

# Caracterización bioquímica y toxicológica del veneno de *Crotalus durissus cumanensis* de Coro, Estado Falcón, Venezuela

## Toxinological and biochemical characterization of *Crotalus durissus cumanensis* venom from Falcón State, Venezuela

MARÍA E PINEDA, NELSON F QUIROGA, IRMA FERNÁNDEZ,  
HÉCTOR SCANNONE, ALBA M VARGAS

### Resumen

Los envenenamientos ofídicos representan un problema de salud pública en Venezuela. La especie *Crotalus durissus cumanensis* (Cdc), se encuentra distribuida ampliamente a lo largo del territorio nacional. Estudios previos han demostrado la variabilidad en los efectos tóxicos producidos por los venenos de ejemplares de esta especie, que habitan en las diferentes regiones del país. En esta investigación se caracteriza bioquímicamente y toxicológicamente el veneno de *Crotalus durissus cumanensis* de Coro, Estado Falcón, basándose en recomendaciones de la OMS. Los parámetros evaluados en ratones fueron: toxicidad aguda intraperitoneal e intravenosa, Dosis Mínima Desfibrinante (DDM), Dosis Hemorrágica Mínima (DHM) y actividad necrosante. Se realizó el perfil electroforético en geles de poliacrilamida, y se evaluaron las acciones enzimáticas sobre gelatina, BAEE y fosfolípidos. Entre los hallazgos se encuentran: DL<sub>50</sub> intraperitoneal e intravenosa de  $0,7189 \pm 0,0323$  mg/kg y  $0,5294 \pm 0,0485$  mg/kg respectivamente, con evidentes signos de neurotoxicidad, potente actividad hemorrágica con DHM de  $4,24 \pm 0,75$  µg y DDM 4 µg. No se observó actividad necrosante bajo las condiciones ensayadas. El perfil electroforético mostró 12 bandas bien definidas y distribuidas en un amplio rango de peso molecular. Se observó actividad gelatinolítica en bandas de mediano y alto peso molecular, actividad esterasa de  $309,5 \pm 34,28$  U/mg y actividad fosfolipasa de  $30,4 \pm 2,12$  U/mg. Este veneno es neurotóxico, con efectos sobre la hemostasia, destacando una elevada actividad hemorrágica. Se ratifica la importancia de investigar la variabilidad de los venenos de serpientes venezolanas, lo que permitirá un mejor abordaje terapéutico y desarrollar antivenenos más eficaces.

**Palabras clave:** Veneno de serpientes, *Crotalus durissus cumanensis*, neurotoxicidad, hemorragia.

### Abstract

Snake venom envenomations represent a public health problem in Venezuela. *Crotalus durissus cumanensis* species is widely distributed across the national territory of Venezuela. Previous studies have shown the variability on toxic effects induced by this kind of snake that inhabits at the different regions of the country. In this research, venom of *Crotalus durissus cumanensis* from Falcon state is toxinologically and biochemically characterized based on World Health Organization's recommendations. The parameters evaluated in mice were: intraperitoneal and intravenous acute toxicity, minimal defibrinating dosage (MDD), minimal hemorrhagic dosage (MHD) and necrotic activity. Electrophoretic profile in polyacrilamide gels was performed and enzymatic actions on gel, BAAE and phospholipids were evaluated. There are findings such as LD<sub>50</sub> intraperitoneal and intravenous of  $0,7189 \pm 0,0323$  mg/kg and  $0,5294 \pm 0,0485$  mg/kg respectively, with evident signs of neurotoxicity, high hemorrhagic activity with MHD of  $4,24 \pm 0,75$  µg and MDD of 4µg. Necrotic activity was not observed under the conditions assayed. The electrophoretic profile showed 12 well defined and distributed bands in a wide molecular weight range. Gelatinolytic activity in bands of medium and high molecular weight, esterase activity of  $309,5 \pm 34,28$  U/mg and phospholypase A<sub>2</sub> activity of  $30,4 \pm 2,12$  U/mg were observed. This venom is neurotoxic, with effects over haemostasis, with a remarkable and unusual hemorrhagic activity. Research the variability of the Venezuelan snakes' venoms strongly important, which will enable a better therapeutically performance, and hence to develop more efficient antivenins.

**Key words:** Snake venom, *Crotalus durissus cumanensis*, neurotoxicity, hemorrhage.

## Introducción

El accidente ofídico en Venezuela representa un problema de salud pública. Aproximadamente un 15% del total de accidentes ofídicos en nuestro país son ocasionados por serpientes del género *Crotalus* (Rodríguez-Acosta y col., 1995).

La serpiente *Crotalus durissus cumanensis* (Cdc) o Cascabel Común es la especie de *Crotalus* con mayor distribución geográfica en el país (Navarrete y col., 2009). Predomina en zonas con bajo índice pluviométrico, regiones xerófilas del piso tropical, sabanas, piedemontes de zonas secas, con temperaturas medias anuales de alrededor de 28 grados y baja humedad atmosférica (Rodríguez-Acosta y col., 1995).

