



Universidad Nacional del
Nordeste

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales y Agrimensura

TRABAJO FINAL DE GRADUACIÓN

“Caracterización bioquímica del veneno de *Crotalus durissus* terrificus de diferentes regiones de Argentina”



Licenciatura en ciencias biológicas

Autor: Beber David de Jesús

Director: Dr. Luciano S. Fusco

Co-Directora: Lic. Cinthia C. Calamante

LABORATORIO DE INVESTIGACIÓN EN PROTEÍNAS (LabInPro)

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, a la Universidad Nacional del Nordeste, que me aceptó y me formó durante el transcurso de la carrera y a todos los docentes que formaron parte, brindándome sus conocimientos y aconsejándome siempre para bien.

A mi director Dr Luciano Fusco, Co-Directora Lic. Cinthia Calamante, por haberme brindado sus conocimientos, como así también dedicando su tiempo día a día para enseñarme, aconsejarme, ayudándome siempre a evitar la frustración de pensar que nunca terminara y teniendo toda la paciencia para guiarme durante el desarrollo de la tesis.

Al Laboratorio "LabInPro" y todas las personas que forman parte del mismo, por haberme abierto sus puertas y permitido ser parte del equipo, ya que son increíbles personas que sin tener obligación siempre me ayudaron y brindaron sus conocimientos ofreciéndome todas las herramientas necesarias para poder llevar a cabo mi trabajo final. Al doctor Adolfo de Roodt por su contribución y apoyo.

A quienes recorrieron junto a mí este hermoso camino universitario, mis compañeros de estudio y amigos que siempre me dieron las fuerzas necesarias para seguir adelante.

Por último y para no extenderme tanto, agradezco a mi familia, quienes me formaron como persona y me brindaron todo su apoyo para poder llegar hasta este momento único estando siempre presentes y haciendo lo posible para que no me falta nada y hacer más llevadero este camino. Sin ellos nada hubiese sido posible.

Gracias.

ÍNDICE ANALÍTICO

1. Resumen	4
2. Introducción	5
2.1 Descripción e historia natural.....	5
2.2 Distribución.....	6
2.3 Veneno.....	7
2.4 Variación de coloración del veneno.....	8
2.5 Antecedentes.....	8
3. Objetivos	9
3.1 Objetivo general.....	9
3.2 Objetivos específicos.....	9
4. Hipótesis	9
5. Materiales y métodos	10
5.1 Veneno.....	10
5.2 Caracterización de veneno de <i>C. dterrificus</i>	10
5.2.1 Cuantificación de proteínas por el método de Bradford	10
5.2.2 Hemólisis Radial Indirecta	10
5.2.3 Actividad coagulante.....	10
5.2.4 Actividad fosfodiesterasa (PDE)	10
5.2.5 Actividad L-amino oxidasa (LAAO)	10
5.2.6 Electroforesis SDS-PAGE	11
5.2.7 Citotoxicidad.....	11
5.3 Análisis estadístico.....	11
6. Resultados	16
6.1 Actividad Fosfolipasa A ₂	12
6.2 Serino/proteasa.....	12
6.3 Fosfodiesterasas (PDE).....	13
6.4 L-aminoácido oxidasa.....	14
6.5 Citotoxicidad.....	14
6.6 Electroforesis SDS-PAGE.....	15
7. Discusión	16
8. Conclusión	18
9. Bibliografía	19

1. RESUMEN:

En América del Sur existen diversas especies de serpientes que pueden provocar un envenenamiento ofídico grave, entre ellas *Crotalus durissus terrificus*, (serpiente cascabel), responsable de la mayor parte de las muertes por accidente ofídico en Sudamérica. En Argentina, esta especie de importancia médica sanitaria es responsable del 2% de los accidentes ofídicos. Su veneno posee actividad neurotóxica y miotóxica sistémica y a diferencia de otras serpientes de la familia Viperidae, carece de actividad proteolítica por lo que no origina alteraciones hemorrágicas.

Diversas investigaciones describen la variación en las características bioquímicas de los venenos en ejemplares de *Crotalus* proveniente de diferentes regiones geográficas de Brasil, con las implicaciones clínicas y terapéuticas que esto conlleva. Estudios recientes identificaron los principales componentes del veneno crotálicos de especímenes de Corrientes crotamina, convulxina, serino proteasas o enzima semejante a trombina, L-aminoácido oxidasa y fosfodiesterasa y el complejo crotoxina formado por fosfolipasas y crotapotin.

En el presente trabajo se caracterizaron venenos de especímenes provenientes de diferentes regiones fitogeográficas de Argentina, utilizando venenos obtenidos de especímenes adultos de *Crotalus durissus terrificus* de diferentes regiones. Se realizaron pruebas bioquímicas para caracterizar los venenos, incluyendo la cuantificación de proteínas, Hemólisis Radial Indirecta, Actividad coagulante, Actividad fosfodiesterasa, Actividad L-amino oxidasa, Electroforesis SDS-PAGE y la evaluación de la citotoxicidad. Cada experimento se replicó tres veces y los resultados se presentaron en términos de media \pm desviación estándar. Se aplicó un análisis estadístico a los resultados obtenidos.

Para llevar a cabo los ensayos pertinentes, se contó con un total de ocho muestras de veneno obtenidas de especímenes adultos de *Crotalus durissus terrificus*, provenientes de diversas regiones fitogeográficas de Argentina, distrito de las selvas mixtas (Selva Paranaense) (M4 y 7), distrito oriental húmedo (Provincia chaqueña) (M1, 6, 5 y 8) y el distrito del cardonal (Provincia de monte) (M2 y 3). Los venenos fueron disecados y conservados a -20°C, posteriormente fueron diluidos en una solución de tampón de fosfatos con un pH de 7,2 al momento de su utilización.

2. INTRODUCCIÓN

2.1. DESCRIPCIÓN E HISTORIA NATURAL.

La familia Viperidae incluye 53 especies del género *Crotalus* (Uetz 2023) distribuidas en gran parte de América del norte, América central y en América del sur hasta el centro de Argentina (Williams *et al.* 2021). Para la especie *Crotalus durissus* se consideran actualmente seis subespecies, de las cuales la única que habita nuestro país es *Crotalus durissus terrificus* (Laurenti 1768) (Williams *et al.* 2021) (Fig. 1). Esta es una serpiente de gran tamaño, que frecuentemente supera un metro de longitud, llegando en ocasiones a 1.80 m total. La cabeza es deprimida, con cuello marcado lo que la diferencia del resto del cuerpo. Este está cubierto por escamas romboidales fuertemente carenadas. La región caudal finaliza en un apéndice córneo (crótalo) característico.

Frecuenta ambientes de monte “sucio” (Meneghel. 1993b) (Williams *et al.* 2021), zonas pedregosas, generalmente en quebradas, pero puede encontrarse también en zonas altas con pedregales y escasos arbustos. En ambos casos prefiere regiones tranquilas de poco tránsito humano. No es una especie particularmente agresiva y los accidentes provocados son muy escasos, ya que cuando se siente amenazada produce un sonido característico de advertencia, agitando rápidamente el apéndice córneo de la región caudal. Esta “advertencia” permite generalmente que sea un animal visible o al menos localizable y se eviten accidentes.

