

ACTIVIDAD FIBRINOLITICA EN VENENOS DE
SERPIENTES PERUANAS DE LOS GENEROS BOTHROPS,
LACHESIS Y CROTALUS

Hugo G. Collantes*, Alfonso Zavaleta** y María Salas**

ABSTRACT

We studied the presence of fibrinolytic activity in five dried peruvian snake venoms using fibrin clots formed by one partially purified fraction of Thrombin-like enzyme from *L. muta muta*. In all venoms studied, fibrinolysis were detected in absence of plasmin in the range from 16,3 to 57,5 U/h mg protein. This results demonstrate the existence of proteolytic enzymes in Peruvian Viperid snake venoms that act upon fibrin. The *L. muta muta* venom showed the higher activity (57,5), followed in down order by *B. barnetti* (45,2), *B. pictus* (29,4), *C. durisus terrificus* (22,5) and *B. brazilii* venom (16,3).

Key words: Snake venom; Fibrinolytic activity; Coagulant; Thrombin-like enzyme.

* Laboratorio de Farmacología, Dpto. Académico de Ciencias Fisiológicas, Facultad de Ciencias y Filosofía, Universidad Peruana Cayetano Heredia, A. P. 5045, Lima 100, Perú.

** Laboratorio Afiliado, Dirección de Investigación Epidemiológica, Instituto de Enfermedades Transmisibles "Hugo Lumberas Cruz", Instituto Nacional de Salud, Perú.

RESUMEN

Se estudia la presencia de actividad fibrinolítica en los venenos de cinco serpientes peruanas empleando coágulos de fibrina formados a partir de fibrinógeno bovino y una enzima semejante a trombina de *L. muta muta* parcialmente purificada. Los cinco venenos estudiados presentaron actividad fibrinolítica en ausencia de plasmina (rango: 16,3 a 57,5 U/h mg proteína), lo que demuestra la existencia de enzimas proteolíticas en los venenos de vipéridos peruanos, que actúan directamente sobre la fibrina. El veneno de *L. muta muta* presentó la mayor actividad enzimática específica (57,5), seguido en orden decreciente por *B. barnetti* (45,2), *B. pictus* (29,4), *C. durisus terrificus* (22,5) y *B. brazilii* (16,3).

Palabras Clave: Venenos de serpiente; Fibrinólisis; Coagulación.

INTRODUCCION

Los venenos de serpientes son secreciones viscosas con elevado contenido proteico que contienen una variedad de moléculas proteicas con marcada actividad enzimática, toxinas polipeptídicas con y sin actividad enzimática, péptidos y compuestos de bajo peso molecular [6, 15].

El descubrimiento de ciertos agentes coagulantes *in vivo* conocidos como enzimas similares a trombina (EST): Batroxobin, la Reptilasa^a, Botropase^a, Defibrase^a y Arvin^a dan evidencia del uso potencial de las enzimas de venenos ofídicos como fuente para la obtención de importantes drogas útiles en el tratamiento de diversas afecciones tromboembólicas y hematopoyéticas, así como en el laboratorio clínico [5, 13].

La remoción de los coágulos formados en los vasos sanguíneos se efectúa en el organismo mediante un sistema enzimático proteolítico (sistema fibrinolítico, Figura 1), mediado por la activación del plasminógeno a plasmina, una serinoproteasa que lisa el coágulo insoluble formando productos solubles de degradación de la fibrina con propiedades anticoagulantes [2].

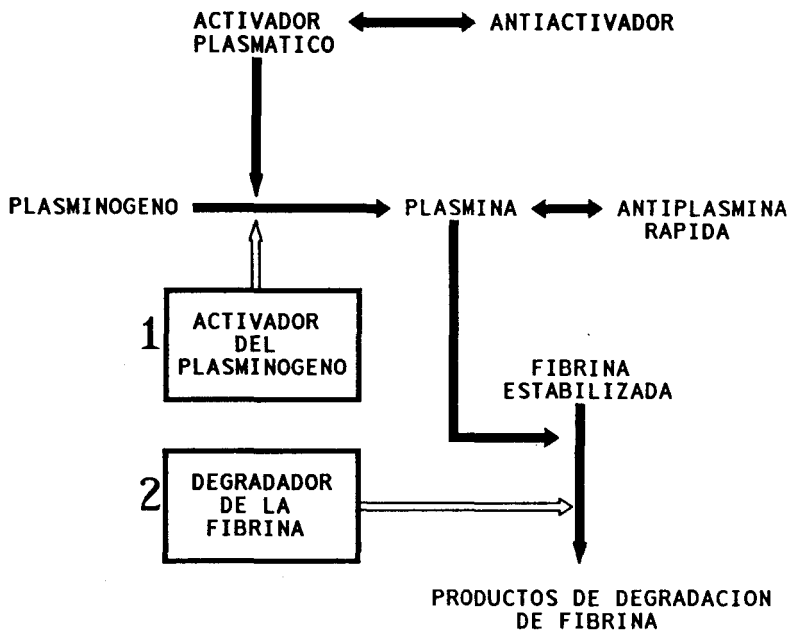


Fig. 1 Mecanismo de fibrinólisis sanguínea y sitios de acción de las enzimas de venenos de serpiente.

