre-incubaron 6 DMC-P de los diferentes venenos con distintas dosis de antiveneno durante 30 minutos a 37°C, en un volumen final de 150 µl con NaCl 0.15 M. Tras la incubación, se adicionaron las mezclas a 500 µl de plasma humano normal (contenido de fibrinógeno 2.8 g/L) y se determinaron los tiempos de coagulación. Los controles positivos fueron 6 DMC-P de veneno diluido en NaCl 0.15M en un volumen final de 150 µl. La inhibición de la actividad procoagulante se estimó como la dosis mínima de antiveneno que inhibió la coagulación del plasma durante diez minutos, tras la coagulación de los controles positivos.

Estadísticos: para determinar la significación estadística de los resultados, cuando fue necesario, se utilizó el estadístico t de Student. Los análisis estadísticos (regresión lineal, regresión no lineal y otros) se realizaron por medio del software Prism 4.0 (GraphPad Inc. San Diego, California, USA). Los resultados fueron expresados como media ± desvío estándar (DS). Los intervalos de confianza del 95% (IC 95%) se expresaron entre paréntesis.

Resultados

El patrón electroforético de las tres muestras fue muy similar, observándose la mayoría del material entre los 30-40 kDa y alrededor de los 20 kDa (Figura 2). Esto es coincidente con los patrones electroforéticos observados en venenos de ejemplares individuales de esta especie²⁸ y en el veneno de serpientes de esta especie de diferentes regiones de la Argentina¹³.

La potencia letal fue muy similar en todas las muestras, encontrándose entre los 130-140 µg / ratón. No se encontraron diferencias significativas entre las muestras (p < 0.05). De acuerdo a lo esperado,

todos los venenos presentaron actividades hemorrágica, coagulante y fosfolipásica.

La actividad hemorrágica de todas las muestras fue muy poco potente. Las de los venenos de serpientes de Calamuchita y Traslasierras fue muy similar (p 0.7357; t= 0.3429) siendo el veneno menos hemorrágico el proveniente del Este (p 0.0002; t= 5.811). Todas las muestras mostraron actividad coagulante sobre el plasma y el fibrinógeno. Si bien no hubieron diferencias significativas la DMC-P entre las muestras de Calamuchita y Este (p> 0.05; t < 0.7 en ambas comparaciones), la muestra de Traslasierras (DMC-P= 28 µg/ml) mostró mayor potencia que la del Este (DMC-P= 49 µg/ml; p 0.0433; t= 2.918). La actividad trombina similar fue diferente en todas las muestras (p< 0.05; t> 4.0 en todos los casos). El veneno de Traslasierras fue el que presentó la mayor actividad, seguido por el del Este, siendo el de Calamuchita el que presentó la menor actividad. La actividad fosfolipásica fue similar entre las muestras del Este y Traslasierras (p 0.3341; t= 1.097) siendo la de Calamuchita la que presentó la menor actividad (p< 0.05; t> 2.7). Todos los resultados se muestran en la *Tabla 1* y *Figura 2*. El antiveneno Bivalente utilizado, neutralizó eficientemente las actividades tóxicas probadas. Ver *Tabla 2*. La potencia letal y la actividad procoagulante en plasma fueron neutralizadas eficientemente en todos los casos. La potencia neutralizante de la letalidad conferida por el antiveneno se encontró entre los 5 – 7 mg de veneno por ml de antiveneno. No se observaron diferencias estadísticas (p< 0.05) respecto a la neutralización de la potencia letal de los venenos. La neutralización de la actividad coagulante fue muy similar en todos los casos, inhibiendo la coagulación causada por el veneno en dosis de 50 – 100 µl de antiveneno.