Son de hábitos nocturnos, aunque se pueden hallar activas durante la mañana y el medio día (Argentina y Uruguay). La dieta se basa fundamentalmente en roedores, aunque puede ingerir otros mamíferos e incluso aves. Estas serpientes son vivíparas, con un ciclo reproductivo extenso (Almeida-Santos y Salomao, 1997 en Williams *et al.* 2021).



Figura 1: *Crotalus durissus terrificus*. Cortesía de Cinthia C. Calamante

2.2. DISTRIBUCIÓN.

La distribución de esta serpiente es muy amplia, en Argentina se encuentra en (Chaco, Catamarca, Córdoba, Corrientes, Entre Ríos, Formosa, Jujuy, La Rioja, Mendoza, Misiones, Salta, San Juan, San Luis, Santa Fe, Santiago del Estero, Tucumán, con dudas en La Pampa, aunque Sage y Capredoni (1971) sostienen la hipótesis de que alcanzaría el norte de la mencionada provincia (en su límite tripartito con las provincias de Mendoza y San Luis) y en el sur de Brasil, Uruguay, Paraguay, Perú y Bolivia (Williams *et al.* 2021) (Fig. 2)

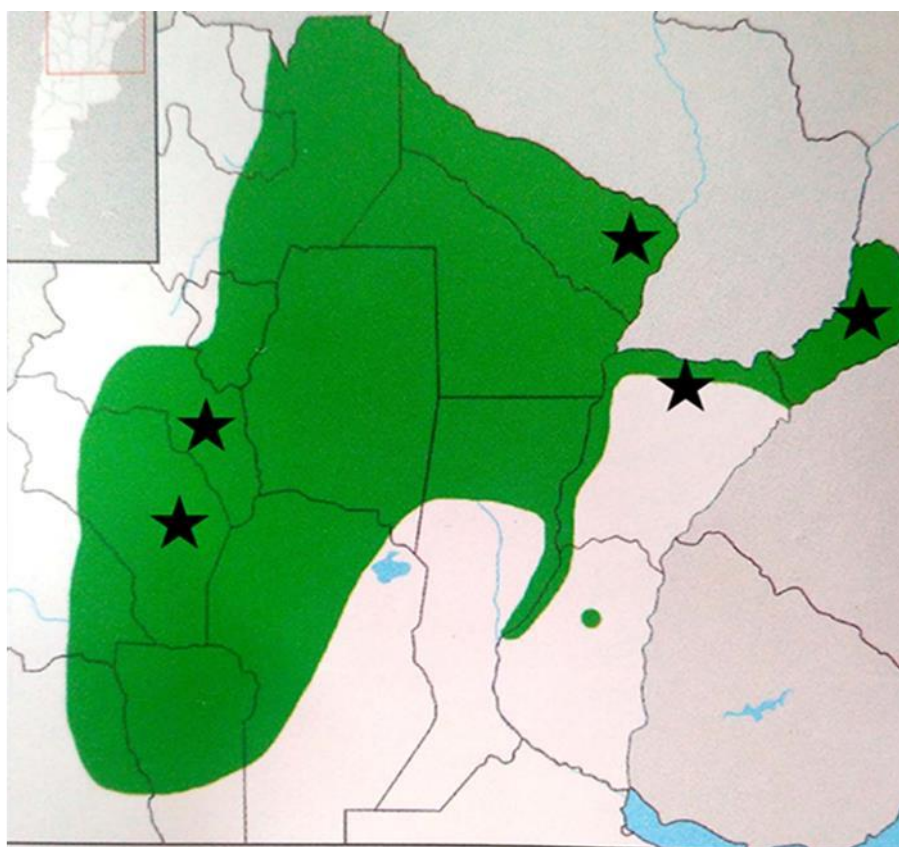


Figura 2. Mapa de distribución de *Crotalus durissus terrificus* en Argentina con localización específica de las muestras analizadas en este trabajo.

En este trabajo, se llevó a cabo una detallada caracterización de los venenos extraídos de ejemplares de *C.d.terrificus* procedentes de diversas regiones fitogeográficas de Argentina. Adoptando para ello, el enfoque propuesto por Cabrera (1976) y su correspondiente actualización por parte de Almirón *et al.* (2022) (Fig. 3), sobre la definición de las regiones fitogeográficas en Argentina debido a consideraciones de actualidad. Cabe señalar que, si bien existen otras propuestas, como la desarrollada por Oyarzabal *et. al.* (2018), quienes han caracterizado el país en términos de ecorregiones, hemos optado aquí por el esquema concebido por Almirón *et al.* (2022) por imprecisiones en los datos de geolocalización de las muestras analizadas lo que constituye una restricción significativa al momento de emplear otros esquemas.

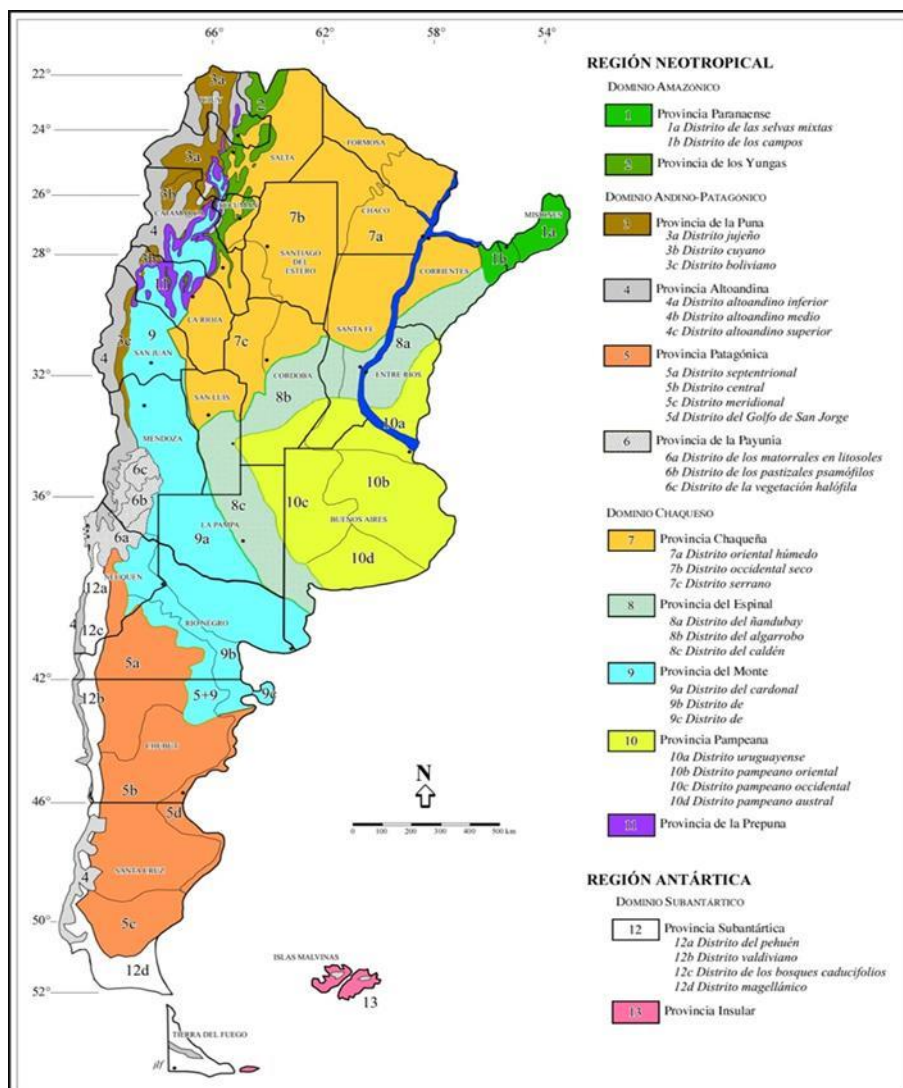


Figura 3. Provincias fitogeográficas argentinas.

