

CAPACIDAD NEUTRALIZANTE DE LOS SUEROS ANTIOFIDICOS FRENTE AL VENENO DE *BOTHROPS MOOJENI* (CAISACA, LANZADERA)ADOLFO R. DE ROODT<sup>1,2</sup>, JORGE A. DOLAB<sup>1</sup>, SILVIA E. HAJOS<sup>2</sup>, TERESA FERNANDEZ<sup>2</sup>, LILIANA SEGRE<sup>1</sup><sup>1</sup> Instituto Nacional de Producción de Biológicos A.N.L.I.S. Dr. Carlos G. Malbrán; <sup>2</sup> Cátedra de Inmunología, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires

**Resumen** La serpiente *Bothrops moojeni* ("caisaca", "lanzadera", "lance-headed viper") es un crotalíneo de frecuencia de aparición escasa en la Argentina. Solamente se la ha encontrado y clasificado correctamente en la provincia de Misiones. Se realizó el estudio del veneno por electroforesis en condiciones no desnaturizantes y en SDS-PAGE y se determinó la Dosis Letal 50. La reactividad inmunoquímica frente a los antivenenos botrópicos Bivalente y Tetraivalente y por el Botrópico-Crotálico producidos por el Instituto Nacional de Producción de Biológicos A.N.L.I.S. Dr. Carlos G. Malbrán, se determinó por doble inmunoprecipitación, inmunoelectroforesis, ELISA y *Western-blot*. Se estudió la capacidad neutralizante de estos sueros frente a las actividades letal, hemorrágica, necrótica, proteolítica, hemolítica indirecta (fosfolipásica) y procoagulante del veneno. Estos estudios dieron como resultado un muy alto grado de reactividad inmunoquímica y de neutralización heteróloga de las diferentes actividades del veneno por los antivenenos probados. Se puede concluir que los sueros antiofídicos antibotrópicos o botrópico-crotálico, distribuidos gratuitamente a las Delegaciones Sanitarias del país por el Ministerio de Salud y Acción Social, podrían ser utilizados ante los accidentes ofídicos por *Bothrops moojeni* debido a que neutralizan eficientemente las actividades tóxicas del veneno de este ofidio.

**Palabras clave:** *Bothrops*, envenenamiento, mordedura de víbora, seroterapia, neutralización cruzada

La serpiente *Bothrops moojeni* (*Viperidae-Crotalinae*), conocida con los nombres de "caisaca", "lanzadera", "lance-headed viper", es un crotalíneo de frecuencia de aparición escasa en la Argentina. La bibliografía menciona su hallazgo esporádicamente en las provincias del Noreste del país<sup>1,2</sup>. Solamente se la había encontrado y clasificado correctamente en la provincia de Misiones, en el Departamento de Iguazú<sup>3</sup>. Desde la confirmación de su hallazgo en la Argentina, se ha comunicado su aparición en otras zonas ale-

jadas de este Departamento, en la misma Provincia. A pesar de que hasta la fecha este ofidio representa un riesgo sanitario de poca importancia debido a lo limitado y escaso de sus hallazgos y de su distribución, el riesgo de accidentes existe para los habitantes de las zonas en que se lo halla y para el personal que manipula estos especímenes en serpentarios.

El ataque por *B. moojeni* es muy peligroso por su modalidad, son víboras de movimientos muy rápidos que al atacar se lanzan varias veces sobre la víctima dando saltos sucesivos proyectando casi todo el largo de su cuerpo (de allí el nombre de "lanzadera") y al morder descargan grandes cantidades de veneno<sup>4</sup>. Es de destacar que no adopta la pose previa a la mordedura característica de las otras especies de *Bothrops* que

Recibido: 8-I-1997

Aceptado: 12-II-1997

Dirección postal: Dr. Adolfo R. de Roodt, Instituto Nacional de Producción de Biológicos A.N.L.I.S. Dr. Carlos G. Malbrán, Av. Vélez Sarsfield 563, 1281 Buenos Aires, Argentina



se hallan en la Argentina, en la "caisaca" ésta es más bien parecida a la que presenta *Crotalus durissus terrificus* ("vibora de cascabel") previamente al ataque. El veneno inoculado a la víctima normalmente puede variar entre el 2,5-38,2% del total del contenido en las glándulas<sup>5</sup> pero puede llegar a inocular el contenido total de las mismas. En este caso se debe considerar que de un espécimen adulto pueden extraerse manualmente entre 300-350 mg de veneno<sup>6</sup>. No necesariamente la mordedura se produce en condiciones "de campo", sujetos que se encontraban durmiendo en el interior de una vivienda llegaron a sufrir accidentes por esta especie, en Brasil<sup>7</sup>.

El envenenamiento por *Bothrops moojeni* cursa con el cuadro típico de los envenenamientos botrópicos.

Los venenos de las *Bothrops spp* poseen muchas actividades biológicas, entre ellas se destacan las actividades hemorrágica, proteolítica, coagulante, edematogénica, fibrinopénica, trombocitopénica y necrotizante, cuyos efectos se manifiestan localmente y sistemáticamente. Los cuadros de envenenamiento provocan extensas lesiones locales, hemorragias e hipotensión. Las lesiones necróticas-hemorrágicas locales son muy importantes, la inflamación y el edema en ocasiones pueden llegar desde la zona de mordida (en general los miembros y con mayor frecuencia los inferiores) hasta el tronco. La acción mionecrótica se debe a la acción de miotoxinas (de estructura fosfolipasa A<sub>2</sub> con actividad enzimática o desprovista de ésta) y/o a los trastornos vasculares y hemostáticos que pueden conducir a la isquemia tisular, proceso que en ocasiones lleva a la amputación de miembros o lesiones musculotendinosas permanentes<sup>8-11</sup>.