Respecto a la neutralización de la actividad hemorrágica, se vieron diferencias en la capacidad neutralizante del antiveneno sobre las diferentes muestras. Siendo mejor neutralizado el veneno de Calamuchita, seguido por el del Este mientras que

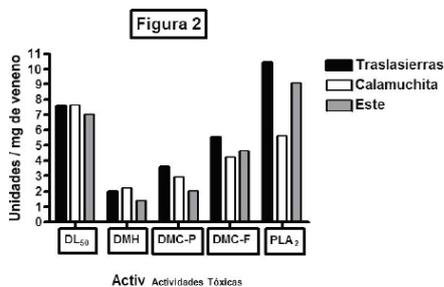


Figura 2. Actividades tóxicas de los venenos de *Bothrops alternatus* de diferentes regiones de la provincia de Córdoba contenidas en 1 mg de veneno.

Tabla 1

Veneno Actividad	Traslasierras	Calamuchita	Este
DL ₅₀	132 µg (126 - 139)	131 µg (121 - 142)	142 µg (130 - 155)
DMH	497 µg ± 45	449 µg ± 42	713 µg ± 97
DMC-P	28 µg ± 4	34 µg ± 5	49 µg ± 6
DMC-F	181 µg ± 7	238 µg ± 8	216 µg ± 2
PLA ₂ radial	96 µg ± 13	178 µg ± 38	110 µg ± 18

Tabla 1. Actividades Tóxicas del veneno de *Bothrops alternatus* de diferentes zonas de Córdoba. DL50= dosis letal media, DMH= dosis mínima hemorrágica, DMC-P= dosis mínima coagulante en plasma, DMC-F= dosis mínima coagulante en fibrinógeno, (actividad trombina similar), PLA₂ radial= actividad fosfolipásica expresada como hidrólisis radial de fosfolípidos.

el de Traslasierras fue el que requirió mayor dosis para ser neutralizado ($p < 0.05$).

Tabla 2

Veneno Actividad	Traslasierras	Calamuchita	Este
Letalidad	78 μ l (66 - 93)	91 μ l (57 - 146)	92 μ l (68 - 126)
	6.77 mg/ml (5.68 - 8.00)	5.76 mg/ml (3.59 - 9.19)	6.17 mg/ml (4.51 - 8.35)
Hemorragia	69 μ l (43-110)	15 μ l (9 - 24)	27 μ l (19-40)
Coagulación	50 μ l	50 μ l	100 μ l

Tabla 2. Seroneutralización de Actividades Tóxicas del veneno de *Bothrops alternatus*. Se expresa la potencia neutralizante del antiveneno Bivalente (en microlitros) sobre algunas actividades tóxicas del veneno de *Bothrops alternatus* de diferentes zonas de Córdoba.

Discusión

Bothrops alternatus es una de las serpientes que con mayor frecuencia es hallada en la provincia de Córdoba^{17,18}. En esta provincia, al igual que en Argentina⁷ y toda Sudamérica, la mayoría de las mordeduras por serpientes son producidas por las diferentes especies de *Bothrops* (actualmente en Argentina divididas en tres géneros: *Bothrops*, *Rhinocerothis* y *Bothropoides*). Si bien las especies de *Bothrops* responsables de los accidentes no están claramente identificadas en los informes epidemiológicos, considerando los hallazgos de las especies de *Bothrops* en esta provincia, posiblemente los accidentes se deban mayoritariamente a *B. diporus* y a *B. alternatus*¹⁹, en coincidencia con lo que sucedería a nivel nacional⁷. *Bothrops alternatus*, debido a su tamaño y a la cantidad de veneno que produce, que puede superar los 300 mg en peso seco²⁹, puede provocar accidentes de mucha gravedad.

La variación en toxicidad de venenos de una misma especie, además de las variaciones individuales intraespecíficas, pueden deberse a la localización geográfica. Esta puede relacionarse con diferentes dietas^{30,31,32} y estados metabólicos por las condiciones geográficas y climáticas, que podrían afectar la producción de veneno⁵. También, éstas podrían deberse a la carga genética de las serpientes en las diferentes regiones, debido a aislamiento geográfico o adaptación a distintas condiciones ambientales^{5,30,31,32}. En este estudio, no encontramos grandes diferencias cualitativas o cuantitativas entre las muestras de veneno, a pesar de provenir de diferentes localidades de la misma provincia, como aquellas halladas en el veneno de *Bothrops alternatus* provenientes de distintas zonas de la provincia de Buenos Aires^{10,13} o de la provincia de Entre Ríos^{11,13,16,33}.