2.3. VENENO.

Los venenos de serpientes son una mezcla compleja de componentes producidos por glándulas salivales modificadas que tienen secreciones muy similares a las del sistema digestivo, en especial a la pancreática, con una amplia gama de acciones tanto para las presas como para eventuales víctimas humanas (Chippaux *et al.* 1991). Estas son las secreciones con mayor concentración de enzimas y toxinas en la naturaleza (Rocco D. M. 2013), que actúan desde el interior de las presas iniciando la hidrólisis de tejidos, hasta que los jugos digestivos puedan alcanzar la totalidad de los tejidos adecuadamente, debido a que las serpientes no pueden procesar sus alimentos a través de la masticación.

El envenenamiento provocado por esta especie causa efectos neurotóxicos, coagulopáticos y miotóxicos (Acosta de Perez *et al.* 1997). Según lo expresado por da Silva-Júnior *et al.* (2020), los venenos poseen componentes inorgánicos (poliaminas y alcaloides), orgánicos (péptidos, proteínas, glicoproteínas, fosfolípidos, aminos y nucleótidos) y restos insolubles de tejidos. Las proteínas presentes presentan una alta actividad biológica cuya función principal es paralizar, inmovilizar y matar a su presa, a la vez que da inicio al proceso de digestión de la misma. La composición de los venenos puede variar tanto en sus

características bioquímicas como toxicológicas por diversas causas como: relaciones filogenéticas, variaciones de orden estacional, ontogénico, individual o geográfico o debido a otras causas difíciles de individualizar o clasificar; no obstante, uno de los factores más importantes que influyen sobre estas variaciones es la localización geográfica de los individuos (Rocco 2013).

2.4. VARIACIÓN DE COLORACIÓN DEL VENENO.

Desde hace algunas décadas se conoce sobre la variación de coloración de los venenos ofídicos en serpientes como *Vipera russelli* (Dimitrov & Kankonkar 1968), *Vipera ammodytes* (Kornalik & Master, 1964; Master & Kornalik, 1965), y *C.d.terrificus* (Schenberg 1959). La tonalidad amarillenta indica la presencia de L-aminoácido oxidasa (Tu 1982). Deoras (1963), señaló que un único animal puede producir dos variedades de veneno; esto fue corroborado por Johnson *et al.* (1987) quienes también observaron que un ejemplar de *Crotalus viridis helleri* tenía glándulas que secretaban individualmente veneno amarillo y blanco y que estos eran diferentes en cuanto a su actividad biológica. Más adelante, Dos Santos *et al.* (1993), caracterizaron la actividad biológica de los venenos variedad “amarillo” y “blanco” de *Crotalus durissus ruruima*, utilizando como referente el veneno de *C.d.terrificus*.

2.5. ANTECEDENTES.

El veneno de especímenes de *C.d.terrificus* del Nordeste argentino presenta en su composición más del 50% de la enzima fosfolipasas A₂ (PLA₂), por lo cual Tomaya *et al.* (2003) lo definen como neurotóxico. Además, presentan toxinas de diferentes familias de proteínas: serina proteinasas, 5' nucleotidasas, metaloproteinassas, factores de crecimiento nervioso, fosfodiesterasas, glutaminilciclasa, lectina tipo C, crotamina, L-aminoácido oxidasa y desintegrinas (Azevedo-Marques *et al.* 1985, Fusco *et al.* 2020). Diversos estudios en venenos de especímenes brasileños de *C.d.terrificus*, evidencian que su composición es variable si se compara entre especímenes de distintas regiones geográficas de Brasil (Schenberg *et al.* 1959, Saravia *et al.* 2002, Lourenço *et al.* 2013, Tasima *et al.* 2020).

En este sentido, estudios recientes realizados con técnicas proteómicas describen detalladamente, los componentes del veneno de *C.d.terrificus* provenientes de especímenes de la provincia de Corrientes, en la región Nordeste de Argentina (Fusco *et al.* 2020). Por tal motivo en el presente trabajo se estudió la variabilidad en la composición de los venenos crotálicos provenientes de diferentes regiones fitogeográficas de Argentina, para analizar si la variación geográfica podría influir en su composición y por lo tanto en sus propiedades.

3. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL:

- Analizar el veneno de *C.d.terrificus* en especímenes de diferentes poblaciones y regiones fitogeográficas de Argentina para evaluar posibles variaciones en su composición.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

A- Evaluar la actividad hemolítica indirecta, coagulante, fosfodiesterasa y Laminoácido oxidasa del veneno de *C.d.terrificus* de ejemplares procedentes de Distrito de Selvas Mixtas (Provincia Paranaense), Distrito Oriental Húmedo (Provincia Chaqueña), Distrito del Cardonal (Provincia del Monte).

B- Evaluar el perfil electroforético en muestras de veneno.

C- Evaluar la actividad citotóxica de los venenos en la línea celular de músculo esquelético (C2C12).

4. HIPÓTESIS

“La composición del veneno de *C.d.terrificus* varía en las distintas poblaciones según la región fitogeográfica que habitan los individuos.”

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. VENENO

Se dispuso de 8 muestras de veneno de especímenes adultos de *C. d.terrificus* provenientes de poblaciones de distintas regiones fitogeográficas de Argentina como Distrito de Selvas Mixtas (SP-Provincia Paranaense M4 y M7), Distrito del Cardonal (PM-Provincia del Monte M2 y M3), Distrito Oriental Húmedo (PC-Provincia Chaqueña, M1, M5, M6 y M8), estos últimos suministrados por el CEPSAN.

Los venenos disecados y conservados en freezer a -20°C , al momento de ser usados, se diluyeron en solución tampón de fosfatos, pH 7,2. El material insoluble se centrifugó y se trabajó a partir del sobrenadante.

5.2. CARACTERIZACIÓN DE VENENO DE *C.d.terrificus*

La caracterización de los venenos se realizó mediante una serie de estudios bioquímicos que pusieron de manifiesto las actividades de las enzimas que componen el veneno.

5.2.1. CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS POR EL MÉTODO DE BRADFORD

Para esta prueba se agregaron a 5 μl de muestra de veneno 250 μl del reactivo Coomassie blue (Bradford 1976) y luego de 2 minutos se midió la absorbancia a 595 nm. Se utilizó albúmina bovina como testigo.

5.2.2. HEMÓLISIS RADIAL INDIRECTA

Se empleó la técnica de Gutiérrez *et al.* (1988), consistente en medir el halo hemolítico que genera la muestra de veneno, en placa de agarosa que contiene glóbulos rojos y yema de huevo.

5.2.3. ACTIVIDAD COAGULANTE

Se empleó la técnica de Rodríguez *et al.* (2012). Se enfrentaron las muestras a plasma citratado registrándose los tiempos de coagulación a 37°C .