En el Brasil, la insuficiencia renal es una de las complicaciones producidas por los envenenamientos botrópicos de mayor frecuencia<sup>11, 12, 13</sup>. El daño renal podría producirse por acción directa del veneno sobre los túbulos renales o bien indirectamente por sus efectos sistémicos<sup>14</sup>. La incoagulabilidad sanguínea causada por esterasas del veneno que provocan fibrinopenia y por la acción trombocitopénica del mismo<sup>15, 16</sup>, las lesiones vasculares por proteasas que junto a otros componentes del veneno lesionan el endotelio y capa muscular de arterias y arteriolas<sup>17, 18</sup>, sumadas a la hipotensión severa causada principalmente por la actividad fosfolipásica del veneno y

a la acción de proteasas y de péptidos de bajo peso molecular sobre componentes plasmáticos (por ejemplo sistema kaliceína-bradikina) pueden llevar al colapso hipovolémico irreversible, característico del envenenamiento botrópico<sup>18</sup>. La actividad sobre el sistema cardiovascular provocado por el veneno de *Bothrops moojeni* estaría relacionada principalmente con la liberación de histamina<sup>19</sup>. Hay que destacar en este punto que en los envenenamientos por la caisaca las hemorragias sistémicas no son muy frecuentes y el daño más importante es el local<sup>4</sup>.

Aunque la signosintomatología resultante de la mordedura de las distintas especies de *Bothrops* es muy similar, existe una gran variabilidad química y farmacológica en la composición de los venenos ofídicos, aun de aquellos provenientes de aquellos individuos de una misma especie provenientes de la misma región geográfica<sup>20</sup>. Respecto al veneno de ejemplares de *Bothrops moojeni* del Brasil se observaron variaciones ontogénicas bioquímicas y tóxicas<sup>21, 22</sup>. A causa de esta variabilidad, (generalizada en los venenos ofídicos), la OMS recomienda preparar los sueros antiofídicos con pools de venenos de especímenes de diferentes sexos, edades y regiones, con el fin de cubrir posibles diferencias existentes entre los mismos<sup>23</sup>.

Los venenos botrópicos presentan una alta reactividad cruzada tanto *in vivo* como *in vitro*, pese a esto, no todos los sueros antiofídicos antibotrópicos que se comercializan protegen contra todos los venenos botrópicos. Hasta el presente, la reactividad cruzada entre el veneno de *Bothrops moojeni* y los sueros antiofídicos en uso en la Argentina solamente fue comunicada en reuniones científicas<sup>24, 25</sup> y no se dispone fácilmente de bibliografía actualizada sobre el tema. Por otra parte en el país no existen trabajos publicados sobre la efectividad de los sueros terapéuticos de uso corriente frente al veneno de *Bothrops moojeni*. Por esta causa realizamos los siguientes estudios: Electroforesis en condiciones no desnaturizantes y en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE), y la determinación de la Dosis Letal 50 (DL<sub>50</sub>). A su vez se realizaron la Doble Inmunoprecipitación (IP), Inmunoelectroforesis (IEF), ELISA, Western-blot, Seroneutralización de la actividad letal en ratones, y de las actividades hemorrágica, necrótica, procoagulante en plasma humano, hemolítica indirecta y proteolítica del



veneno frente a los sueros antiofídicos anti *Bothrops* de uso corriente en el país, producidos por el Instituto Nacional de Producción de Biológicos A.N.L.I.S. Dr. Carlos G. Malbrán (INPB).

## Materiales y métodos

**Venenos:** pool de 10 ejemplares de *Bothrops moojeni* capturados en la provincia de Misiones. El veneno fue extraído manualmente, desecado al vacío y conservado en la heladera a 4°C.

**Antivenenos:** todos fueron desarrollados en equinos por el INPB. Su presentación farmacéutica es la fracción F(ab')<sub>2</sub> de las IgG equinas.

1. **Suero antiofídico botrópico bivalente:** partida de suero INPB 243-90, desarrollado con veneno de *Bothrops alternatus* ("yará", "víbora de la cruz", "urutú", "giriogaká-curuzú") y *Bothrops neuwiedii* ("yará chica", "yará overa", "cabeza candado", "yará-i") como inmunógenos.

2. **Suero antiofídico botrópico tetravalente:** partida de suero INM 417-90. Los inmunógenos utilizados para su producción son los venenos de *Bothrops alternatus*, *Bothrops neuwiedii*, *Bothrops jararaca* ("yará", "perezosa") y *Bothrops jararacussu* ("tapete", "yarácuzú", "surucucú-apeté").

3. **Suero antiofídico trivalente:** en período de desarrollo, utilizando como inmunógenos venenos de *Bothrops alternatus*, *Bothrops neuwiedii* y *Crotalus durissus terrificus*.

**Electroforesis en Acetato de Celulosa:** realizada en Cellogel (Chemtron, Milano, Italia) utilizando tris-barbital sódico pH 8,8 según técnica descrita por Silles Villarroel<sup>26</sup>.

**Doble inmunoprecipitación:** se realizó en portaobjetos en agarosa (Agarosa Ultrapur, SIGMA) al 1%, enfrentando 10 microlitros de cada suero antiofídico (figura 1) a 10 microlitros de una solución de 1 mg/ml de veneno de *Bothrops moojeni* en NaCl 0,15 M<sup>27</sup>.

**Inmunoelectroforesis:** se llevó a cabo según la técnica descrita por Siles Villarroel<sup>28</sup>.

**ELISA:** se realizó según la técnica descrita por Higashi<sup>29</sup>.

**SDS-PAGE y Western-blot:** el SDS-PAGE se llevó a cabo utilizando la técnica de Laemmli<sup>30</sup> en un sistema discontinuo utilizando una unidad de electroforesis vertical Miniprotean II (BIO RAD). Las muestras fueron corridas en condiciones no reductoras en un gel al 10%. Las proteínas se colorearon con Azul de Coomassie R250 (BIO RAD) o fueron transferidas sobre una membrana de nitrocelulosa (BIO RAD) de acuerdo a Towbin<sup>31</sup>. Se utilizaron marcadores de PM SIGMA VII-S.

**Dosis letal 50 (DL 50):** se llevó a cabo utilizando 10 ratones (*Mus musculus*) cepa CF-1, de 18-22 g de peso

por dilución del veneno. Este fue disuelto en NaCl 0,15 M. El cálculo se realizó mediante la curva de regresión por el método de los cuadrados mínimos.