El patrón electroforético de las muestras fue muy similar (Figura 3), en coincidencia con los patrones electroforéticos observados en venenos de esta es-

pecie^{28,13}. Solamente se pudo ver que una banda débilmente teñida en el orden de los 25 kDa observable en los venenos de Traslasierra y Calamuchita, está ausente en la muestra proveniente de venenos de serpientes del Este de la provincia.

Respecto a las actividades tóxicas del veneno de las regiones, están dentro de los rangos descriptos para las mismas en Argentina^{10,11,12,13,16,28,29,34,35}. Sin embargo, algunas actividades como la potencia letal (en los tres casos superior a los 130 μ g / ratón), fue menor a la observada en venenos de serpientes de otras provincias¹³. En otras muestras de venenos de Argentina, se encontraron en general dosis letales (determinadas por la vía i.p.) en un rango en general entre los 30 y 120 μ g/ratón^{13,28, 29}, que muestran mayor potencia que los determinados en estas muestras. Sin embargo, los valores obtenidos en este trabajo son coincidentes con datos previos sobre la potencia letal del veneno de *B. alternatus* de serpientes cordobesas de diferentes localidades, que mostró una potencia letal de 134.9 μ g / ratón¹³. Las potencias hemorrágica y coagulante en plasma o fibrinógeno fueron muy bajas en comparación a las observadas en muestras provenientes de otras provincias e incluso de muestras de veneno de serpientes de diferentes zonas de Córdoba^{12,13}. Una explicación posible a este fenómeno, podría ser que los pools de veneno constituidos por diferentes muestras, poseerían distintas formas y/o isoformas de los componentes tóxicos, como los hemorrágicos o coagulantes. La presencia de diferentes formas o isoformas con distintas actividades o diferentes especificidades por los distintos sustratos de la matriz extracelular podría aumentar la actividad hemorrágica del pool en referencia a las muestras individuales que constituyeron el pool. Esto lo hemos observado ocasionalmente con algunas muestras de veneno de *B. alternatus*¹³ y podría parcialmente explicar estas diferencias.

El antiveneno Bivalente es el de mayor uso en la Argentina. Se distribuye a todas las provincias a través del Ministerio de Salud de la Nación⁷, a excepción de la provincia de Buenos Aires. Esta última, utiliza los antivenenos producidos por el Laboratorio Central de Salud Pública de esa provincia, los cuales son distribuidos por el Ministerio de Salud provincial. El antiveneno botrópico producido por ese Laboratorio es desarrollado mediante la inmunización de equinos con los mismos inmunógenos que los utilizados para el Bivalente, es decir los venenos de *B. alternatus* y *B. diporus* según la clasificación más reciente. El antiveneno Bivalente neutralizó, en todos los casos, las actividades tóxicas ensayadas en rangos de potencias muy similares. Respecto a la potencia letal, 1 ml del antiveneno neutralizó entre 5–7 mg de veneno, lo que está por sobre los requerimientos en la Argentina, que son de 2.5 mg/ml³⁶, si bien esta considera la vía intravenosa y no la intraperitoneal

como la usada en este ensayo. La capacidad neutralizante estuvo aún por sobre los requerimientos en Brasil, que exigen una protección de 5 mg/ml para el antiveneno botrópico y utilizando en este caso la vía i.p. para los desafíos²⁷. Por este motivo se puede suponer que este antiveneno, aunque no se produce regularmente o mayoritariamente con el veneno de serpientes cordobesas, es capaz de neutralizar eficientemente al mismo.

Siguiendo las recomendaciones internacionales^{26,34,25,38}, no solo evaluamos la capacidad neutralizante sobre la letalidad (que es multifactorial) sino sobre actividades tóxicas particulares como la hemorragia y la actividad coagulante en plasma. En todos los casos el antiveneno fue capaz de neutralizar dichas actividades, mostrando ser eficiente para bloquear la acción de los componentes hemorrágicos (metaloproteinasas, llamadas hemorraginas)³⁹ y de las enzimas procoagulantes (principalmente proteasas de serina), las mayores responsables de las hemorragias incoercibles que se observan en estos envenenamientos⁴⁰.