Los envenenamientos atribuidos a esta especie se caracterizan por un cuadro clínico a nivel local y sistémico. Se evidencian signos y síntomas asociados a neurotoxicidad: Facies miasténica, ptosis palpebral bilateral, visión borrosa, parálisis muscular que puede, en casos graves, afectar a los músculos respiratorios y producir la muerte (Gutiérrez y col., 2008). La miotoxicidad es un hallazgo común en los envenenamientos por serpientes, para las diferentes especies de *Crotalus durissus* sudamericanas se ha descrito miotoxicidad sistémica o rabdomiolisis que origina elevaciones de la actividad sérica de la enzima cretina fosfoquinasa (CPK), mialgias y mioglobinuria (Gutiérrez y col., 2008). El cuadro fisiopatológico en estos envenenamientos también puede incluir trastornos en la coagulación, mientras que las manifestaciones locales están circunscritas a edema y dolor en el sitio de la inoculación que posteriormente puede ser sustituido por parestesia y sensación de adormecimiento (Rodríguez-Acosta y col., 1995).

La función del veneno es la inmovilización y captura de presas, además de comenzar con el proceso de digestión extracorpórea. Está compuesto principalmente por proteínas (90%-95%), entre las cuales se han descrito fosfolipasas, hialuronidasas, metaloproteasas, serinoproteasas, desintegrinas, lectinas tipo C, miotoxinas, entre otras. También pueden encontrarse carbohidratos, lípidos, aminoácidos e iones metálicos como  $Zn^{+2}$ ,  $Ca^{+2}$  y  $Mg^{+2}$ . De esta manera, los síntomas del envenenamiento ofídico son el resultado de la combinación de efectos de las diversas toxinas y enzimas que componen el veneno de la especie en estudio (Chippaux y col., 1991).

La variabilidad de los venenos de serpientes es un fenómeno ampliamente estudiado y se han descrito variaciones en su composición de acuerdo a factores como sexo, edad, dieta y región geográfica de origen del ejemplar, que pueden tener impacto en el

tratamiento de las víctimas y en la selección de especímenes para la producción de antídotos (Calvete y col., 2009). En este sentido las especies de nuestro país no son una excepción y para el veneno de *Crotalus durissus cumanensis*, se ha demostrado que existen importantes diferencias en la composición de los venenos de esta especie, provenientes de diferentes regiones del territorio venezolano en cuanto a sus propiedades toxicas, bioquímicas e inmunológicas (Vargas 1998 y Aguilar y col., 2007).

La presente investigación tiene como objetivo la caracterización bioquímica y toxinológica del veneno de *Crotalus durissus cumanensis* de Coro, Estado Falcón, en base a las recomendaciones de la Organización Mundial de la Salud (Theakston y col., 2003), las cuales buscan establecer datos toxicológicos de relevancia clínica para el tratamiento de estos envenenamientos y en el desarrollo de antiveninas más eficaces.

## Materiales y métodos

### VENENO

El veneno fue obtenido por ordeño manual de ejemplares adultos de *Crotalus durissus cumanensis*, colectados en la región de Coro, Estado Falcón. El veneno se cristalizó al vacío presencia de  $CaCl_2$ , y se mantuvo a 4°C hasta su posterior uso.

### ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN

Se utilizaron ratones de la cepa NHI (National Health Institute), machos, de 20 a 22 g suministrados por el Bioterio del Instituto Nacional de Higiene «Rafael Rangel». Los animales se mantuvieron en jaulas en condiciones de temperatura ambiental y luz natural, con agua y comida *at libitum* desde su llegada al laboratorio, hasta el momento del ensayo.

### DETERMINACIÓN DE TOXICIDAD AGUDA: SIGNOS DE TOXICIDAD Y DL50

Se determinó la Dosis Letal 50 (DL<sub>50</sub>) del veneno según la metodología sugerida por la Organización Mundial de la Salud (WHO 2010). Los animales se repartieron en grupos experimentales de cinco ratones cada uno. A cada animal se le inyectó 0,2 ml de diferentes diluciones de veneno preparadas en solución fisiológica (NaCl 0,85%) por vía intravenosa e intraperitoneal. El grupo control se trató con solución fisiológica. Los animales se observaron por 48 horas registrándose el número de muertes durante ese período y los signos de toxicidad evidenciados en los primeros minutos postinoculación.

### DETERMINACIÓN DE DOSIS HEMORRÁGICA MÍNIMA (DHM)

De acuerdo con Gutiérrez y col. (1985), la Dosis Hemorrágica Mínima (DHM) se define como la mínima cantidad de veneno que induce un área hemorrágica de 10 mm de diámetro dos horas después de su inoculación por vía intradérmica en ratones. Se prepararon dosis seriadas de veneno en solución fisiológica, de las cuales se inyectó 0,1 ml en la región abdominal por vía intradérmica a grupos de cinco ratones cada uno. El grupo control se trató con solución fisiológica. Dos horas luego de la inoculación se sacrificaron los animales por dislocación cervical y se removió la piel para medir el área hemorrágica en la cara interna de la misma.