**Seroneutralización:** en todos los casos veneno y antivenenos fueron incubados durante 30 minutos a 37°C.

**De la actividad letal:** Se utilizaron 10 ratones cepa CF-1, de 18-22 g de peso a los que se les inyectó vía i.v. 0,3 ml de la mezcla de diferentes cantidades de veneno previamente incubado frente a 1 ml de cada suero antiofídico. Se calcularon los mg y las DL 50 de veneno que neutraliza 1 ml de cada suero antiofídico.

**De la actividad hemorrágica:** se realizó en ratones cepa CF-1 de 25 g de peso. Se inyectaron grupos de 10 animales con veneno sólo (100 µg) o previamente incubado con antiveneno en una relación de 1 µg/1 µl. El área de hemorragia se calculó por el método de Kondo modificado<sup>32, 33, 34</sup>.

**De la Actividad Necrotizante:** se realizó en grupos de 10 ratones cepa CF-1 inoculados por la vía intradérmica con 50 µg de veneno en 100 µl de NaCl 0,15 M previamente incubado con antiveneno en una relación de 1 µg/1 µl. Como testigos positivos se inocularon ratones de la misma manera con 50 µg de veneno diluidos en NaCl 0,15 M. El área de necrosis se calculó en ambos grupos según el método de Kondo modificado<sup>32, 34</sup>.

**De la actividad procoagulante:** a 200 µl de plasma humano se agregaron 5 DMP-P (dosis mínima procoagulante) de veneno (60 µg) calculadas por el método descrito por Theakston<sup>34</sup> incubados previamente con diferentes volúmenes de suero antiofídico (25-400 µl). Se controló el tiempo de coagulación respecto a los testigos positivos (veneno sólo en 100 µl de NaCl 0,15 M).

**De la actividad hemolítica indirecta:** Se utilizó el método de inhibición de la hemólisis radial en agarosa (ULTRAPURE, SIGMA), según la técnica descrita por Dias Da Silva<sup>35</sup>.

**De la actividad sobre la gelatina:** gelatina para uso bacteriológico al 20% (OXOID) fue mezclada con veneno (200 µg) seroneutralizado en una proporción de 1 µg/µl de suero antiofídico. Se dejó 4 horas a temperatura ambiente y se llevó a 4°C durante toda la noche, tras las que se observó el tiempo de licuación respecto a los testigos positivos (200 µg de veneno en 1 ml de gelatina al 20%) y negativos (100 µl de NaCl 0,15 M y 100 de cada suero antiofídico, en cada caso en 1 ml de gelatina al 20%).

**Anátomo e Histopatología:** 100 µg de veneno fueron inoculados por la vía IV o IM a grupos de 7 animales.

**Anatomía patológica:** posteriormente a la determinación de la DL50, se realizó el estudio anatomopatológico y se tomaron muestras de músculo esquelético, pulmones, corazón, riñones, intestino, hígado, bazo, piel, cerebro y cerebelo. Las muestras fueron fijadas en formaldehído tamponado al 10%, y se incluyeron en parafina. Se colorearon con Hematoxilina-Eosina. Un grupo adicional de ratones fue inoculado vía intramuscular (IM) con



150 µg de veneno para observar los efectos locales producidos por el mismo en el músculo.

**Estadísticos utilizados:** se utilizó como estadístico el *t* de Student por comparación de medias y varianzas.

## Resultados

**Electroforesis:** en acetato de celulosa el patrón electroforético fue similar al descrito para ejemplares de *Bothrops moojeni* provenientes de especímenes brasileños, se pueden observar dos pequeñas bandas proteicas aniónicas y varias bandas de migración catiónica, que permiten diferenciar a este veneno del de otras especies de *Bothrops* argentinas que ocupan la misma zona geográfica (Figura 1). El SDS-PAGE puso en evidencia proteínas en un rango dentro de los 14-90 kD, con bandas bien definidas alrededor de los 66, 32, 25 y 14 kDa (Figura 2). Se revelaron claras diferencias con los patrones de venenos de otras especies de *Bothrops* de la Argentina.

**IP:** todos los antivenenos reconocieron al veneno (Figura 1). Enfrentando a los venenos botrópicos de las especies mencionadas junto al de *B. moojeni* con los antivenenos utilizados, se observaron bandas de precipitación compartidas

con el veneno de *Bothrops neuwiedii* y *Bothrops jararacussu* principalmente y en menor medida con *Bothrops jararaca* (Datos no expuestos).

**IEF:** se puede observar que existe un reconocimiento del veneno por todos los antisueros utilizados.

**ELISA:** hubo un reconocimiento ( $P < 0,001$ ) del veneno por todos los sueros antiofídicos utilizados (Datos no expuestos).

**Western-Blot:** los sueros analizados reconocieron a todos los componentes del veneno observados en el SDS-PAGE, tanto los de alto ( $> 60$  kDa.), mediano (60-20 kDa.) y bajo ( $< 20$  kDa.) Peso Molecular (Fig. 2).

**DL<sub>50</sub>:** fue de 30 µg de veneno para un ratón de 18-22 g.

**Seroneutralizaciones:**

**De la Actividad letal:** 1 ml de suero bivalente protegió al 100% de los ratones inoculados contra 6000 µg (200 DL<sub>50</sub>), 1 ml de suero tetravalente protegió contra 5000 µg (166 DL<sub>50</sub>) y 1 ml de suero trivalente protegió contra 5500 µg (183 DL<sub>50</sub>). (Tabla 1).

**De las Actividades hemorrágica y necrótica:** 1 µl de antiveneno neutralizó totalmente las actividades hemorrágica y necrotizante de 1 µg de veneno ( $P < 0,001$ ). (Tabla 2).