5.2.4. ACTIVIDAD FOSFODIESTERASA (PDE)

Se utilizó la técnica de BJÖRK (1963). Se determinó la actividad PDE del veneno sobre sustrato específico bis(p-nitrofenil) fosfato.

5.2.5. ACTIVIDAD L-AMINO OXIDASA (LAAO)

Se empleó la técnica de Lazo *et al.* (2017). Para determinar la actividad LAAO, las muestras fueron enfrentadas a L-leucina generando H_2O_2 que es reducida por peroxidasa de rábano picante en presencia de o-fenilendiamina (OPD), el producto coloreado resultante fue monitoreado a 490 nm.

5.2.7. CITOTOXICIDAD

La citotoxicidad es un parámetro de toxicidad representado en la dosis citotóxica 50. En el objetivo C nos propusimos analizar el efecto de los venenos enteros sobre la línea celular C2C12.

Para los ensayos de citotoxicidad in vitro se utilizaron línea celular de músculo esquelético C2C12 obtenidos de monocapas subconfluentes mantenidas en medio esencial Dulbecco (DMEM) suplementado con 5% de suero fetal bovino inactivado por calor, L-Glutamina, Penicilina y Estreptomicina como antibióticos. Las células suspendidas se sembraron en placas de 96 pocillos, en el mismo medio de crecimiento. Al alcanzar la monocapa un 80 % de confluencia, se retiraron el medio de cultivo y diferentes concentraciones de la lectina aislada, fueron adicionadas a las células en cultivo. Medio de cultivo sin toxina y Tritón x-100 fueron controles negativo y positivo de citotoxicidad. Luego de un tiempo de incubación a 37 °C y 5 % de CO₂ en atmósfera húmeda, la viabilidad celular se cuantificó por tinción con el colorante cristal violeta. Por otro lado, se evaluó si hubo citólisis a través de la actividad de la enzima láctica deshidrogenasa (LDH) liberada al medio utilizando un kit comercial (Wiener, LDH-P UV).

5.2.6. ELECTROFORESIS SDS-PAGE

Los ensayos descritos anteriormente permitieron evaluar las actividades enzimáticas características del veneno, sin embargo, hay otras proteínas que no son enzimas y las pudimos observar a través de un perfil electroforético. Ejemplo de dicha proteína es la crotamina que puede estar o no presente en el veneno siendo un veneno crotamina positivo o negativo.

Las diferentes muestras de veneno se analizaron en gel de poliacrilamida con el fin de comparar los perfiles cromatográficos. Se corrieron muestras en un gel 12,5% de poliacrilamida bajo condiciones no reductoras a 100 v durante 2 hs. El marcador de peso molecular fue el Amersham ECL (Cytiva, 12-225kDa).

5.3. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Pese al limitado número de muestras (n), todos los métodos bioquímicos (tratamientos) se repitieron 3 veces por cada muestra (réplica), y los resultados pudieron expresarse como la media \pm DE. La significancia de las diferencias entre las medias se evaluó mediante ANOVA seguido de la prueba de Tukey para comparaciones múltiples entre grupos. Los valores de $p < 0,05$ fueron considerados significativos. Adicionalmente para comparar variables continuas obtenidas al estudiar venenos de diferentes regiones fitogeográficas se realizó la prueba exacta de Fisher.

6. RESULTADOS

6.1. Actividad Fosfolipasa A₂

Los resultados obtenidos en este estudio revelaron una marcada actividad hemolítica indirecta en todas las muestras analizadas. Se destacó un aumento de 6mm en el halo de hemólisis en la muestra 4 (+, $p < 0,05$), la cual pertenece a la región fitogeográfica de Selva Paranaense en contraste con el promedio (13.14mm) de las demás muestras. Asimismo, se evidenció que las muestras (3 y 7), correspondientes a la Provincia del Monte y la Selva Paranaense respectivamente, no presentaron diferencias estadísticamente significativas entre sí (**, $p > 0,05$); no obstante, exhibieron diferencias significativas con respecto a las muestras restantes (fig 4).

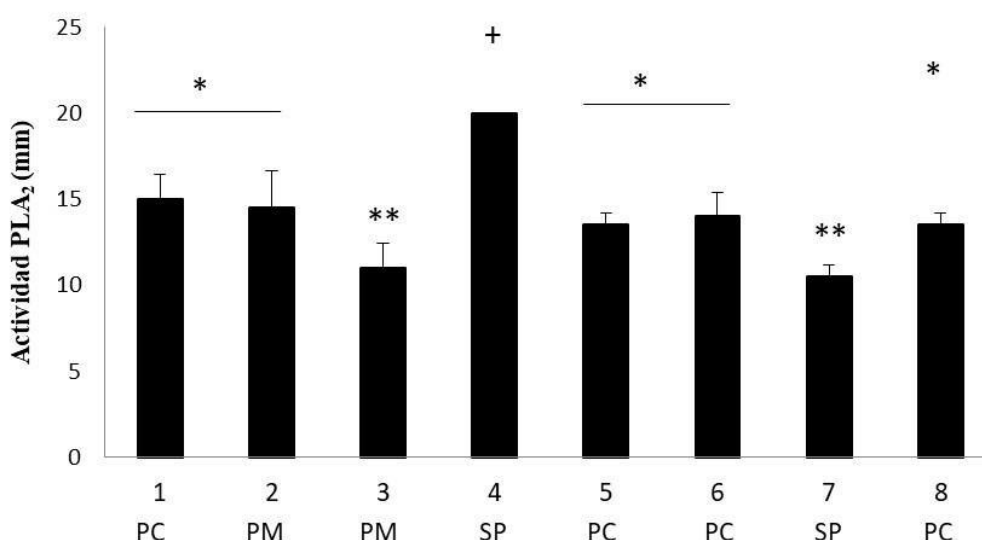


Fig. 4: Actividad PLA₂. Representación de los halos de hemólisis en mm. + $p < 0,05$ con respecto a las muestras restantes. * $p < 0,05$ respecto a las muestras 3, 4 y 7. ** $p < 0,05$ con respecto a todas las demás muestras.

6.2. Serino/proteasa: Se observó que las muestras correspondientes a la Provincia del Monte (M 2) y la Selva Paranaense (M 7) exhibieron un tiempo de coagulación inferior a 8 segundos, revelando una significativa diferencia con respecto a todas las otras muestras ($p < 0,05$). Por otro lado, la muestra originaria de la Provincia Chaqueña (M 1) presentó un tiempo de coagulación superior a 30 segundos, indicando una diferencia estadísticamente significativa con respecto a las demás muestras (+, $p < 0,05$).

Las restantes muestras exhibieron un patrón temporal semejante entre sí, con valores oscilando entre 14 y 19 segundos ($p > 0,05$) (fig 6).