### DOSIS DESFIBRINANTE MÍNIMA (DDM)

Para esta determinación se siguió el método de Gene y col., 1989. Diferentes diluciones de veneno preparadas en solución fisiológica (0,2 ml), se inyectaron por vía endovenosa a grupos de cinco ratones cada uno. Luego de transcurrida una hora de la inoculación, se extrajo sangre, bajo anestesia con éter dietílico, del plexo axilar de cada uno de los animales de experimentación. Las muestras se mantuvieron en tubos de vidrio por dos horas a temperatura ambiente. Una vez transcurrido ese tiempo se observó si hubo o no formación de coágulo. La Dosis Mínima Desfibrinante (DDM) (Gené y col., 1989), se define como la mínima cantidad de veneno que indujo incoagulabilidad en todos los ratones inoculados.

### ACTIVIDAD NECROSANTE

La determinación de la CPK, se realizó empleando un StatFax® y un kit comercial (Stanbio CK, Liquid-UV®), que mide los incrementos en la absorbancia a 340 nm del NADPH formado por minuto, en un sistema enzimático acoplado que determina la fosforilación del ADP al ATP catalizada por la CPK. Para determinar dicha actividad, se inocularon por vía intramuscular grupos de 6 ratones, con una dosis subletal de 10 µg de veneno disuelto en 0,1 ml de solución fisiológica. Posteriormente a diferentes intervalos de tiempo post-inoculación, desde 1h hasta 96h, se obtuvo el suero de los animales a partir de sangre obtenida del plexo solar, bajo anestesia con éter dietílico. Adicionalmente se dispuso de dos grupos control de 6 ratones cada uno: un grupo denominado Control No Tratado (CNT), correspondiente al suero de animales sanos, que no recibieron tratamiento alguno y un grupo denominado Control Salino, correspondiente a animales tratados con 0,1 ml de solución fisiológica, cada uno.

### ELECTROFORESIS EN UNA DIMENSIÓN

Se realizó según Laemmli (1970) empleando geles al 12% de poliacrilamida. Las muestras se disolvieron en Tris 0,5M pH 6,8, SDS 10%, glicerol 1%, azul de bromofenol 0,02% a una concentración de 3 µg/µl. Una alícuota de 5 µl y otra de marcadores preteñidos de amplio rango de peso molecular (BIO-RAD. CA, USA) se sembraron en el gel. La electroforesis se llevó a cabo a 100V hasta completar la corrida en una cámara Mini-Protean3® (BIO-RAD CA, USA). Una vez obtenido el gel, se sometió a tinción de Coomassie G-250 y digitalizó en un densitómetro GS800 (BIO-RAD CA, USA), empleando el software Quantity ONE® (BIO-RAD. CA, USA) para la estimación del peso molecular de las bandas obtenidas.

### ACTIVIDAD FOSFOLIPASA

Se realizó según el método propuesto por Yang y King (1980), utilizando una solución valorada de Hidróxido de Sodio 0,01N con el fin de titular los ácidos grasos liberados a partir de un sustrato compuesto por una emulsión de yema de huevo, 2,7 mM de desosicolato de sodio y 20 mM CaCl<sub>2</sub>, por la acción de fosfolipasas A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) presentes en el veneno, por unidad de tiempo a pH 8,0 y temperatura ambiente, mediante un titulador automático TIM 840 TriLab® (Radio Meter). Una unidad de actividad enzimática se define como la liberación de 1µEq de ácido graso por minuto por mg de veneno.

### ACTIVIDAD ESTERASA SOBRE N-BENZOIL-L-ARGININ ETIL ÉSTER (BAEE)

Se empleó el método propuesto por Tu y col., en 1965. El sustrato se disolvió en solución de fosfato 0,0667 M a pH 7,0 para una concentración final de 0,25 mM, mientras que del veneno se realizaron diferentes diluciones en solución fisiológica. Durante cada determinación se incubaron 2,9 ml de sustrato y 0,1 ml de la dilución de veneno a ensayar. Se registró la variación de la absorbancia a 253 nm cada 30 segundos en un espectrofotómetro UV/Vis DU®530 (Beckman Coulter), durante seis minutos. La actividad enzimática se calculó a partir de la ecuación:

$$\text{Unidades esterasa/mg} = \frac{\Delta \text{abs}_{253\text{nm}}/\text{min} \times 1000}{\text{mg veneno}}$$

### ACTIVIDAD PROTEOLÍTICA SOBRE GELATINA

Se siguió la metodología propuesta por Terra y col. (2009). Para ello se prepararon geles de poliacrilamida al 12,5% copolimerizada con gelatina al 1%.

Las muestras se prepararon a una concentración de 2 µg/µl y se corrieron según lo indicado para la electroforesis en una dimensión. Posteriormente el gel se trató con Tritón X-100 al 2,5% en agitación por una hora a temperatura ambiente, se lavó con agua bi-distilada y se incubó a 37°C por 18 horas en Tris-HCl 20 mM pH 8.0, NaCl 150 mM, CaCl<sub>2</sub> 5mM.

La actividad proteolítica sobre gelatina, se evidenció, por la presencia de zonas de degradación en el gel, las cuales se presentaron como áreas translucidas sobre un fondo azul, generado por tinción en Azul de Coomasie R-250.

#### ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los resultados fueron expresados COMO LA MEDIA ± la desviación estándar. Se utilizó regresión lineal o análisis de varianza aplicando la prueba de Student-Newman-Keul con una significancia de p<0,05.

### Resultados

#### DETERMINACIÓN DE TOXICIDAD AGUDA:

##### SIGNOS DE TOXICIDAD Y DL<sub>50</sub>

Los valores de DL<sub>50</sub> intraperitoneal e intravenosa obtenidos, se resumen en la Tabla I. La totalidad de los ratones inoculados con una dosis de 17,77 µg, mostraron a los pocos minutos de inyección, signos de aparente neurotoxicidad, los cuales se resumen en la Tabla II.

**Tabla I**

#### DL<sub>50</sub> del veneno de *Crotalus durissus cumanensis* de diferentes regiones del país

Región (Estado)	Resultados mg/kg	Referencia
Porshoure (Zulia)	0,210 ip	Pirela y col., 2006
Santa Teresa (Miranda)	0,43 ip	Aguilar y col., 2007
Margarita (Nueva Esparta)	0,0741 ip, 0,098 iv	Vargas y col., 2012
Guarenas (Miranda)	0,66 ip	Aguilar y col., 2007
Maracay (Aragua)	0,66 ip	Aguilar y col., 2007
Clarines (Anzoátegui)	1,143 ip, 0,666 iv	Grillo y col., 1974
Lagunetica (Miranda)	0,86 ip	Aguilar y col., 2007
Carrizales (Miranda)	0,86 ip	Aguilar y col., 2007
<b>Coro (Falcón)</b>	<b>0,72 ip, 0,53 iv</b>	<b>Presente trabajo</b>

ip = vía intraperitoneal, iv= vía intravenosa. N=5.

#### DETERMINACIÓN DE DOSIS HEMORRÁGICA MÍNIMA (DHM)

Este veneno mostró tener la capacidad de producir una lesión hemorrágica a nivel local en los animales tratados, con una DHM de 4,24 ± 0,75 µg (Tabla III).

**Tabla II**

#### Signos de intoxicación aguda en ratones originados por el veneno de *Crotalus durissus cumanensis* Coro, Edo. Falcón

- Parálisis flácida del tren posterior
- Taquicardia paroxística
- Ataxia
- Exoftalmos seguido de ptosis palpebral
- Convulsiones tónico clónicas
- Contractura en extremidades anteriores
- Sialorrea
- Relajación del esfínter vesical

**Tabla III**

#### Dosis Hemorrágica Mínima del Veneno de *Crotalus durissus cumanensis* de diferentes regiones del país

Región (Estado)	Resultados (µg)	Referencia
Villa del Rosario (Zulia)	24 ± 1,8	Saravia y col., 2002
Porshoure (Zulia)	78,22 ± 2,18	Pirela y col., 2006
Santa Teresa (Miranda)	NA	Aguilar y col., 2007
Margarita (Nueva Esparta)	70	Vargas y col., 2012
Guarenas (Miranda)	NA	Aguilar y col., 2007
Maracay (Aragua)	NA	Aguilar y col., 2007
Lagunetica (Miranda)	4,1	Aguilar y col., 2007
Carrizales (Miranda)	16,2	Aguilar y col., 2007
Guayuta (Monagas)	NA	Vargas y col., 1997
Guri (Bolívar)	NA	Vargas y col., 1997
<b>Coro (Falcón)</b>	<b>4,24 ± 0,75</b>	<b>Presente trabajo</b>

NA = No actividad, ± Desviación estándar

#### DOSIS DESFIBRINANTE MÍNIMA (DDM)

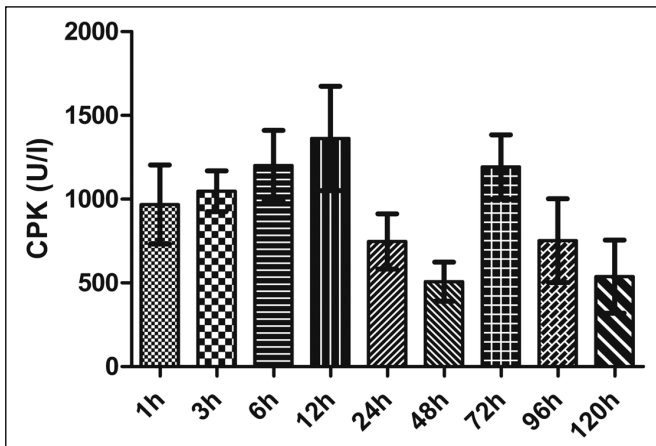
El veneno de *Cdc* de Coro ocasionó incoagulabilidad de la sangre en ratones tratados, con una dosis desfibrinante mínima de 4 µg.