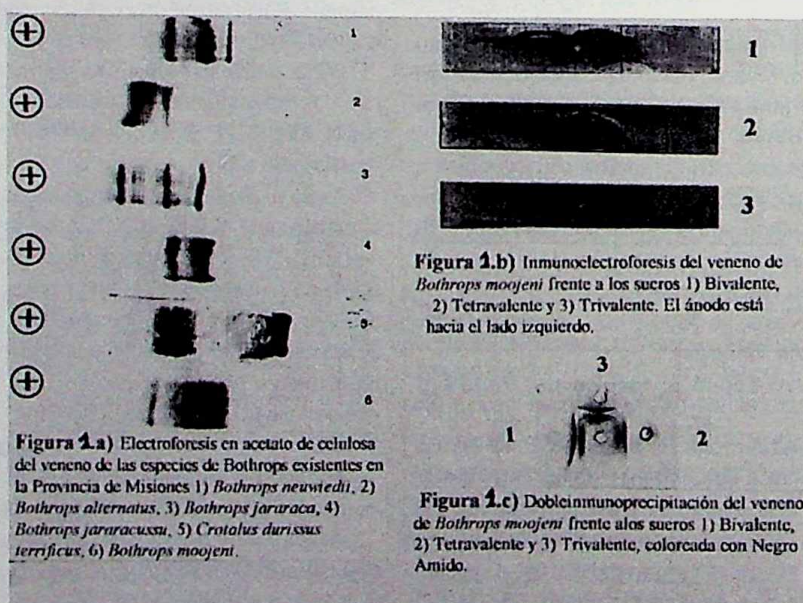


Figura 1.- a) Electroforesis en acetato de celulosa del veneno de las especies de *Bothrops* existentes en la Provincia de Misiones 1) *Bothrops neuwiedii*, 2) *Bothrops alternatus*, 3) *Bothrops jararaca*, 4) *Bothrops jararacussu*, 5) *Crotalus durissus terrificus*, 6) *Bothrops moojeni*. b) Inmuno-electroforesis del veneno de *Bothrops moojeni* frente a los sueros 1) Bivalente, 2) Tetravalente y 3) Trivalente. El ánodo está hacia el lado izquierdo. c) Doble inmunoprecipitación del veneno de *Bothrops moojeni* frente a los sueros 1) Bivalente, 2) Tetravalente y 3) Trivalente. Coloración realizada con Negro Amido.



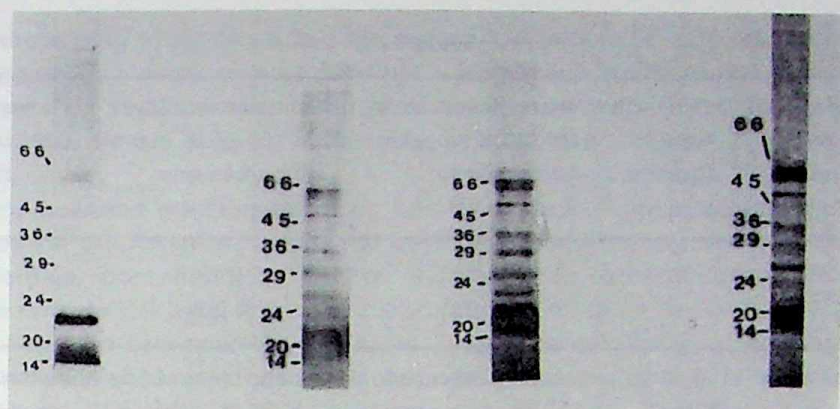


Figura 2.a

Figura 2.b

Figura 2.c

Figura 2.d

Figura 2.- SDS-PAGE e Inmunoblotting del veneno de *Bothrops moojeni*. a) SDS-PAGE del veneno de *Bothrops moojeni*. Coloración Azul de Coomassie R-250. b) Inmunoblot del veneno transferido enfrenteado al suero Bivalente. c) Inmunoblot del veneno transferido enfrenteado al suero Trivalente. d) Inmunoblot del veneno transferido enfrenteado al suero Trivalente.

TABLA 1

Antiveneno	Neutralización de la actividad letal expresada en DL <sub>50</sub> /ml de suero	Neutralización de la actividad letal (100%) expresada en mg/ml de suero	Inhibición de la hemólisis indirecta	Inhibición de la actividad procoagulante
Bivalente	200 DL <sub>50</sub>	6000 mg	48 ± 7%	> 25 < 30'
Tetravalente	166 DL <sub>50</sub>	5000 mg	56 ± 17%	> 25 < 30'
Trivalente	183 DL <sub>50</sub>	5500 mg	46 ± 8%	> 20 < 25'

*Inhibición de la Actividad letal:* en la primera columna se expresa la neutralización de la actividad letal expresada en DL<sub>50</sub> conferida por 1 ml de cada suero probado. En la segunda columna se expresa la neutralización de la actividad letal expresada en mg de veneno conferida por 1 ml de suero en el 100% de los animales.

*Inhibición de la actividad hemolítica indirecta:* en la tercer columna expresa la inhibición de la hemólisis indirecta provocada por 1 µl de veneno preincubado con 0,5 µl de suero.

*Inhibición de la actividad procoagulante:* en la cuarta columna se expresa el tiempo en que se produce un coágulo firme de 200 µl de plasma humano; 50 µg de veneno crudo lo producen en 22" ± 4". Los resultados del tratamiento del plasma con 50 µg de veneno preincubados con 100 µl de suero se expresan en minutos.

*De la actividad procoagulante:* hubo un significativo retardo en el tiempo de coagulación al enfrentar al veneno a cada uno de los antivenenos ( $P < 0,001$ ). A los 10 minutos, ningún plasma tratado con veneno neutralizado con 100 µl de antiveneno (2 µl de antiveneno por µg de veneno) o más coaguló. Tras los 15 minutos, se comenzaron a observar trazas de fibrina, sin formación de coágulo en los tratados con menor canti-

dad de antivenenos (2 µl/µg). Recién a las 5 horas se observó la coagulación completa de todos los plasmas. Los controles positivos coagularon en 35 ± 9 segundos. (Tabla 1).