En este trabajo se evalúa la presencia de actividad fibrinolítica en los venenos de las serpientes peruanas *Crotalus durisus terrificus*, *Bothrops barnetti*, *B. pictus*, *B. brazillii* y *Lachesis muta muta*, empleando como sustrato coágulos formados por acción de una enzima coagulante semipurificada (EST) del veneno de *L. muta muta* sobre fibrinógeno bovino.

MATERIAL Y METODOS

Se utilizó veneno desecado cristalizado obtenido en el serpentario del Instituto Nacional de Salud en Lima, a partir de ejemplares adultos de *C. durisus terrificus* (Lote C5-B3-85, Sandía, Puno), *Bothrops barnetti* (Lambayeque), *B. pictus* (Lote 2B-8-87, Lima), *B. brazillii* (Lote s/n, Selva peruana) y *L. muta muta* (Lote L5-LM9-85, Alto Marañón, Amazonas). Para los ensayos, el veneno ofídico y la EST fueron diluidos (P/V) en NaCl 0,85%.

El contenido proteico de los venenos se estimó según el método de Lowry [8], modificado por Stauffer [14], empleando una curva de calibración de albúmina sérica bovina (Sigma).

La actividad fibrinolítica de los venenos se evaluó en función de su capacidad para lisar coágulos de fibrinógeno bovino, formados por la acción de un extracto semipurificado de enzima similar a trombina (EST) aislada a partir del veneno cristalizado de *L. muta muta* según la técnica de Zavaleta y cols. [16]. La fracción semipurificada de EST tuvo una potencia coagulante de 488,98 UNIH de Trombina/mg de proteína, estimada empleando Trombina Sigma (lote 75-F-9466; 52 UNIH/mg) como estándar. Los ensayos se realizaron a 37°C en tubos de Wintrobe, conteniendo coágulos obtenidos mezclando 0,2 mL de fibrinógeno bovino (5 mg/mL en 0,02M buffer fosfato salino) y 0,1 mL de EST (53,9 UNIH/mL). Luego se adicionó a cada tubo 0,1 mL de veneno (2 mg/mL) o NaCl 0,85% (control). La actividad fibrinolítica se estimó luego de 24 horas a 37°C, mediante medición directa del porcentaje de lisis del coágulo producida en los tubos, luego de sustraer el porcentaje de lisis obtenido en los tubos control. Una unidad de actividad fibrinolítica se definió como la cantidad de veneno capaz de lisar 1% del volumen inicial del coágulo en una hora por mg de proteína de veneno.

RESULTADOS Y DISCUSION

El contenido proteico del veneno ofídico fluctuó entre 53,7% y 91,8% (Tabla 1) correspondiendo el menor contenido porcentual al veneno de *L. muta muta* y el mayor al veneno de *C. durissus*. Todos los venenos estudiados presentaron actividad fibrinolítica, fluctuando dicha actividad entre 16,3 y 57,5 U/h mg proteína (Tabla 1). *L. muta muta* presentó la mayor actividad enzimática específica (57,5), seguido en orden decreciente por *B. barnetti*, *B. pictus* y *C. durisus terrificus* y *B. brazilii*. La lisis espontánea del coágulo observada en los tubos control fue de 2,46%

Tabla 1 Actividad fibrinolítica en venenos ofídicos peruanos

Veneno	% Proteínas*	Actividad fibrinolítica*
<i>B. barnetti</i>	71,7	45,21 ± 10,8
<i>B. pictus</i>	76,7	29,46 ± 13,3
<i>B. brazilii</i>	86,5	16,34 ± 5,6
<i>C. durissus terrificus</i>	91,8	22,51 ± 7,0
<i>L. muta muta</i>	53,7	57,56 ± 9,3

* Unidades expresadas en porcentaje de lisis del coágulo/hora mg proteína.

† Método de Lowry modificado por Stauffer (1975).

Los venenos de serpientes de la familia Viperidae pueden aceptar uno o más niveles de la cascada de la coagulación, siendo los mecanismos de acción más frecuentes: a) activando factores de coagulación en la vía intrínseca (X, VII) y/o liberando fosfolípidos plaquetarios; b) activando el Factor XIII; c) consumiendo específicamente el fibrinógeno por acción de la enzima similar a trombina; y d) mediante la acción de factores fibrinolíticos [6, 9].

En la última década, diferentes investigadores han informado sobre la presencia de factores con actividad similar a trombina (EST) en los venenos de *C. durissus terrificus* [3], *B. barnetti* [11], *B. pictus* [10,11] y *L. muta muta* [4, 11, 16]; sin embargo, los estudios sobre la presencia o ausencia de enzimas con actividad fibrinolítica en los venenos botrópicos y lachésico peruanos son aún escasos [7].