#### ACTIVIDAD NECROSANTE

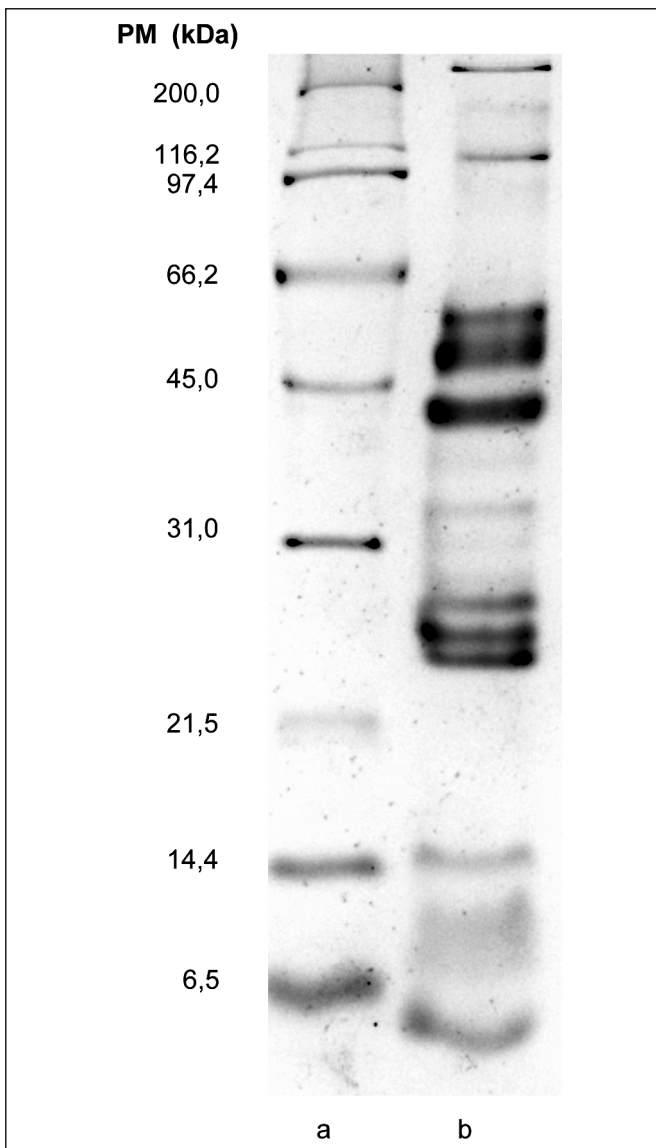
A la dosis e intervalos de tiempo ensayados, no se observó diferencias significativas de la actividad sérica de la CPK en los animales de experimentación, en comparación con los controles (Figura 1).

#### ELECTROFORESIS EN UNA DIMENSIÓN

La Figura 2 ilustra el comportamiento electroforético de las proteínas presentes en el veneno. Se observó la presencia de 12 bandas bien definidas y distribuidas en un amplio rango de peso molecular:



**Figura 1. Concentración sérica de CPK en suero de ratones inoculados con veneno de *Crotalus durissus cumanensis* de Coro, estado Falcón a diferentes intervalos de tiempo post-inoculación (N=6 por grupo). CNT: animales controles no tratados, CS: animales tratados con solución fisiológica. Los valores representan la media  $\pm$  E.E.M.**



**Figura 2. Electroforesis en una dimensión del veneno de *Crotalus durissus cumanensis* de Coro, estado Falcón: a) Marcador de peso molecular, b) Veneno. 15  $\mu$ g de veneno.**

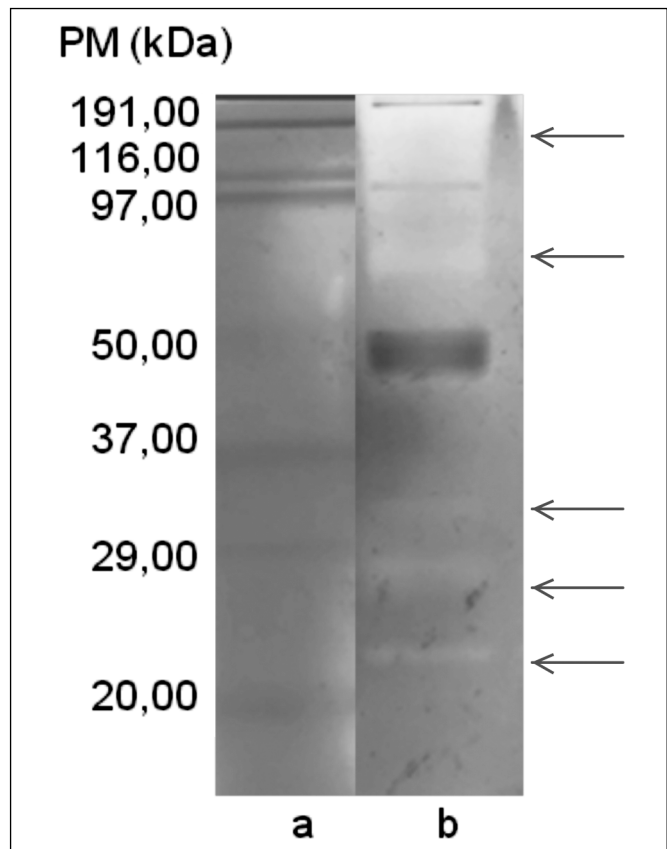
219, 104, 57, 49, 43, 34, 27, 25, 24, 15, 10 y 4,6 kDa. Las de mayor intensidad se ubican en el rango de mediano peso molecular de 24-57 kDa.