*De la actividad hemolítica indirecta:* se observó que 0,5 µl de suero frente a 1 µg de veneno inhibió la hemólisis en diferente grado con todos los sueros probados. El porcentaje de inhibición fue el siguiente: Bivalente 47,94% (DS ± 17,5%),



TABLA 2

Hemorragia provocada por 100 µg de veneno expresada en cm	0,15 M NaCl (Control negativo)	Veneno preincubado con 100 µl de suero bivalente	Veneno preincubado con 100 µl de suero tetavalente	Veneno preincubado con 100 µl de suero trivalente
1,4 ± 0,7 (0,5 - 3,0)	(-)	0,12 (0-0,25)	0,29 (0-0,8)	0,07 (0-0,25)
Necrosis provocada por 50 µg de veneno expresada en cm	0,15 M NaCl	Veneno preincubado con 50 µl de suero bivalente	Veneno preincubado con 50 µl de suero tetavalente	Veneno preincubado con 50 µl de suero trivalente
0,8 ± 0,2	(-)	(-)	0,02 (0-0,1)	(-)

Entre paréntesis figuran los valores mínimos y máximos hallados en los experimentos. (-) significa ausencia de hemorragia o necrosis.

Tetavalente 56,25% (DS ± 16,67%), Trivalente 45,81% (DS ± 8,11%). (Tabla 1).

*Neutralización de la actividad sobre la gelatina:* hubo inhibición total de la licuación de la misma por el veneno frente a todos los sueros antifídicos probados.

*Anatomía patológica:* macroscópicamente se observó edema, congestión y/o hemorragias leves en todos los órganos. Localmente pudo verse la presencia de edema, inflamación y necrosis y microscópicamente se encontraron hemorragias, con presencia de trombos, fibrina y mionecrosis del tipo coagulativa en las muestras examinadas.

## Discusión

Respecto a las características de la composición del veneno se observó que el patrón electroforético en acetato de celulosa permite la clara y rápida diferenciación de este veneno del de otras *Bothrops* que se encuentran en el país y es similar al descripto para el veneno de ejemplares brasileños<sup>36</sup>. Por otro lado, el SDS-PAGE puso en evidencia una gran semejanza en la composición respecto a especímenes del Brasil y también permite su diferenciación del veneno de las otras *Bothrops sp.* argentinas. Las pequeñas diferencias que se observan, pueden deberse a que en nuestros SDS-PAGE se utilizó un gel al 10% mientras que otros autores utilizan gradientes del

10 al 15%, los que permiten la mejor visualización de las bandas de menor PM<sup>36</sup>. Además en este punto debemos mencionar que se observan modificaciones ontogénicas del veneno de esta especie de *Bothrops* en el perfil proteico por SDS-PAGE<sup>22</sup>, por lo que estas diferencias pueden atribuirse a características individuales del veneno de los especímenes que conformaron los pools utilizados.

En todas las pruebas inmunoquímicas realizadas se encontró gran reactividad cruzada entre este veneno y todos los sueros ensayados. Por IP e IEF el veneno fue reconocido por todos los antivenenos. Asimismo, por medio del ELISA los sueros probados reconocieron al veneno ( $P < 0,001$ ) en diluciones  $> 1/100000$ . Por Western-blot se aprecia que los antivenenos reconocen a todos los componentes que se observan por SDS-PAGE. Estas pruebas reafirman que a pesar de las diferencias en el patrón electroforético existe gran similitud antigénica entre los venenos de crotalíneos y la capacidad de sueros no específicos de reconocer a los componentes de venenos de especies diferentes al utilizado para la producción del antiveneno<sup>35, 37, 38, 39, 40</sup>. Por otra parte es menester mencionar que para la producción de antivenenos se recomienda utilizar como inmunógenos a los venenos de los ejemplares de la región geográfica donde sería utilizado el suero, ya que éstos protegerían mejor al sujeto frente a todas las actividades de los mismos<sup>23, 40</sup>.



La DL50, hallada para el veneno analizado se encuentra dentro de los valores mencionados por la bibliografía para los venenos de especímenes del Brasil, que varían entre 6,5-9,4  $\mu\text{g}^{15}$  hasta 72-98  $\mu\text{g}^{41}$ .

Los hallazgos anatómo e histopatológicos en ratones (congestión y/o hemorragia, edema, inflamación, necrosis, presencia de trombos y fibrina) son una característica del envenenamiento por *Bothrops spp.* En este caso hay que mencionar que las lesiones sistémicas observadas no fueron de tanta gravedad como las que se observan en el envenenamiento experimental por *Bothrops alternatus* y *Bothrops neuwiedii* (Observación personal de los autores).

En las pruebas de neutralización todos los sueros probados inhibieron las actividades total o parcialmente del veneno tanto *in vivo* como *in vitro*.

Algunas de las características más conspicuas de los envenenamientos botrópicos son las hemorragias y la necrosis tisular. En los sujetos mordidos por *Bothrops sp.* pueden observarse lesiones a nivel endotelial, en la matriz extracelular y en la media arterial, que conducen a la rexis<sup>8, 17</sup>. La licuación de la gelatina, puede relacionarse con la capacidad de ataque del veneno a la matriz extracelular de tejido conectivo y la producción de hemorragias<sup>42, 43</sup>. En este punto cabe mencionar que del veneno de *Bothrops moojeni* se ha aislado la proteasa A, de gran importancia en las lesiones vasculares, siendo una de las principales actividades de esta enzima el ataque a la gelatina<sup>44</sup>. La neutralización de esta actividad puede relacionarse con la de las proteasas involucradas en la patogenia de las hemorragias. En este caso se observó una inhibición total de la misma con los antivenenos utilizados. La inhibición de la acción proteolítica junto con la de la actividad hemorrágica ( $P < 0,001$ ), ponen en evidencia la capacidad neutralizante *in vivo* e *in vitro* de estos antivenenos sobre la actividad hemorrágica de dicho veneno.

La necrosis, otra de las características típicas de estos envenenamientos, fue inhibida totalmente ( $p < 0,001$ ) por todos los sueros.

Las hemorragias por las lesiones vasculares se ven favorecidas por la afibrinogenemia causada por la actividad procoagulante de estos venenos. En todas las pruebas realizadas se observó un retraso significativo ( $P < 0,01$ ) del tiempo de coagulación.