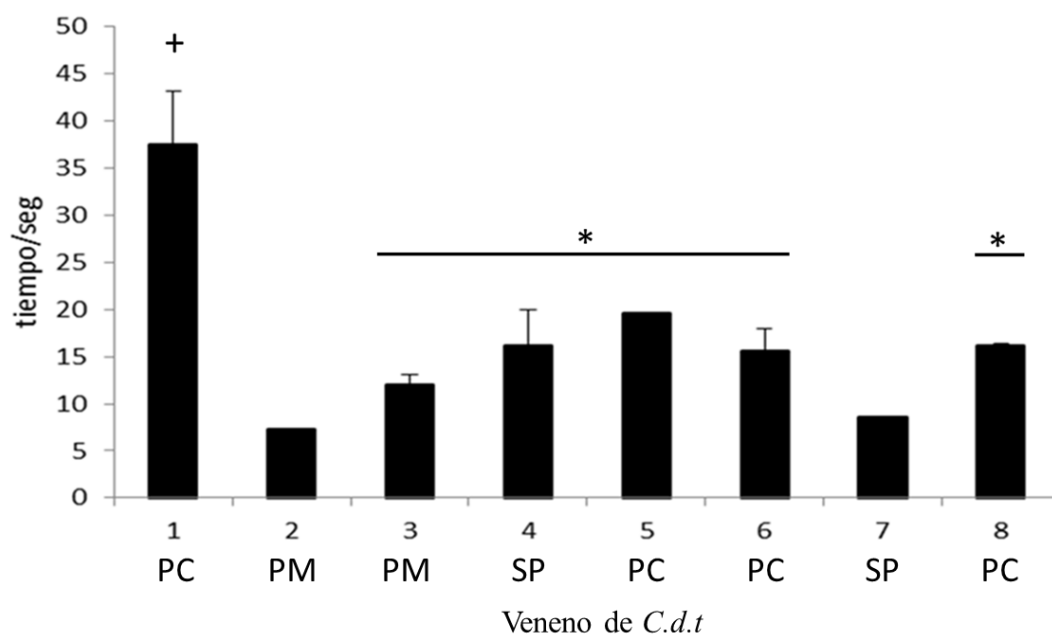


Fig. 5: Análisis de serino/proteasa (seg). + $p < 0,05$ respecto al tiempo de coagulación de las demás muestras. * $p < 0,05$ respecto a las muestras restantes.

6.3. Fosfodiesterasas (PDE): En los ensayos de fosfodiesterasas (PDE), se evidenció la presencia de la enzima en todas las muestras analizadas. Se destacó que la velocidad de conversión de sustrato fue la más alta (3,08 mAU/min) en la muestra proveniente de la Provincia del Monte (M 2), que resultó ser estadísticamente diferente en comparación con las demás muestras (+, $p < 0,05$). Por otro lado, se observó una actividad de 0,17 mAU/min en la muestra correspondiente a venenos de especímenes de la Selva Paranaense (M 7), la cual también demostró ser significativamente menor ($p < 0,05$) con respecto a las otras muestras, las cuales exhibieron una actividad intermedia entre 1,5 - 2,6 mAU/min (fig 7).

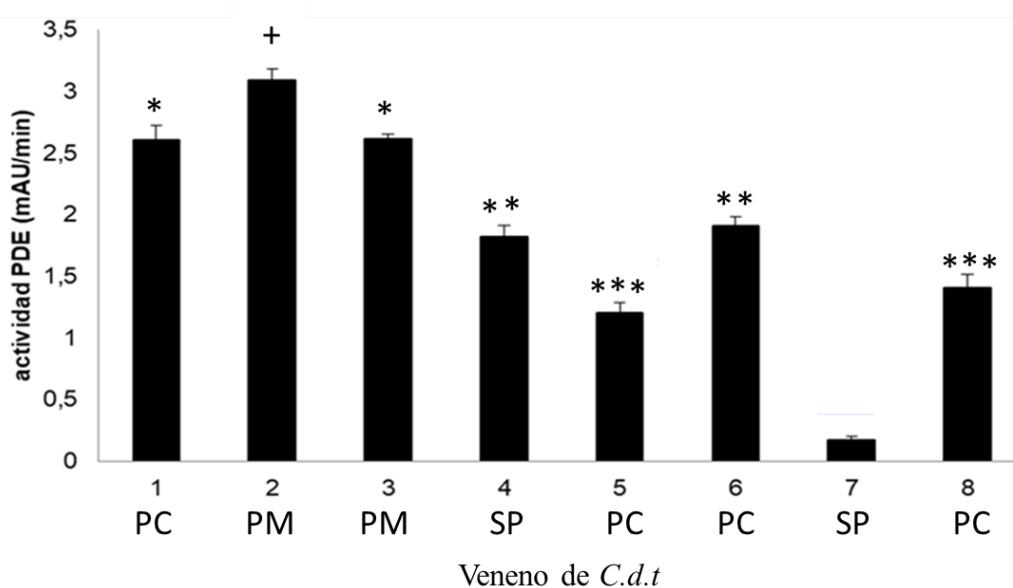


Fig. 6: Actividad PDE (mAU/min). + $p < 0,05$ considerando el resto de las muestras. *, **, *** $p < 0,05$ entre sí.

6.4. L-aminoácido oxidasa (LAAO): En el marco del análisis de la actividad de la enzima L-aminoácido oxidasa (LAAO), la mayoría de las muestras exhibieron una actividad comparable entre sí, y esta similitud no fue estadísticamente significativa (*, $p > 0,05$). No obstante, se observó una reducida actividad enzimática del veneno blanco de la Selva Paranaense (M 7) con una actividad de tan solo 0.10 mAU/min equivalente al 2% en comparación con el promedio de la actividad de las restantes muestras que en promedio fue de 4.09 mAU/min ($p < 0,05$) (fig 8).

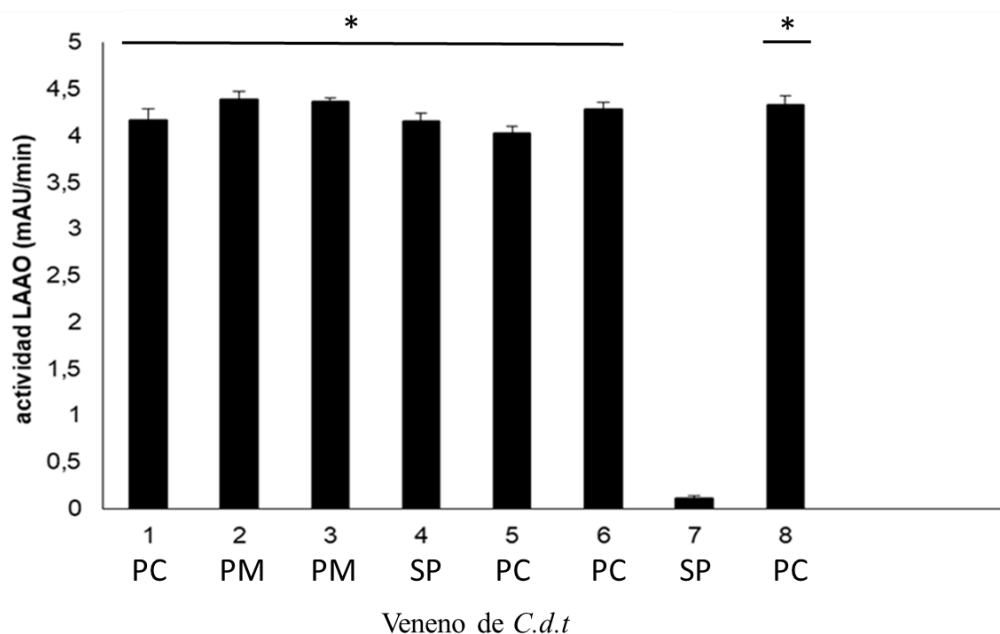


Fig. 7: Actividad LAAO (mAU/min). * $p < 0,05$ respecto a las muestras restantes.