La actividad hemorrágica del veneno de las serpientes de Traslasierras requirió algo más de antiveneno para ser neutralizada, respecto a la requerida para neutralizar el veneno de las serpientes de las otras zonas ($p < 0.05$). Esto tal vez podría ser debido a alguna variación cuali o cuantitativa en la cantidad de metaloproteinasas o proteasas de serina en el veneno de estas serpientes respecto a las de las otras zonas, si bien serían necesarios otros ensayos para poder afirmarlo.

El veneno de las serpientes cordobesas estudiadas, presenta las actividades características de los venenos de la mayoría de las *Bothrops*, causando hemorragias y alteraciones en el sistema hemostático, afectando tanto al plasma como actuando directamente sobre el fibrinógeno mediante una actividad trombina similar. Esta última actividad se observa en la mayoría de las especies de *Bothrops* pero no en todas^{28,41} y puede incluso ser extremadamente baja o estar ausente aún en el veneno de serpientes de una misma especie¹³.

Los pools de venenos de serpientes de las diferentes regiones de Córdoba fueron muy similares en cuanto a sus características tóxicas a diferencia de lo observado con *B. alternatus* de Entre Ríos o de la Provincia de Buenos Aires^{11,33,13,16}. Sus actividades presentaron una potencia muy parecida, siendo en algunos casos algo menor que las potencias tóxicas que observamos en el veneno de *Bothrops alternatus* de otras regiones. El antiveneno utilizado por el Ministerio de Salud de Córdoba para tratar los accidentes por *Bothrops* neutralizó eficientemente los venenos estudiados. Trabajos sobre la variación bioquímica y toxicológica individual de ejemplares de estas tres distintas regiones podrían proveer una más profunda información sobre la variación toxi-

cológica de los venenos de las serpientes de esa provincia, como se ha observado en venenos de serpientes de poblaciones provenientes de una misma localidad^{13,16}.

Referencias

1. Vidal J.C. Venenos de serpientes. *Bioquímica y Farmacología. Ciencia e Investigación* 1976, 32: 3-23.
2. Vidal, J.C. *Bioquímica de los venenos ofídicos. Boletín de la Asociación Herpetológica Argentina*, 1988, 4(1): 6-10.
3. Kochva, E. *The origin of snakes and evolution of the venom apparatus. Toxicon* 1987, 25(1): 65-106.
4. de Roodt A.R. Ofidios Venenosos y sus Venenos. En: *Sistemática y Filogenia de los Vertebrados, con énfasis en la fauna argentina. Ricardo Montero y Analía Autino Eds. 2009, pp. 233-242. ISBN 978-987-05-6743-1. Tucumán, Argentina.*
5. Chippaux J-P., Williams V., White J. Snake venom variability: methods of study, results and interpretation. *Toxicon* 1991, 29, 1279-1303.
6. Öhler M., Georgieva D., Seifert J., von Bergen M., Arni R.K., Genov N., Betzel Ch. The Venomics of *Bothrops alternatus* is a Pool of Acidic Proteins with Predominant Hemorrhagic and Coagulopathic Activities. *Journal Proteomic Research* 2010, 9: 2422-2437.
7. Ministerio de Salud. *Guía de prevención, diagnóstico, tratamiento y vigilancia epidemiológica de los envenenamientos ofídicos. Ministerio de Salud, 2007.*
8. Fenwick A.M., Gutberlet R.L., Evans J.A., Parkinson C.L. 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* 2009, 156: 617-640.
9. Carrasco P.A., Mattoni C.I., Leynaud G.C., Scrocchi G.J. Morphology, phylogeny and taxonomy of South American bothropoid pitvipers (Serpentes, Viperidae). *Zoologica Scripta. The Norwegian Academy of Science and Letters*, 2012, 1-16.
10. Lanari L., González M., Liria N., Laskowicz R., Manzanelli V., Herman D., Dolab J., de Roodt A.. Caracterización Tóxica del Veneno de *Bothrops alternatus* de Diferentes Zonas de Buenos Aires. *Acta Toxicológica Argentina* 2006a, 14(2): 51.
11. Lanari L., Laskowicz R., Liria N., González M., Manzanelli V., Herman D., Dolab J., Reati G., de Roodt A. 2006b. Caracterización Tóxica del veneno de *Bothrops alternatus* provenientes de diferentes regiones de la Argentina. VII Congreso Argentino de Herpetología. Corrientes 29/11 al 01/12 de 2006b. Asociación Herpetológica Argentina.
12. Lanari L.C., Gonzalez M.E., Liria N.C., Laskowicz R.D., Manzanelli P.P. Galarce, J.A. Dolab, D.I.J. Herman, de Roodt A.R. Toxic characteristics of the venom of *Bothrops alternatus* from Argentina. IX Congreso Panamericano de la Sociedad Internacional de Toxinología. Juriquilla, Querétaro, México. 21 al 25 de Octubre de 2007.
13. Lanari L.C., Rosset S., González M.E., Liria N., de Roodt A.R. 2010. A study on the venom of *Bothrops alternatus* Duméril, Bibron and Duméril, from different regions of Argentina. *Toxicon* 2010, 55(8): 1415-1424.
14. Oliveira, V.C.; Lanari, L.C; Baudou, F.G; Manzanelli, V.M; Laskowicz, R.D.; de Roodt, A. Variaciones del vene-