La inhibición por un suero de la actividad hemolítica indirecta del veneno de crotalíneos puede correlacionarse con la inhibición de la actividad de fosfolipasa A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) y con la capacidad seroneutralizante del mismo<sup>35</sup>. Por otra parte estas PLA<sub>2</sub> se relacionan (entre otras actividades) con la hipotensión y el colapso circulatorio, típicos de estos envenenamientos. La hemólisis radial, además de indicar la capacidad de los venenos de alterar las membranas eritrocitarias, permite tener idea de la actividad fosfolipásica de los venenos. La lisis es provocada por los lisofosfátidos producidos por la PLA<sub>2</sub> de los venenos sobre la membrana eritrocitaria<sup>18</sup>. En nuestro caso incubando veneno/antiveneno en una relación de 2  $\mu\text{g}/1\mu\text{l}$  hubo inhibición de esta actividad en todas las pruebas, aunque de diferente grado.

Finalmente, por la seroneutralización de la actividad letal, se puso de manifiesto que estos antivenenos protegen a los ratones contra el veneno crudo (entero) de *Bothrops moojeni*.

Aunque, hasta el momento, este veneno no se utiliza para la preparación de los sueros antiofídicos producidos en la Argentina, hay que considerar que el veneno de las *Bothrops spp.* presenta una alta reactividad cruzada que se manifiesta tanto por las pruebas *in vitro* como *in vivo*<sup>26, 27, 28, 33, 38, 40, 45, 46</sup>. De hecho, el suero antibotrópico producido en el Instituto Butantan, se desarrolla inmunizando equinos con el veneno de un reducido número de especies de *Bothrops* y el antiveneno resultante protege contra el veneno de más de 10 especies de *Bothrops*<sup>35, 37</sup>. Además, varios antivenenos polivalentes se desarrollan con un número reducido de venenos como inmunógenos y neutralizan la actividad de venenos heterólogos<sup>39, 47</sup>. Debido a esto, los resultados obtenidos respecto a la capacidad seroneutralizante, si bien eran esperados superaron expectativas previas.

Debido a los resultados de los experimentos realizados, los antivenenos probados demostraron que neutralizan la acción letal como las actividades parciales del veneno, por lo que podrían ser utilizados en los casos de accidentes ofídicos por *Bothrops moojeni*, de la forma habitual en que se utilizan para los tratamientos por *Bothrops spp.* En estos casos tras la aplicación del suero antiofídico, los únicos recaudos a tomar son los comunes frente a los casos de envenenamiento



botrópico en el tratamiento complementario, ante el riesgo de complicaciones comunes tales como el colapso hipovolémico, mionecrosis, trastornos vasculares que traen aparejadas consecuencias isquémicas con pérdida de tejido que llegan a amputaciones e insuficiencia renal, entre otras<sup>48-50</sup>.

Las complicaciones que podrían derivar de la seroterapia *per se* como reacciones de hipersensibilidad Tipos I o III, reacciones anafilactoideas<sup>51, 52</sup>, cuya aparición no es rara, deben ser consideradas<sup>12, 13, 50</sup>. En este último punto hay que mencionar que se ha visto que el veneno de *Bothrops alternatus* puede resultar alergénico *per se*<sup>53</sup> y que componentes de venenos ofídicos pueden actuar sobre el sistema complemento y otras proteínas plasmáticas activando diferentes sistemas<sup>54</sup>. Todos estos factores deben ser tomados en cuenta al instaurar la seroterapia, para prevenir o suprimir las complicaciones intrínsecas de la misma y no confundirlas con la acción propia del veneno.

Como conclusión de los estudios realizados, se puede decir que los sueros antiofídicos antibotrópicos o botrópico-crotálico producidos en el INPR los que son distribuidos gratuitamente a las Delegaciones Sanitarias del país por el Ministerio de Salud, podrían ser utilizados en los casos de accidentes ofídicos por *Bothrops moojeni* ya que neutralizan las actividades tóxicas del veneno de este ofidio.

## Summary

*Neutralizing ability of antiophidic sera against the venom of Bothrops moojeni (lance-headed viper) venom*

In the production of current therapeutic antisera used in Argentina for *Bothrops* snakebite, the *Bothrops moojeni* venom is not used as immunogen, since this snake is not considered a serious public health problem. Accidents caused by this species have not been reported in this country even though *Bothrops moojeni* is not unfrequent in some regions of Misiones. Despite the high degree of immunological cross reactivity found among the *Crotalinae* venoms and, in this particular case, among the venoms from the *Bothrops* Genus, there exists a significant intraspecific variation in venom composition, particularly in specimens arising from different geographic regions. In this study, the antivenoms prepared

at the Instituto Nacional de Producción de Biológicos A.N.L.I.S. Dr. Carlos G. Malbrán have been tested for their immunochemical cross reactivity and neutralizing ability of enzymatic and toxic activities of venom from Argentinian specimens of *Bothrops moojeni* from Misiones. Immunological cross-reactivity was tested by double-immunoprecipitation, immunoelectrophoresis, Western-blot and ELISA. Neutralizing ability of antivenoms against proteolytic, indirect hemolytic activity, procoagulant activity, hemorrhagic activity and necrotizing activity. The Lethal Dose 50 was 1.5 mg/kg body weight; this value is located in the range of those obtained with the venom from Brazilian specimens. It was observed that all the antivenoms exhibited a strong immunochemical cross reactivity and that they were able to neutralize in different degree both, enzymatic and toxic activities of *B. moojeni* venom. From these results, it can be assumed that the antivenom tested could be employed successfully in cases of *B. moojeni* snakebites.

## Bibliografía

1. de Roodt AR, Troiano JC. Identificación de las serpientes venenosas de la República Argentina. *Clínica y Producción Veterinaria* 1995; 24: 16.
2. Martino O, Mathet H, Masini RD, Ibarra Grasso A, Thompson R, Gondell C, Bosch J. Emponzoñamiento humano provocado por venenos de origen animal. *Secretaría de Salud de la República Argentina*, Buenos Aires, 1979.
3. Martínez A, Martínez RA. La presencia de una nueva especie del Género *Bothrops* en la República Argentina. *Ediciones Montoya*, Posadas, Misiones, Argentina. 1986.
4. Kouyoumdjian JA, Polizelli C. Accidentes ofídicos causados por *Bothrops moojeni*: relato de 37 casos. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 1988; 30: 424.
5. Fernandes W. Estimativas das quantidades de veneno inoculadas em uma picada por serpentes *Bothrops moojeni* e *Bothrops jararaca* (Serpentes, Viperidae). *Libro de resúmenes del II Congreso Latino-Americano de Herpetología*, Sao Paulo, Brasil, 1993.
6. Vogt AU. El por qué, cuándo, cómo y dónde de los ofidios. Buenos Aires: Américalée 1985.
7. Brandao EO, Bastos HC, Nishioka S, Portella Silveira PV. Lance-headed viper (*Bothrops moojeni*) bite wounding the eye. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*, 1993; 35: 381.
8. Gutiérrez JM, Lomonte B. Local tissue damage induced by *Bothrops* snake venoms. A Review. *Mem Inst Butantan* 1989; 51: 211.
9. Gutiérrez JM, Lomonte B. Phospholipase A2 myotoxins from *Bothrops* snake venoms. *Toxicon* 1995; 33, 1405.
10. Lomonte B, Gutiérrez JM, Furtado MF, Otero R, Rosso JP, Vargas O, et al. Isolation of basic