**ACTIVIDAD FOSFOLIPASA Y SOBRE N-BENZOIL-L-ARGININ ETIL ÉSTER (BAEE)**

La actividad catalítica sobre fosfolípidos resultó de  $30,4 \pm 2,12$  U/mg, mientras que sobre BAEE fue de  $309,5 \pm 34,28$  U/mg.

**ACTIVIDAD PROTEOLÍTICA SOBRE GELATINA**

La Figura 3 ilustra la acción proteolítica de componentes de alto y mediano peso molecular sobre la gelatina. Entre 20 y 29 kDa se observan dos bandas de degradación; entre 37 y 50 kDa hay un área de menor proteólisis; entre 50 kDa y 97 kDa se observa un área definida de degradación y por encima de los 97 kDa se observó un área de degradación difusa que abarca toda la región de alto peso molecular.



**Figura 3. Actividad proteolítica sobre gelatina del veneno de *Crotalus durissus cumanensis* de Coro, estado Falcón: a) Marcador de peso molecular, b) 4  $\mu$ g de Veneno. Las flechas señalan las áreas de degradación descritas en el texto.**

**Discusión**

Al comparar el valor de  $DL_{50}$  obtenido por vía intraperitoneal del veneno de *Crotalus durissus cumanensis* de Coro, estado Falcón, con otros reportados para serpientes de la especie *Cdc* de otras regiones,

se observa una menor capacidad letal con respecto a venenos provenientes de la Guajira, Edo. Zulia; Santa Teresa, Edo. Miranda y Margarita, Edo. Nueva Esparta (Tabla I). Sin embargo, el valor obtenido durante este trabajo es similar a lo reportado para venenos provenientes de Guarenas, Edo. Miranda y Maracay, Edo. Aragua, mientras que resultó ser más tóxico que los venenos provenientes de Clarines, Edo. Anzoátegui y; Lagunetica y Carrizales, Edo. Miranda. La  $DL_{50}$  por vía intravenosa, resultó menor al compararla con la reportada para los venenos de Clarines, pero mayor a la reportada para el veneno de Margarita (Tabla I). Los animales tratados con las mayores dosis durante los experimentos de la  $DL_{50}$ , mostraron signos que sugieren un cuadro neurotóxico para este veneno (Tabla II). Cabe destacar, que la neurotoxicidad ha sido reportada extensamente para los venenos crotálicos, incluyendo los venenos venezolanos (Gutiérrez, 2002; Vargas, 1998) y dicho efecto ha sido relacionado principalmente con la presencia de una neurotoxina denominada «crotoxina» la cual, está formada por un complejo bimolecular donde se encuentran unidas de forma no covalente una  $PLA_2$  de carácter básico con actividad neurotóxica, miotóxica y edematizante, y una proteína no tóxica denominada crotapotina, que consta de tres polipeptidos unidos por enlaces disulfuro y que funge como chaperona, potenciando la acción tóxica de la  $PLA_2$  (Georgieva y col., 2010).

En la electroforesis de este veneno, se observan dos bandas de poca intensidad, con respecto al resto de las bandas evidenciadas, con pesos aproximados de 15 kDa y 10 kDa, que podrían corresponderse con la fosfolipasa  $A_2$  de carácter básico de la crotoxina, cuyo peso molecular, se ha estimado entre 13 y 15,8 kDa y con la crotapotina de peso molecular entre 8 y 10 kDa (Habermann y Breithaupt, 1977). El bajo nivel de expresión de las bandas con pesos similares a las de crotoxina en el veneno de *Cdc* de Coro, evidenciado en la electroforesis y la discreta actividad  $PLA_2$  ( $30,4 \pm 2,12$  U/mg), en comparación con la reportada para el veneno de Clarines (Grillo y col., 1974) y Margarita (Vargas y col., 2012) de 80 y 137.34 U/mg respectivamente, podrían explicar el mayor valor de la  $DL_{50}$  para el veneno de *Cdc* de Coro y su escasa miotoxicidad, con respecto al veneno de *Cdc* de otras regiones del país.

Durante esta investigación no se observó en los animales de experimentación parálisis espástica del tren posterior a las dosis ensayadas, característica de la acción de la crotamina (Ogiura y col., 2005). Esta es una potente toxina con actividad sobre los canales de  $Na^+$  operados por voltaje, localizados en el sarcolema del músculo esquelético, que lleva a degene-

ración de las fibras musculares (Toyama y col., 2003). Se ha reportado que para algunos venenos de *Crotalus durissus* considerados como «crotamina negativos», los efectos de la crotamina no se evidencian al inocular el veneno en animales de experimentación; sin embargo, cuando se inoculan algunas de sus fracciones, los efectos de la crotamina se hacen evidentes, lo cual probablemente se debe al apantallamiento de sus efectos por componentes más tóxicos de estos venenos (Vargas, 1998). En nuestro caso, la electroforesis en una dimensión, revela una banda claramente definida de aproximadamente 4,8 kDa que se aproxima al peso molecular de la crotamina, estimado entre 4,5 y 5,0 kDa (Toyama y col., 2003), por lo que no podemos descartar la posible presencia de esta neurotoxina/miotoxina en el veneno de *Cdc* de Coro, la cual podría ponerse en evidencia al fraccionar este veneno.