- no de *Bothrops diporus* de diferentes regiones de Argentina. R.XII Congreso Argentino de Herpetología, desarrollado en San Salvador de Jujuy en el mes de octubre de 2009. Libro de Resúmenes.
15. Oliveira, V.C.; Lanari, L.C., Hajos, S.E., de Roodt, A.R., Toxicity of *Bothrops neuwiedi* complex ("yará chica") venom from different regions of Argentina (Serpentes, Viperidae) *Toxicon* 2011, 57:680–685
 16. de Roodt A.R., Lanari L.C., Costa de Oliveira V., Laskowicz R.D., Stock R.P. Neutralization of *Bothrops alternatus* regional venom pools and individual venoms by antivenom: a systematic comparison. *Toxicon* 2011, 57: 1073 – 1080.
 17. Reati, G.J. Serpientes de la Provincia de Córdoba, Argentina. En: Biodiversidad de la Provincia de Córdoba: Fauna. 1996, Vol. I (I.E. di Tada y E.H. Bucher, eds.). pp. 239-254. Universidad Nac. De Río Cuarto.
 18. Leynaud G.C., Reati G.J., Bucher E.H. Annual activity patterns of snakes from Central Argentina (Córdoba province). *Studies on Neotropical Fauna and Environment* 2008, 43(1): 19-24.
 19. Leynaud G.C. & Reati G.J. Identificación de las zonas de riesgo ofídico en Córdoba, Argentina, mediante el programa SIGEpi. *Rev Panam Salud Pública* 2009, 26(1): 64-69.
 20. Capitanelli R.G. Clima. En: Geografía Física de la Provincia de Córdoba, 1979, p. 45-138. Vázquez J. Miatello R., Roqué M., Eds, Boldt, Buenos Aires, Argentina.
 21. Luti, R., Bertran, M., Galera, M., Muller, N., Nores, M., Herrera, M., Barrera, J.C. Vegetación. En: Geografía Física de la Provincia de Córdoba, 1979, p. 297–368. Vázquez, J. Miatello, R., Roqué, M., Eds, Boldt, Buenos Aires, Argentina.
 22. National Research Council. Guía para el cuidado y uso de los animales de laboratorio. 2002. Institute of Laboratory Animal Resources, Commission of Life Sciences. Academia Nacional de Medicina, Eds. México DF.
 23. Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970, 227: 680-685.
 24. Casasola A., Ramos-Cerrillo B., de Roodt A.R., Carbaljal A., Alagón A., Stock R.P. Paraspecific neutralization of the venom of African species of cobra by an equine antiserum against *Naja melanoleuca*: a comparative study. *Toxicon* 2009, 53: 602-608.
 25. Theakston, R.D.G., Reid, H.A., 1983. Development of simple standard assay procedures for the characterization of snake venoms. *Bulletin of the World Health Organization* 61, 949-956.
 26. World Health Organization. Progress in the Characterization of Venoms and Standardization of Antivenoms. Offset Publication, WHO, Geneva, 1981.
 27. Ministerio de Saúde. Normas Técnicas de Fabricação e Controle de Qualidade dos Soros Antiofídicos, Antitóxicos en Antirrábico aprovada pela vigilância sanitária. Secretaria de Vigilância Sanitária, 1996, Ministerio de Saúde.
