

QUIMICA Y FARMACOLOGIA DEL VENENO DE SERPIENTES*
(I PARTE)

Alfonso Zavaleta Martínez-Vargas.^{1, 2, 3}

ABSTRACT

A multidisciplinary revision of snake venom includes its chemical, pharmacological and toxicological aspects. In the first part, the chemical composition of venoms, and local effects, with special attention to the venom of *Lachesis muta muta* snake are revisited. The acute toxic effects, cytotoxicity, myotoxicity and the chemical basis for the production of edema, hemorrhagic and myonecrotic effects are discussed.

KEYWORDS: SNAKE VENOM, CHEMISTRY, PHARMACOLOGY, ACUTE TOXICITY, CITOTOXICITY, HAEMORHAGE, MYONECROSIS, OEDEMA.

* Este trabajo recibió financiación parcial de la International Foundation for Sciences (Suecia), y fue realizado cuando el autor se encontraba recibiendo una subvención especial al investigador del CONCYTEC-PERU.

1. Laboratorio de Farmacología, Departamento Académico de Ciencias Fisiológicas, Facultad de Ciencias y Filosofía, Universidad Peruana Cayetano Heredia
2. Instituto de Medicina Tropical Alexander von Humboldt de la Universidad Peruana Cayetano Heredia, A.P. 5045, Lima 100, Perú y
3. Laboratorio Afiliado, Centro de Investigación en Salud "Hugo Lumbreras Cruz", Instituto Nacional de Salud, Lima, Perú.

INTRODUCCION

Los accidentes producidos por mordeduras de ofidios en el hombre han ocurrido en todas las etapas históricas de la humanidad y actualmente constituyen un importante problema de salud pública, reportándose a nivel mundial entre 30,000 y 40,000 muertes anuales ocasionadas por la mordedura de serpientes venenosas [1, 11, 20, 22, 23, 24, 43, 44, 45, 48, 60]. El Perú cuenta con más de 60 especies de serpientes venenosas descritas, agrupadas en 3 familias: Viperidae, Elapidae e Hydrophyidae respectivamente, incluyendo los géneros *Bothrops*, *Lachesis*, *Crotalus*, *Micrurus*, *Leptomicrurus* y *Pelamis*. [11, 13, 32, 43, 44, 45, 61, 63].

El ofidismo es frecuente en la Amazonía peruana, donde ocurren la mayor parte de los casos, muchos de los cuales no son registrados por falta de adecuada infraestructura sanitaria [5, 15, 45, 48, 61]. Con menos frecuencia se reportan accidentes en la región costera [68]; correspondiendo la mayor proporción de accidentes ofídicos registrados a nivel hospitalario, a serpientes de la familia Crotalidae, principalmente aquéllas pertenecientes a los géneros *Bothrops* (especialmente *B. atrox*) y *Lachesis*. El envenenamiento lachésico comprende del 10 al 15% de los accidentes reportados en diferentes casuísticas [5, 15, 48].

Las manifestaciones sistémicas comunes a los géneros *Bothrops*, *Crótalus* y *Lachesis* incluyen hipotensión y shock, trastornos de la coagulación y alteraciones en las células hemáticas [12]. Los efectos locales incluyen edema [22, 23] y hemorragia debida a exudación de plasma o sangre total a nivel de los capilares, presuntamente provocada por una acción citotóxica a nivel del endotelio vascular [2, 19, 33, 36]. La necrosis es la manifestación local más seria, pudiendo ocasionar lesiones tróficas prolongadas y/o incapacitación motora permanente por la amputación de miembros [11, 36, 60]. En el envenenamiento por *Crotalus durissus terrificus* "Cascabel", se observan además de los fenómenos antes descritos, la ocurrencia de trastornos neurológicos [51, 60]. El accidente lachésico ocurre en zonas rurales y está asociado a una elevada mortalidad inmediata, lo que ha motivado la casi total ausencia de reportes de envenenamientos en humanos [45, 48]. En 1981, Silva Haad reportó dos casos humanos en Leticia (Colombia), describiendo los síndromes coagulante, hipotensivo, hematológico y gastrointestinal de este envenenamiento [56], los que ya habían sido observados previamente por Vellard en perros envenenados experimentalmente [62].