Destaca en este veneno, el hallazgo de una elevada capacidad hemorrágica local, evidenciada en la piel de los ratones tratados. Este efecto hemorrágico no es característico de los *Crotalus durissus* suramericanos (Aguilar y col., 2007). Este veneno se presenta como uno de los venenos de *Crotalus* venezolanos, más hemorrágicos (Tabla III).

El efecto hemorrágico local junto al efecto gelatinolítico evidenciado en el zimograma podrían sugerir la presencia de proteasas capaces de degradar colágeno, componente fundamental de la membrana basal del endotelio vascular, esta actividad ha sido frecuentemente relacionada con Metaloproteasas de Venenos de Serpientes (MPVS) dependientes de zinc (Terra y col., 2009) las cuales han sido descritas en un amplio rango de peso molecular el cual depende del número de dominios que contengan (Terra y col., 2009). Se ha descrito que el mecanismo de acción hemorrágico de estas enzimas ocurre en dos etapas, en primer lugar hay una degradación selectiva de componentes de matriz extracelular como diferentes formas de colágeno (tipo IV, tipo VI, fibrilar, etc), laminina y fibronectina, que debilita el entramado que conforma la membrana basal endotelial, seguida por su distensión y ruptura por fuerzas hemodinámicas (Escalante y col., 2011).

La DDM obtenida para el veneno de *Cdc* de la región de Coro, pone en evidencia trastornos en la homeostasia originados por la acción de este veneno en uno o más factores de la coagulación, que llevan a un cuadro de incoagulabilidad sanguínea. Gene y col. (1989) han relacionado esta actividad desfibrinante, con la acción de enzimas similares a la trombina las cuales han sido reportadas extensamente en venenos de ejemplares de la familia Viperidae (Gutiérrez, 2002).

La evaluación de la actividad sobre BAEE, reveló que este veneno posee actividad hidrolítica sobre ésteres de arginina. Dicha actividad, se ha reportado para venenos de otras especies de serpientes de la familia Viperidae, como *Bothrops venezuelensis* (López y col., 1999), *Lachesis muta* (Aragon-Ortiz y Gubensek, 1993) y para *Crotalus durissus cumanensis* de Clarines, Guayuta, Distrito Capital y Guri (Vargas, 1998). Samel y col. (1987) han relacionado esta actividad esterasa con acciones que incluyen: activación del Factor V de la coagulación, actividad similar a trombina, actividad fibrinolítica y cinogenasa.

## Conclusiones y recomendaciones

El veneno de *Crotalus durissus cumanensis* de la región de Coro, estado Falcón, mostró tener una actividad neurotóxica característica del género *Crotalus*, además de efectos sobre la hemostasia, dentro de los que destaca una elevada actividad hemorrágica a nivel local. Este es el primer estudio del veneno de *Cdc* de esta región y ratifica la necesidad e importancia de la investigación sobre la variabilidad intraespecies de los venenos de serpientes venezolanas, lo que permitirá un mejor abordaje terapéutico a los pacientes envenenados y el desarrollo de antivenenos más eficaces, por lo cual estos estudios deben ser profundizados, con el fin de determinar las toxinas presentes en este veneno, para poder establecer correlación con los efectos observados.

## Agradecimientos

Los autores agradecen al Instituto de Investigaciones Farmacéuticas de la Universidad Central de Venezuela por el apoyo institucional y económico al proyecto I.I.F 06/2013.