En este estudio confirmamos la existencia de actividad fibrinolítica en los cinco venenos estudiados, mediante el empleo de un sistema *in vitro* carente de plasminógeno o plasmina, que utiliza coágulos formados por una enzima fibrinogenolítica semipurificada (coagulante, EST) del veneno de *L. muta muta*. Aun cuando se ha sugerido que los coágulos formados por la EST pudieran ser más lábiles a la acción de la plasmina que aquéllos formados por la acción de la trombina, el modelo empleado permite la evaluación comparativa *in vitro* de la potencia fibrinolítica de los diferentes venenos, los que pueden presentar simultáneamente ambos factores (procoagulantes y fibrinolíticos), que interactuarían sinérgicamente [9]. El efecto final observado dependería de

la cantidad y potencia de cada uno de estos principios presentes en el veneno, habiéndose informado previamente que en algunos venenos el empleo de pequeñas dosis de veneno produce mayor efecto coagulante que fibrinolítico, mientras que con dosis elevadas de veneno, el efecto era inverso [7].

Los mecanismos íntimos del proceso fibrinolítico originado por varios de los venenos de serpientes estudiados en este trabajo aún no han sido esclarecidos, postulándose dos mecanismos probables de acción [1, 9]: a) que los venenos contengan enzimas fibrinolíticas y que la fibrinólisis se deba a la acción de enzimas con acción específica sobre la fibrina, o inespecíficas, que afecten tanto a la fibrina como a otras proteínas diferentes y b) que los venenos no contengan enzimas fibrinolíticas, sino que activen el plasminógeno transformándolo en plasmina, la que causaría la acción fibrinolítica.

Rosenfeld consideró en 1964 que el efecto fibrinolítico en los venenos ofídicos del género *Bothrops* se debía a la activación del plasminógeno en lugar de una acción directa sobre la fibrina [12]. Nuestros resultados muestran que todos los venenos ofídicos evaluados presentan actividad fibrinolítica en ausencia de plasminógeno, lo que discrepa con lo señalado por Rosenfeld, y demuestra la existencia de enzimas activas sobre la fibrina en estos venenos, cuya especificidad requiere un análisis más detallado. Asimismo, es necesario realizar otros estudios con modelos diferentes de fibrinólisis que permitan descartar existencia de factores activadores del plasminógeno en estos venenos.

Agradecimientos

A León Villegas, Pilar Orejuela y Judith Salas por la colaboración brindada. Este trabajo se realizó dentro del Convenio de Cooperación para Investigación Científica y Docencia suscrito por el Instituto Nacional de Salud del Perú y la Universidad Peruana Cayetano Heredia.

BIBLIOGRAFIA

1. Aragón, F., M. Kopitar, J. Babnik and F. Gubensek. (1978) *Period Biol*, 80 (1), 91-96.
2. Bernard, J., J. P. Levy, B. Varet et al. (1985) *Manual de Hematología*, París.

3. Bercovic, D., Chudziniski, A. Días, O., Esteves, M., Hiraichi, E., Oishi, N., Picarelli, Z. (1987) *Mem. Inst. Butantan*, **49** (3), 69-78.
4. Campos, S., Escobar, E., Lazo, F., Yarleque, A., Marsh, N., Peyser, P., Whaler, B. (1988) In *Hematology Series, Vol. 7: Hemostasis and Animal Venoms* (Pirkle H. F. and Markland F. S., Eds), New York, Marcel Dekker, Inc., 107-115.
5. Lee, C. Y. (1979) *Handbook of Experimental Pharmacology*, New York, Springer-Verlag-Berlin-Heidelberg.
6. Gubensek, F. (1977) *Toxicon* **15**: 270.
7. Loayza, Benzaquen, Simy L. (1983) Efecto del veneno de las serpientes *Lachesis muta* y *Bothrops atrox* sobre fibrinógeno bovino y substratos sintéticos, Tesis para optar el Título Profesional de Licenciado en Biología, Universidad Particular Ricardo Palma, Lima.
8. Lowry, O. H. et al. (1951) *J. Biol Chem*, **193** (1), 265-275.
9. Meier, J. (1984) In: *Proceedings of the 6th European Symposium on Animal, Plant and Microbial Toxins*, Basle, International Society of Toxicology, p. 112.
10. Olascoaga, M. E., Zavaleta, A. and Marsh, N. A. (1988) *Toxicon*, **26** (5), 501-504.
11. Orejuela, P., Zavaleta, A., Salas, M., Marsh, N. (1991) *Toxicon*, **29** (9), 1151-1154.
12. Rosenfeld, G. (1964) *Blood*, **9** (3), 352-354.
13. Russell, Findlay E. (1977) *Toxicon*, **15**, 267-269.
14. Stauffer, Clyde E. (1975) *Analytical Biochemistry*, **69**, 646-648.
15. Tu, A. T. (1977) *Venoms: Chemistry and Molecular Biology*, Wiley, USA.

16. Zavaleta M-V, A., María Salas Arruz, L. Villegas y J. Castillo (1989)
Estudio farmacológico del veneno de *Lachesis muta muta* "Shushupe"
(Premio 1988 Carlos Gutiérrez Noriega (Farmacología)), Megaprint
ediciones S.A., Lima