En las últimas décadas, con el mejoramiento en el conocimiento de los mecanismos de regulación homeostática de los mamíferos y los marcados avances logrados en los métodos de purificación proteica, secuenciación y estudios de caracterización de sus estructuras moleculares, los venenos de serpiente se han constituido en poderosas herramientas para el estudio de los mecanismos íntimos involucrados en procesos biológicos fundamentales como la neurotransmisión, coagulación sanguínea, función renal y otros [36]. El surgimiento de la biología molecular y el desarrollo de técnicas inmunológicas han conducido al clonamiento de diversas estructuras proteicas, y su utilización para la producción a escala piloto y/o industrial de nuevos instrumentos terapéuticos obtenidos mediante técnicas de producción de anticuerpos monoclonales y policlonales útiles en terapéutica humana [69].

EL VENENO DE SERPIENTE

El veneno de serpiente es el producto de secreción exócrina de las glándulas venenosas, y cumple en las serpientes una función digestiva y defensiva, y es utilizado por la serpiente para inmovilizar a la presa, matarla e iniciar la digestión. En otros casos, el veneno constituye también un elemento de defensa [11].

Los venenos de serpientes contienen alrededor de un 25% de sólidos totales, de los cuales el 70 a 90% están constituidos por proteínas y polipéptidos de peso molecular variable, frecuentemente elevado, los que son responsables de la mayoría de los efectos biológicos conocidos de estos venenos. Su elevada concentración de sólidos les confieren una gran viscosidad. El restante 10 a 30% de los solutos, están constituidos por una amplia gama de sustancias orgánicas de bajo peso molecular tales como carbohidratos, péptidos pequeños, aminoácidos libres, aminas biógenas y nucleótidos, así como compuestos inorgánicos y elementos, tanto aniónicos como catiónicos. [11]. En las Tablas 1 y 2 se muestran los principales componentes obtenidos de venenos de serpientes.

Durante mucho tiempo se consideró que el veneno ofídico poseía elementos que actuaban en forma específica sobre un órgano o sistema del sujeto envenenado, y que las proteínas fundamentalmente con acción enzimática proteolítica eran las responsables de casi todos los efectos. Así, las principales actividades biológicas de los venenos ofídicos fueron denominadas según el órgano y/o sistema de la economía que es afectado durante el curso de envenenamiento, recibiendo denominaciones como: toxinas coagulantes, neu-

TABLA 1: Constituyentes protéicos y péptidos detectados en el veneno de serpientes.

I) ENZIMAS:

- Oxidoreductasas:
 - L-aminoácido oxidasa
 - Lactato dehidrogenasa.
- Enzimas que actúan sobre ésteres de fosfato:
 - Endonucleasa
 - Fosfodiesterasa
 - 5'Nucleotidasa
 - Fosfomonoesterasa inespecífica
 - Paraoxonasa
 - Fosfatasa
- Enzimas que actúan sobre compuestos glicosilados:
 - Hialuronidasa
 - Enzima similar a heparinasa
 - NAD nucleosidasa.
- Enzimas que actúan sobre puentes peptídicos (proteasas):
 - Endopeptidasas
 - Peptidasas
 - Arginina ester hidrolasas (Ej: Enzima similar a trombina)
 - Kininogenasas
- Enzimas que actúan sobre puentes de ésteres carboxílicos:
 - Fosfolipasa A2
 - Fosfolipasa B y C (raras).
 - Acetilcolinesterasa
- Enzimas que actúan sobre arilamidas:
 - Enzima hidrolítica de Leucil beta naftil amida.