- myotoxins from *Bothrops moojeni* and *Bothrops atrox* snake venoms. *Toxicon*, 1990; 28: 1137.
11. Otero R, Núñez V, Osorio RG, Gutiérrez JM, Giraldo CA, Posada CA. Ability of six Latin American antivenoms to neutralize the venom of Mapaná Equis (*Bothrops atrox*) from Antioquia and Chocó (Colombia). *Toxicon*, 1995; 33: 809.
  12. Caiaffa WT, Vlahov D, Antunes CMF, Ramos de Oliveira H, Diniz CR. Snake bite and antivenom complications in Belo Horizonte, Brasil. *Trans Royal Soc Trop Med Hyg*, 1994; 88: 81.
  13. Cardoso JLC, Fan HW, Franca FOS, Jorge MT, Leite RP, Nishioka SA, et al. Randomized comparative trial of three antivenoms in the treatment of envenoming by lance-headed vipers (*Bothrops jararaca*) in São Paulo, Brazil. *Quart J Med* 1993; 86: 315.
  14. Burdmann EA, Woronik V, Prado EBA, Abdulkader RC, Saldanha LB, Barreto OCO, et al. Snakebite-induced acute renal failure: an experimental model. *Am J Trop Med Hyg* 1993; 48: 82.
  15. Sánchez EF, Freitas TV, Ferreira-Alves DL, Velarde DT, Diniz MR, Cordeiro MN, et al. Biological activities of venoms from South American snakes. *Toxicon* 1992; 30: 95.
  16. Sano-Martins, IS. Hematological disturbances induced by *Bothrops* venom. *Mem Inst Butantan* 1990; 52 (supl) 39-40.
  17. Lomonte B, Gutiérrez JM, Borkow G, Ovadia M, Tarkowski A, Hanson LA. Activity of hemorrhagic metalloproteinase BaH-1 and myotoxin II from *Bothrops asper* snake venom on capillary endothelial cells *in vitro*. *Toxicon* 1994; 32: 505.
  18. Vidal JC. Bioquímica de los venenos ofídicos. *Bol Asoc Herpetológica Argent* 1988; 4: 6.
  19. Andrade ALF, Prado Franceschi J. Cardiovascular effects caused by *Bothrops moojeni* snake venom. *Toxicon* 1992; 30: 130, 1992.
  20. Chippaux JP, Williams V, White J. Snake venom variability: methods of study, results and interpretation. *Toxicon* 1991; 29: 1279.
  21. Andrade DV, Abe AS. Toxicidade do veneno de *Bothrops moojeni* e sua relação com a variação ontogénica dieta. Libro de Resúmenes del III Congreso Latinoamericano de Herpetología, São Paulo, Brasil, 1993.
  22. Andrade DV, Abe AS. Variação ontogenética do perfil eletroforético do veneno e coloração da cauda em *Bothrops moojeni*. Libro de Resúmenes del III Congreso Latinoamericano de Herpetología, São Paulo, Brasil, 1993.
  23. OMS, 23º Informe Técnico de Patrones Biológicos, Ginebra; WHO; 1971; 37.
  24. Dolab JA, de Roodt AR, Isabetini A. Actividad de diferentes sueros antiofídicos frente al veneno de ejemplares de *Bothrops moojeni* hallados en la Provincia de Misiones. VII Congreso Argentino de Ciencias Veterinarias, Buenos Aires, 1994.
  25. Dolab JA, de Roodt AR, Ribera E, Fontanals A, Otaño P, Benavidez F. Reacción *in vitro* de diferentes antisueros de uso terapéutico frente al veneno de ejemplares de *Bothrops moojeni* hallados en la provincia de Misiones y patrones electroforéticos del mismo. X Reunión de Comunicaciones Herpetológicas, Mar del Plata, 1994.
  26. Siles Villarroel M, Furlanetto RS, Rolim Rosa R, Zelante F. Estudo eletroforético do veneno do Gênero *Bothrops*. *Mem Inst Butantan* 1973; 37: 83.
  27. Siles Villarroel MS, Furlanetto RS, Rolim Rosa R, Zelante F, Navas J. Contribuição ao estudo imunológico de venenos botrópicos III. Análise dos componentes antigenicos comuns através da dupla difusão em gel de agar. *Mem Inst Butantan* 1976/1977; 40/41: 241.
  28. Siles Villarroel MS, Zelante F, Furlanetto RS, Rolim Rosa R. Contribuição ao estudo imunológico de venenos botrópicos I. Análise comparativa dos componentes antigenicos de seis espécies de venenos frente a seus respectivos antivenenos, através das técnicas de dupla difusão e imunoelectroforese em gel de agar. *Mem Inst Butantan* 1974; 38: 13.
  29. Higashi HG, Guidolin R, Nishikawa AK, Yamaguchi IK, Lima MLSR, Morais JF, et al. Venenos botrópicos pre-tratados com inibidores ativos para os sítios enzimáticos de proteases e com substância quelante preservam seu poder imunogénico. *Mem Inst Butantan*, 1989; 51: 107.
  30. Laemmli UK. Cleavage of structural during the assembly of the head bacteriophage T4. *Nature*, 1970; 227, 680.
  31. Towbin H, Staehelin T, Gordon. Electrophoretic transfer of protein from polyacrilamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci* 1979; 76: 4350.
  32. Ferreira ML, Moura Da Silva AM, Franca FOS, Cardoso JL, Mota I. Toxic activities of venoms from nine *Bothrops* species and their correlation with lethality and necrosis. *Toxicon* 1992; 30: 1063.
  33. Ferreira ML, Moura Da Silva AM; Mota I. Neutralization of different activities of venoms from nine species of *Bothrops* snakes by *Bothrops jararaca* antivenom. *Toxicon* 1992; 30: 1591.
  34. Theakston RDG, Reid HA. "Development of simple standard assay procedures for the characterization of snake venoms. *Bull WHO*, 1983; 61: 949.
  35. Dias Da Silva W, Guidolin R, Raw I, Higashi HG, Caricatti CP, Morais JF, et al. Cross-reactivity of horse monovalent antivenoms to venoms of ten *Bothrops* species. *Mem Inst Butantan* 1989; 51: 153.
  36. Moura Da Silva AM. Caracterização de venenos de serpentes por eletroforese em poliácridamida. *Mem Inst Butantan, Bol Biotechnol* 1992; 3: 3.
  37. Caricatti CP, Guidolin R, Yamaguchi IK, Morais JF, Dias da Silva W, Higashi G. Esquema de hiperimunização equina mais conveniente a produção de plasma AV botrópico-crotálico. *Mem Inst Butantan, Bol Biotechnol* 1993; 4: 9.
  38. Moura Da Silva AM, D'Imperio Lima MR, Nishikawa AK, Brodskin CI, Dos Santos MC, Furtado MFD et al. Antigenic cross reactivity of venoms obtained from snakes of Genus *Bothrops*. *Toxicon* 1990; 28: 181.
  39. Russell FE. Snake venoms immunology: historical and practical considerations. *J Toxicol-Toxin Reviews* 1988; 7: 1.
  40. Bogarín G, Segura E, Durán G, Lomonte B, Rojas G, Gutiérrez JM. Evaluación de la capacidad de cuatro antivenenos comerciales para neutralizar el veneno de la serpiente *Bothrops asper* (Terciopelo) de Costa Rica. *Toxicon* 1995; 33: 1242.