6.5. Citotoxicidad: En el análisis de citotoxicidad, se reveló que, todas las muestras de veneno exhibieron actividad citotóxica. La muestra proveniente de la Selva Paranaense (M 7) redujo la viabilidad celular un 29.5% con respecto a todas las demás muestras (*, $p < 0,05$). En contraste, las muestras originarias de la Provincia Chaqueña (M 6 y 8) exhibieron una actividad citotóxica más marcada, con una reducción al 20% (**, $p < 0,05$) de la viabilidad celular (fig 5).

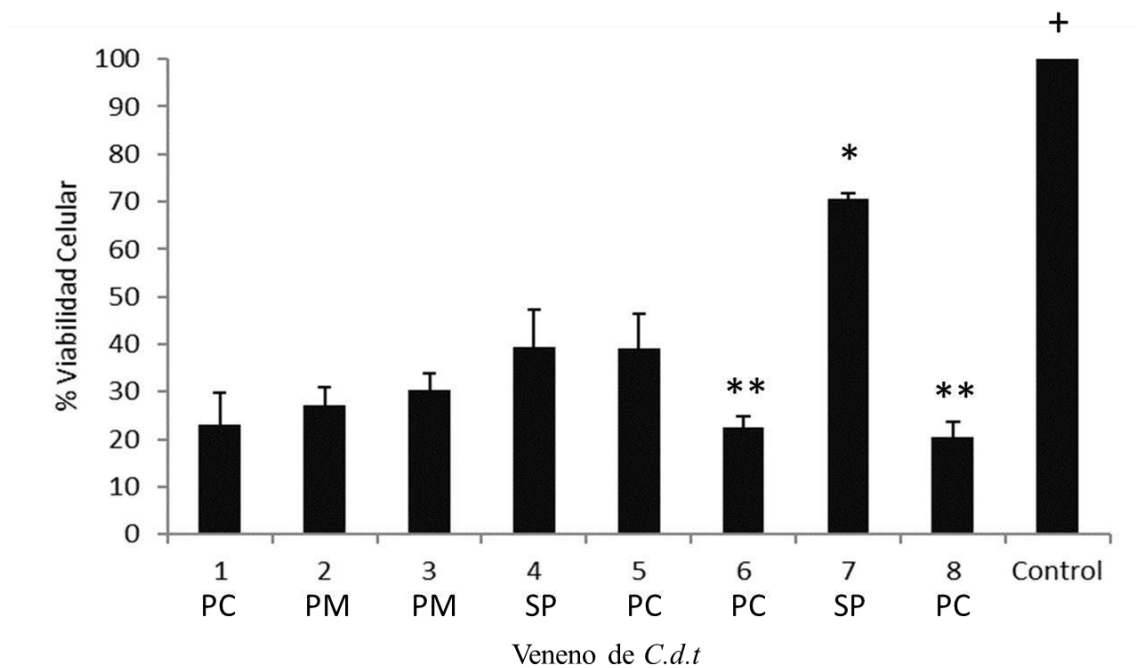


Fig. 8: Análisis de Citotoxicidad. Representación gráfica de la viabilidad celular expresados en porcentaje. + muestra control.
 * $p < 0,05$ respecto a las demás muestras. ** $p < 0,05$ con respecto al resto de las muestras.

6.6. Electroforesis SDS-PAGE: El análisis electroforético pone en evidencia la ausencia de proteínas de alto peso molecular, en las muestras 1 y 3 correspondientes a especímenes de la Provincia chaqueña y provincia del monte. Adicionalmente, se puede observar en la electroforesis, en las calles 5 y 6, ausencia de proteínas de bajo peso molecular compatibles con menor contenido de fosfolipasa A₂ en comparación con los otros venenos estudiados (fig. 9)

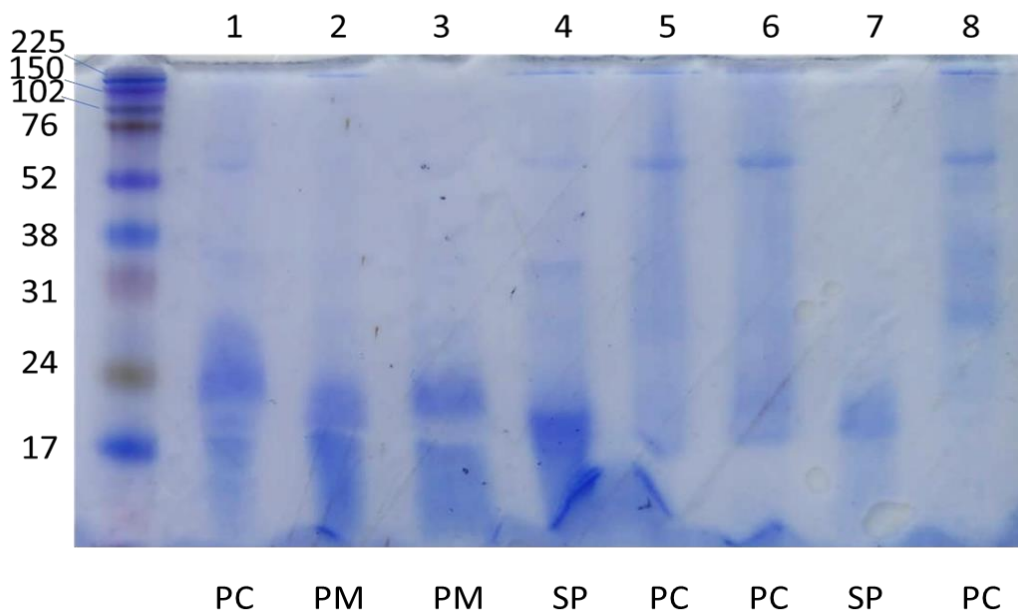


Fig. 9: Perfil electroforético (SDS-PAGE 12,5%) de veneno de *C.d.terrificus* de diferentes regiones fitogeográficas.

7. DISCUSIÓN

Las actividades biológicas de los venenos pueden variar drásticamente según el origen geográfico de los especímenes (Santoro *et al.* 1998).

Gutiérrez (1991) señala que los venenos de especímenes adultos de *Crotalus durissus durissus* de Centroamérica, tienen alta actividad proteolítica, hemorrágica y edematógena, pero carecen de actividad neurotóxica. Contrariamente a esto, nuestros resultados coinciden con lo hallado por Rosenfeld (1971), Sánchez (1992) y Tan (1991), quienes destacan que los venenos de especímenes de *C.d.terrificus* de Sudamérica, tienen alta actividad neurotóxica y falta de actividad proteolítica, hemorrágica y edematógena. Este hallazgo resalta la relevancia de la variabilidad en la actividad citotóxica entre las distintas regiones geográficas estudiadas.

Dos Santos *et al.* (1993) compararon la actividad citotóxica de veneno blanco y amarillo de *C.d.ruruima* y *C.d.terrificus*; señalando una mayor toxicidad de la variante de color blanco del veneno de *C.d.ruruima* sobre la de color amarillo en esta especie y en *C.d.terrificus*. Sin embargo, nuestros ensayos de citotoxicidad del veneno, evidenciaron que, aunque todas las muestras presentaron actividad citotóxica, el veneno de color blanco (muestra 7), proveniente del Distrito de las selvas mixtas, tuvo menor actividad citotóxica que el resto de las muestras de color amarillo.