 28. de Roodt A.R. Estudio Inmunobiológico del Veneno de Serpientes de Importancia Sanitaria de la Argentina. 2002, Tesis Doctoral. Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad de Buenos Aires.
 29. de Roodt, A. R., Dolab, J. A., Galarce, P. P., Litwin, S., Gould, E., Dokmetjian, J. C., Segre, L. and Vidal, J. C. A Study on the Venom Yield of Venomous Snake Species from Argentina. *Toxicon* 1998, 36, 1949-1958.
 30. Daltry, J.C., Wuster, W., Thorpe, R.S.. Diet and snake venom evolution. *Nature* 1996, 379, 537–540.
 31. Sasa M. Diet and snake venom evolution: Can local selection alone explain intraspecific venom variation? *Toxicon* 1999, 37: 249 – 252.
 32. Gibbs H.L., Rossiter W. Rapid Evolution by Positive Selection and Gene Gain and Loss: PLA2 Venom Genes in Closely Related *Sistrurus* Rattlesnakes with Divergent Diets. *J MolEvol*:2008, 66:151–166.
 33. de Roodt A.R., Lanari L.C., Laskowicz R.D., Botassi S., Rocco D.M., Costa de Oliveira V., Regner P.I.. Comparación de caracteres corporales y del veneno de *Rhinocrophis alternatus* entre poblaciones de las provincias de Buenos Aires y Entre Ríos, Argentina. *Cuadernos de Herpetología* 2012, 26(1). En prensa.
 34. Sanchez, E.F., Freitas, T.B., Ferreira-Alves, D.L., Velarde, D.T., Diniz, M.R., Cordeiro, M.N., Agostini-Cotta, G, Diniz, CR. Biological activities of venoms from South American snakes. *Toxicon* 1992, 30(1): 95-103.
 35. de Roodt A.R., Litwin S., Vidal J.C. Hemorrhagic activity of *Bothrops* venoms determined by two different methods and relationship with proteolytic activity on gelatin and lethality. *Toxicon* 2003, 41(8): 949-958, 2003.
 36. Farmacopea Nacional Argentina. 1978. Pág. 857. Ed. Codex, Bs.As. 1283 pp.
 37. World Health Organization. WHO Guidelines for the Production Control and Regulation of Snake Antivenom Immunoglobulins. 2010, 110. http://www.who.int/bloodproducts/snake_antivenoms/SnakeAntivenomGuideline.pdf.
 38. Theakston RD, Warrell DA, Griffiths E. Report of a WHO workshop on the standardization and control of antivenoms *Toxicon*. 2003, 41(5):541-57
 39. Bjarnasson J.B. & Fox J.W. Hemorrhagic metalloproteinases from snake venoms. *Pharmac. Ther.* 1994, 62: 325-372.
 40. Markland F.S. Snake venoms and the hemostatic system. *Toxicon* 1998, 36(12): 1749-1800.
 41. de Roodt A.R., Lanari L.C., Clement H., Manzanelli V.M., Alagon A. Some toxic and biochemical characteristics activities of *Bothrops ammodytoides* venom. IX Congreso Panamericano de la Sociedad Internacional de Toxinología. Juriquilla, Querétaro, México. 21 al 25 de Octubre de 2007. Libro de Resúmenes.