41. Furtado M de FD, Colletto GMDD, Dias Da Silva W. Controle de qualidade dos venenos animais e dos correspondentes antivenenos. I. Padronização dos métodos de ensaio das atividades bioquímicas e farmacológicas dos venenos de algumas espécies do género *Bothrops* e *Crotalus* usando amostras secas a temperatura ambiente ou liofilizadas. *Mem Inst Butantan* 1991; 53: 149.
42. Bjarnasson JB, Fox JW. Hemorrhagic metalloproteinases from snake venoms. *Pharmac Ther* 1994; 62: 325.
43. Maruyama M, Sugiki M, Yoshida E, Shimaya K, Mihara H. Broad substrate specificity of snake venom fibrinolytic enzymes: possible role in haemorrhage. *Toxicon* 1992; 30: 1387.
44. Reichl AP, Mandelbaum F. Proteolytic specificity of moojeni protease A isolated from the venom of *Bothrops moojeni*. *Toxicon* 1993; 31: 187-94.
45. Siles Villarroel M, Rolim Rosa R, Zelante F, Guidolin R. Evidenciação em camundongos da soroneutralização paraspecífica entre venenos e antivenenos botrópicos. *Mem Inst Butantan* 1978/79, 42/43: 337.
46. de Roodt AR, Dolab JA, Fernández T, Segre L, Hajos SE. Cross reactivity of antiophidic hiperimmune sera against *Crotalus* and *Bothrops* spp. snakes venoms from Argentina. Abstract, 9th International Congress of Immunology, San Francisco, USA, 1995.
47. Mebs D, Kornalik F. Studies on the cross reactivity of snake venom antisera. *Mem Inst Butantan* 1989; 51: 127.
48. Costa Cardoso JLC. Bothropic accidents. *Mem Inst Butantan* 1990; 52 (supl): 43.
49. Pierini SV, Warrell DA, De Paulo A, Theakston RDG. High incidence of Bites and Stings by Snakes and other animals among rubber tappers and Amazonian Indians of the Juruá Valley, Acre State, Brazil, *Toxicon* 34: 225, 1996.
50. Jorge MT, Cardoso JLC, Castro SCB, Ribeiro L, Franca FOS, Sbrogio de Almeida ME, et al. A randomized blinded comparison of two doses of antivenom in the treatment of *Bothrops* envenoming in Sao Paulo, Brazil. *Trans Roy Soc Trop Med Hyg* 1995; 89: 111.
51. Secretaria de Estado da Saúde, São Paulo, Brasil Instituto Butantan. Acidentes por animais peçonhentos. Identificação, diagnóstico e tratamento, 1993.
52. Valentine MD, Lichtenstein LM. *En*, Compendio de enfermedades alérgicas e inmunológicas. *OPS/OMS, Pub Cient* Nº 153, 1989.
53. Alonso A, Scavini LM, Marino GA, Rodríguez S. Ig E antibodies against snake venoms. *J Invest Allergol Clin Immunol* 1995; 5: 31.
54. Tambourgi DV, Campos AC, Freitas MD de, Magnoli FC, Dias da Silva W, von Eickstedt VRD, et al. Manipulation of the complement system by animal venoms. *Mem Inst Butantan* 1992; 54: 9.

-----

*Today, when almost everything is made by machines, we notice little pleasure in skill except perhaps the pleasure people experience with hobbies like carpentry or the fascination of the average person when he can watch a goldsmith or weaver at his work; perhaps the fascination with a performing violinist is not caused by the beauty of the music he produces but by the display of his skill.*

Hoy, cuando casi todo es fabricado por máquinas, notamos poco placer en tener habilidades, excepto quizá el placer que la gente experimenta con hobbies como carpintería o la fascinación del hombre común cuando puede observar un orfebre o un tejedor en acción; quizá la fascinación que provoca un violinista no es solamente causada por la belleza de la música que produce sino también por la exhibición de su habilidad.

Erich Fromm (1900-1980)

*Anatomy of Destructiveness*