En cuanto a la actividad hemolítica indirecta Dos Santos *et al.* (1993), señalaron que el veneno de *C.d.terrificus* fue menos activo para convertir la lecitina en lisolecitina y favorecer la lisis de los glóbulos rojos que el de *C.d.ruruima*. La medición del halo hemolítico que realizamos en este trabajo, indica que todas las muestras producen hemólisis bien marcadas destacándose las provenientes del Distrito de las selvas mixtas.

Las enzimas del veneno de serpiente pueden inducir efectos farmacológicos y contribuir significativamente a la toxicidad total. Georgieva (2009) señala la ausencia de actividad de L-aminoácido oxidasa en el veneno de *C.d.terrificus*; coincidentemente con Calvete *et al.* (2009) quienes evaluaron los componentes del veneno de *Crotalus* en diferentes lugares de América del Sur, destacando la ausencia de esta enzima como resultado de sus análisis. Sin embargo, Georgieva (2009) señala que la ausencia de esta enzima corresponde a la variante blanca de los venenos. Los resultados de determinación que obtuvimos en este trabajo para la enzima LAAO, indican su presencia en todas las muestras analizadas, excepto en la muestra (7), esta variación puede atribuirse a la coloración blanca del veneno de la Selva Paranaense, la cual, como se esperaba, demostró ser la responsable de la significativa diferencia observada. Se ha identificado que dicha coloración blanca está asociada con la presencia de la enzima LAAO, la cual confiere el característico tono amarillento al veneno. Este hallazgo subraya la importancia de considerar no solo la actividad enzimática en sí misma, sino también las características fenotípicas y composicionales que pueden influir en la interpretación de los resultados obtenidos en el contexto de la tesis.

Esta observación coincide con lo propuesto por Tu (1982) y Oliveira *et al.* (2021) que sugieren que la enzima L-aminoácido oxidasa sería responsable de la tonalidad amarilla de los venenos.

Uzawa (1932) revela una aparente asociación entre la enzima fosfodiesterasa y los venenos de Vipéridos, aunque esta se encuentra en menores proporciones en venenos de *Crotalus*. Si bien no es muy clara la función que cumple esta enzima en el veneno de *C. d. terrificus*, hay indicios de que está siempre presente entre los componentes del veneno de esta especie, como lo sugieren los estudios realizados por Georgieva *et al.* (2009) que demuestran la presencia de fosfodiesterasas y nuestros resultados que muestran diferencias en la velocidad de conversión del sustrato entre las diferentes muestras analizadas, sugiriendo así una variabilidad significativa en la actividad de las fosfodiesterasas, lo que destaca la importancia de estudiar las particularidades bioquímicas de los venenos de cada región fitogeográfica.

Las serino proteasas forman la segunda gran familia de proteínas del veneno de *C.d.terrificus*. Esta enzima del veneno de serpiente posee una alta especificidad de sustrato y afectan importantes funciones fisiológicas como coagulación sanguínea y presión arterial, fibrinólisis, agregación plaquetaria, el complemento y los sistemas nerviosos. (Georgieva *et al.* 2009).

Estudios previos demostraron que esta enzima causa alteraciones en la coagulación produciendo alargamiento del tiempo de protrombina (Passero *et al.* 2007). Estos hallazgos y lo planteado por varios otros autores como Ramos da Cruz Costa (2018), sustentan nuestros resultados respecto a la actividad de esta enzima, que mostró variabilidad en los tiempos de coagulación según la muestra analizada, sugiriendo variaciones significativas entre los venenos de las distintas regiones geográficas estudiadas.

El bajo número de muestras que hemos podido analizar en este trabajo, comparando las distintas actividades del veneno, entre otras causas, podría explicar las diferencias halladas entre nuestros resultados con los citados por otros autores.

8. CONCLUSIÓN:

Si bien el análisis del veneno de *C.d.terrificus*, proveniente de especímenes de distintas regiones fitogeográficas de Argentina, indican algunas diferencias significativas en cuanto a las actividades enzimáticas in vitro, consideramos que tales variaciones no son significativas para establecer un patrón de relación con la distribución geográfica de los individuos.

Esto podría atribuirse al limitado número de muestras analizadas. No obstante, se observó que el veneno, caracterizado por su color blanco y una reducida actividad LAAO (L-aminoácido oxidasa), exhibió una actividad citotóxica baja. Consideramos que es fundamental en futuros estudios, aumentar el número de especímenes muestreados en cada región fitogeográfica considerada, para confirmar y profundizar estos hallazgos preliminares y validar estos resultados.

9. BIBLIOGRAFÍA

- Acosta de Perez, O. Koscinczuk, P. Teibler, P. Ruiz, R. Sanchez Negrette, M. Maruñak, S. Mussart de Coppo, N. 1997. Intoxicación por veneno de *crotalus durissus terrificus* (cascabel) en ratas / *Crotalus durissus terrificus* (cascabel) venom poisoning in rats.
- Almirón, H.A. Beber, D.J. Bejarano, M.R. Bruno, F.N. Duarte, L.N. Romero, G.I. Sena, D.V.V. Von Fuchs, M.C.A. (2022). Apuntes de fitogeografía argentina. Una guía de estudio. José Luis Fontana Ed.
- Azevedo-Marques, M.M. Cupo, P. Coimbra, T.M. Hering, S.E. Rossi, M.A. Laure, C.J. Myonecrosis, myoglobinuria and acute renal failure induced by South American rattlesnake (*Crotalus durissus terrificus*) envenomation in Brazil. *Toxicon*, 1985. 23(4): p. 631-6.
- Björk, W. 1961. Partial purification of phosphodiesterase, 5'-nucleotidase, lecithinase A, and acetylcholine esterase from ringhals-cobra venom. *Biochimica et Biophysica Acta* 49, 195-204.
- Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.
- Cabrera, A. L. (1976). Regiones fitogeográficas argentinas.
- Calvete J.J. Sanz, L. Angulo, Y. Lomonte, B. Gutiérrez, J.M. 2009. Venom, venomics, antivenomics.
- Chippaux, J.P. V. Williams, J. White, Snake venom variability: methods of study, results and interpretation, *Toxicon*. 29 (1991) 1279–1303.
- da Silva-Júnior, L.N. et. al. 2020. Geographic variation of individual venom profile of *Crotalus durissus* snakes.
- Daoras, P.J. (1963) Studies on Bombay snakes; snake farm yield records and their probable significance. In: *Venomous and Poisonous Animals and Noxious Plants of the Pacific Region*, p. 337 (KFli (3AN, H. L. and MACFARLANE, W. V. Eds). Oxford: Pergamon Press.
- Dimitrov, G.D. and Kankonkar, R.C. (1968) Fractionation of *Vipera russeli* venom by gel filtration-II. Comparative study of yellow and white venoms of *Vipera russeli* with special reference to the local necrotizing and lethal actions. *Toxicon* S, 283-288.
- Dos Santos, M.C. Ferreira, L.C.L. Dias Da Silva, W. Furtado, M.F.D. 1993. Caracterización de las actividades biológicas de los venenos 'amarillo' y 'blanco' de *crotalus durissus ruruima* comparados con el veneno de *crotalus durissus terrificus*. Poder neutralizante de los antivenenos frente a los venenos de *crotalus durissus ruruima*.
- Fusco, L.S. Neto, E.B. Alef, F.F. Alfonso, J. Soares, A. Pimenta, D.C. Leiva, L.C. 2020. Fast venom analysis of *Crotalus durissus terrificus* from northeastern Argentina, *Toxicon*: X 100047.
- Georgieva, D. Ohler, M. Seifert, J. von Bergen, M. Arni, R.K. Genov, N. Betzel, C. 2009. Snake Venomic of *Crotalus durissus terrificus* Correlation with Pharmacological Activities.
- Gutiérrez, J.M. Avila, C. Rojas, E. Cerdas, L. 1988. An alternative in vitro method for testing the potency of the polyvalent antivenom produced in Costa Rica. *Toxicon*. 26: 411-413.
- Gutiérrez, JM. Similitudes bioquímicas y farmacológicas entre los venenos de *Crotalus durissus durissus* recién nacido y *Crotalus durissus terrificus* adulto. *Serpientes de cascabel*. *Toxicon* 1991; 29:1273–7.