## Referencias bibliográficas

- Aguilar I, Guerrero B, Salazar AM, Girón ME, Pérez J, Sánchez E, Rodríguez-Acosta A. 2007. Individual venom variability in the South American rattlesnake *Crotalus durissus cumanensis*. *Toxicon* 50:214-224.
- Aragon-Ortiz F, Gubensek F. 1993. A thrombin-like enzyme from bushmaster (*Lachesis muta stenophrys*) venom. *Toxicon* 31:1435-1443.
- Calvete JJ, Sanz L, Angulo Y, Lomonte B, Gutiérrez JM. 2009. Venoms, venomics, antivenomics. *FEBS Lett* 583(11):1736-1743.
- Chippaux JP, Williams V, White J. 1991. Snake Venom Variability: Methods of study results and interpretation. *Toxicon* 29:1279-1303.
- Escalante T, Rucavado A, Fox J, Gutiérrez JM 2011. Key events in microvascular damage induced by snake venom hemorrhagic metalloproteinases. *J Proteomics* 74(9):1781-1794.
- Gene JA, Roy A, Rojas G, Gutiérrez JM, Cerdas L. 1989. Comparative study on the coagulant, desfibrinating, fibrinolytic, and fibrinogenolytic activities of Costa Rican crotalinae snake venoms and their neutralization by a polyvalentantivenom. *Toxicon* 27: 841-848.
- Georgieva D, Öhler M, Seifert J, von Bergen, M, Arni R, Genov, N, Betzel N. 2010. Snake Venomic of *Crotalus durissus terrificus*. Correlation with Pharmacological Activities. *J Proteome Res* 9(5):2302-2316.
- Grillo O, Scannone H, Parra N. 1974. Enzymatic activities another characteristics of *Crotalus durissus cumanensis* venom. *Toxicon* 12: 297-302.
- Gutiérrez JM. 2002. Comprendiendo los venenos de serpientes: 50 años de investigaciones en América Latina. *Rev Biol Trop* 50(2): 377-394.
- Gutiérrez JM, Gené JA, Rojas G, Cerdas L. 1985. Neutralization of proteolytic and hemorrhagic activities of Costa Rican snake venoms by a polyvalentantivenom. *Toxicon* 23: 887-893.
- Gutiérrez JM, Ponce-Soto LA, Marangoni S, Lomonte B. 2008. Systemic and local myotoxicity induced by snake venom group II phospholipases A2: comparison between crotoxin, crotoxin B and a Lys49 PLA2 homologue. *Toxicon* 51:80-92.
- Habermann E, Breithaupt H. 1978. Mini-review the crotoxin complex-An example of biochemical and pharmacological protein complementation. *Toxicon* 16:19-30.
- Laemli UK. 1970. Cleavage of structural proteins during the assemble of the head bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
- López JC, Vargas AM, Scannone H, Fernández I. 1999. Estudio cromatográfico, electroforético y enzimático del veneno total y fracción I del veneno de la serpiente venezolana *Bothrops venezuelensis* (Tigra Mariposa). *Revista Científica, FCV-LUZ IX(4):314-320.*
- Navarrete L, López-Johnston JC, Blanco A. 2009. Guía de las Serpientes de Venezuela: Biología, venenos, conservación y listado de especies. Edición del Zoológico Ecopets C.A. ISBN 978-980-12-3624-5. 103 pp.
- Oguiura N, Boni-Mitake M, Rádis-Baptista G. 2005. New view on crotoxin, a small basic polypeptide myotoxin from South American rattlesnake venom. *Toxicon* 46: 363-70.
- Pirela R, López JC, Hernández J. 2006. Caracterización toxicológica del veneno total de la serpiente de cascabel *Crotalus durissus cumanensis* (Viperidae), presente en la localidad de Porshoure, Guajira venezolana. *Revista Científica, FCV-LUZ / Vol. XVI, N° 3, 232-238.*
- Rodríguez-Acosta A, Mondolfi A, Orihuela R, Aguilar M. 1995. ¿Qué hacer frente a un accidente ofídico? *Vendiciones, C.A.* 46 pp.

- Samel M, Siigur E, Siigur J. 1987. Purification and characterization of two arginine ester hydrolases from *Vipera berus berus* (common viper) venom. *Toxicon*. 25: 379-88.
- Saravia P, Rojas E, Arce V, Guevara C, López JC, Chávez E, Rojas G, Gutiérrez JM. 2002. Geographic and ontogenic variability in the venoms of the neotropical rattlesnake *Crotalus durissus*: pathophysiological and therapeutic implications. *Rev Biol Trop* 50(1): 337-346.
- Theakston R, Warrell D, Griffith E. 2003. Report of a WHO workshop on the standardization and control of antivenoms. *Toxicon* 41: 541-557.
- Terra R, Pinto A, Guimaraes J, Fox J. 2009. Proteomic profiling of snake venom metalloproteinases (SVMPs): Insights into venom induced pathology. *Toxicon* 54: 836-844.
- Toyama MH, Marangoni S, Novello JC, Leite GB, Prado-Franceschi J, da Cruz-Höfling MA, Rodrigues-Simioni L. 2003. Biophysical, histopathological and pharmacological characterization of crotoamine isoforms F22 and F32. *Toxicon* 41:493-500.
- Tu AT, James G, Chua A. 1965. Some biochemical evidence in support of the classification of venomous snakes. *Toxicon* 3: 5-8.
- Vargas AM. 1998. Caracterización bioquímica y toxicológica del veneno de la serpiente venezolana *Crotalus durissus cumanensis* de diferentes regiones de Venezuela. Universidad Central de Venezuela. Trabajo de Ascenso para la categoría de Profesor Agregado.
- Vargas AM, Pineda ME, Fernández I, Scannone H. 2012. Caracterización bioquímica y toxicológico del veneno de *Crotalus durissus cumanensis*, Isla de Margarita, Nueva Esparta. 1° Congreso Venezolano de Ciencia Tecnología e Innovación LOCTI-PEI. Caracas.
- World Health Organization. 2010. WHO Guidelines for the Production, Control and Regulation of Snake Antivenom Immunoglobulins. Serie de Reportes Técnicos. Ginebra 135 pp.
- Yang CC, King K. 1980. Chemical modification of the histidine residue in phospholipase A2 from the *Hemachatus haemachatus* snake venom. *Toxicon* 18: 529-47.