-Johnson, E.K. Kardong, K.V. Ownby, C.L. 1987. Observations on white and yellow venoms from an individual southern Pacific rattlesnake (*Crotalus viridis helleri*)

-Kornalik, F. and Master, R.W.P. (1964) A comparative examination of yellow and white venoms of *Vipera ammodytes*. *Toxicon* 2, 109-111.

-Laurenço Jr, A. Zorzella Creste, C.F. Curtolo de Barros, L. dos Santos, L.D. Pimenta, D.C. Barraviera, B. Ferreira Jr, R.S. 2013. Individual venom profiling of *Crotalus durissus terrificus* specimens from a geographically limited region: Crotamine assessment and captivity evaluation on the biological activities, *Toxicon* 69: 75-81.

-Lazo, F. Vivas-Ruiz, D.E. Sandoval, G.A. Rodriguez, E.F. Koslova, E.E.G. Costal-Oliveira, F. ChávezOlórtegui, C. Severino, R. Yarlequé, A. Sanchez, E.F. Biochemical, biological and molecular characterization of an L-Amino acid oxidase (LAAO) purified from *Bothrops pictus* Peruvian snake venom, *Toxicon*. 139 (2017) 74–86.

-Master, R.W.P. and Kornalik, F. (1965) Biochemical differences in yellow and white venoms of *Vipera ammodytes* and Russell's viper. *J. biol. Chem.* 240, 139-142.

-Oliveira, E.V. Tasima, L.J. Hatakeyama, D.M. Serino-Silva, C. Bittencourt Rodriguez, C.F. da Costa Galizio, N. Chiarelli, T. Nishiduka, E.S. Texeira da Rocha, M.M. Sant'Anna, Q.S. Grego, K.F. Tashima, A.K. Tanaka-Azevedo, A.M. de Morais-Zani, K. 2021. Color del veneno de serpiente y L-aminoácido oxidasa: una evidencia de la plasticidad del veneno de *Crotalus durissus terrificus* en cautiverio a largo plazo.

-Oyarzabal, M. Clavijo, J. Oakley, L. Biganzoli, F. Tognetti, P. Barberis, I. Maturo, H.M. Aragon, R. Campanello, P.I. Prado, D. Oesterheld, M. Leon, R.J.C. (2018). Unidades de Vegetación de la Argentina.

-Passero, L.F.D. Tomokane, T.Y. Corbett, C.E.P. Laurenti, M.D. Toyama, M.H. Comparative studies of the anti-leishmanial activity of three *Crotalus durissus* ssp. venoms. *Parasitol Res*, 2007. 101(5): p. 1365-71.

-Ramos da Cruz Costa, C. 2018. Avaliação de compostos polifenólicos da *Laguncularia racemosa* sobre a atividade enzimática e farmacológica de serino proteases de *Crotalus durissus terrificus*.

-Rocco, D.M. Reati, G. Costa de Oliveira, V. Lanari, L.C. Laskowicz, R.D. de Roodt, A.R. 2013. Caracterización tóxica del veneno de *bothrops (rhinocerocephis) alternatus* de diferentes regiones de la provincia de Córdoba (Argentina).

-Rodríguez, J.P. Gay, C.C. Fusco, L.S. Gauna, M.C. Acosta, O.C. Leiva, L.C. 2012. Cross-neutralization of the coagulant activity of *Crotalus durissus terrificus* venom from the northeast of Argentina by bivalent bothropic antivenom. *Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases*. 18(1): 116-123.

-Rosenfeld, G. Sintomatología, patología y tratamiento de las mordeduras de serpientes en América del Sur. En: Buñcherl W, Buckley E, editores. *Animales venenosos y sus venenos*, vol II. Nueva York: Prensa Académica, 1971:345–84.

-Sánchez, E.F. Freitas, T.V. Ferreira-Alves, D.L. Velarde, D.T. Diniz, M.R. Cordeiro, M.N. AgostiniCotta, G. Diniz, C.R. Actividades biológicas de venenos de serpientes sudamericanas. *Toxicon* 1992; 30:95–103.

-Santoro, M.L. Sousa-e-Silva a Selma, M.C. Goncalves, L.R.C. Almeida-Santos, M. Cardoso, D.F. Peres, A. Laporta-Ferreira, L. 1998. Comparación de las actividades biológicas en venenos de tres

subespecies de la serpiente de cascabel sudamericana (*Crotalus durissus terrificus*, *Crotalus durissus cascaella* y *Crotalus durissus collilineatus*).

-Saravia, P. Rojas, E. Arce, V. Guevara, C. 2002. Geographic and ontogenic variability in the venom of the neotropical rattlesnake *Crotalus durissus*: pathophysiological and therapeutic implications, Rev Biol Trop 50(1): 337-46.

-Schenberg, S. 1959. Geographical pattern of crotoamine distribution in the same rattlesnake subspecies, Science 129(3359): 1361-1363.

-Tan, N.H, Ponnudurai, G. Un estudio comparativo de las actividades biológicas de los venenos de serpientes de cascabel (géneros *Crotalus* y *Sistrurus*). Comp Biochem Physiol 1991;98C:455–61.

-Tasima, L.J. Serino-Silva, C. Hatakeyama, D.M. Nishiduka, E.S. Tashima, A.K. Sant'Anna, S.S. Grego, K.F. Morais-Zani, K. Tanaka-Azevedo, A.M. 2020. Crotoamine in *Crotalus durissus*: distribution according to subspecies and geographic origin, in captivity or nature, Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases 26.

-Toyama, M.H. Oliveira, D.G. Beriam, L.O. Novello, J.C. Rodriguez-Simioni, L. Marangoni, S. 2003. Structural, enzymatic and biological properties of new PLA (2) isoform from *Crotalus durissus terrificus* venom. Toxicon. 41(8): 1033-8.

-Tu, A.T. (1982). Chemistry of rattlesnake venoms. In: Rattlesnake Venoms Their Actions and Treatment, pp. 247-312. New York: Marcel Dekker.

-Uetz, P. The Reptile Database, <http://www.reptile-database.org> consultado el 17 de octubre de 2023.

-UZAWA, S. 1932. Über die Phosphomonoesterase und die Phosphodiesterase. In: The Journal of Biochemistry, 15(1), 19-28.

-Williams, J.D. Vera, D.G. Di Pietro D.O. 2021. Lista comentada de las serpientes de la Argentina, con referencias a su sistemática, distribución geográfica, dieta, reproducción, potencial peligrosidad y etimologías.