II) TOXINAS POLIPEPTIDICAS CARENTES DE ACTIVIDAD ENZIMATICA:

- Neurotoxinas elapídicas postsinápticas.
- Citotoxinas (sólo algunas de ellas).

III) PEPTIDOS: comprendidos en 3 grupos:

- Potenciadores de la acción de las kininas, e incluyen a los inhibidores de la enzima convertasa (hipotensores)
 - Factores de crecimiento nervioso.
 - Miscelánea.
-

TABLA 2: Constituyentes no proteicos detectados en el veneno de serpientes.

- I) LIPIDOS:
 - Colesterol.
 - Lecitina

 - II) CARBOHIDRATOS:
 - Galactosa
 - Glucosa
 - Ribosa
 - Manosa
 - Fucosa

 - III) RIBOFLAVINA: (Coenzima de la L-aminoácido oxidasa)

 - IV) NUCLEOSIDOS Y NUCLEOTIDOS: (Productos de la lisis celular?)
 - Guanosina trifosfato
 - Uridina difosfato
 - Guanosina
 - Adenosina
 - Inosina

 - V) AMINOACIDOS LIBRES: Presentes en todos los venenos estudiados, predominando:
 - Glicina
 - Serina
 - Acido aspártico
 - Acido glutámico
 - Histidina

 - VI) AMINAS BIOGENAS:
 - Serotonina
 - Bufotenina
 - N-metil-triptofano
 - Nor-epinefrina
 - Acetilcolina

 - VII) ANIONES Y CATIONES:
 - Na^+ , K^+ , Mg^{+2} , Ca^{+2} , Zn^{+2} , Cu^{+2} , Mn^{+2} y Fe^{+2}
-

rotoxinas, cardiotoxinas, nefrotoxinas, hemolisinas, necrotoxinas, hemorraginas y/o fracciones anticoagulantes y otras [1, 2, 4, 11, 14, 16, 19, 22, 23, 46, 50, 51, 57, 60]. En la actualidad se considera al envenenamiento como la resultante de la interacción de una serie de principios tóxicos, que ejercen su acción mediante la alteración de la homeostasis en uno o más órganos y/o sistemas de la economía [51]. Entre los factores presentes en el veneno de serpientes se han acusado de ser responsables de sus acciones tóxicas, a proteínas con actividad enzimática (Kalikreína, enzima similar a trombina, fosfolipasa) y a polipéptidos de bajo peso molecular (neurotoxinas, cardiotoxinas, etc). Los eutacoides histamina y serotonina y diferentes péptidos han sido acusados de ser responsables de la actividad inflamatoria, acciones vasomotoras y la producción de dolor durante el envenenamiento [6, 18, 34, 36, 39, 40, 41, 51, 54, 58, 60].

QUIMICA Y FARMACOLOGIA DEL VENENO DE LACHESIS MUTA MUTA

Toxicidad de veneno lachésico:

Bolaños y colaboradores [9] estudiaron en Costa Rica, la LD₅₀ del veneno de *L. muta stenophrys* correspondiendo ésta a un valor de 6.1 (rango 5.8 a 6.3) mg/Kg ip, lo que sugiere una mayor toxicidad para esta subespecie. Gutiérrez y col. [28], han obtenido resultados similares para la subespecie *L. muta melanocephala* que se distribuye en la región del Pacífico en Costa Rica y posee una LD₅₀ ip de 6 mg/kg (rango: 5.7 a 6.4 mg/kg) [10]. Nuestros estudios han mostrado que el veneno de *Lachesis muta muta* es en general poco tóxico cuando se aplica por vía intraperitoneal al ratón, en comparación con el veneno de otros crotálicos (Tabla 3). La LD₅₀ en este modelo experimental correspondió a 14.1 mg/kg de ratón (rango 12.8 a 15.5) [67]. Esta baja potencia tóxica del veneno no explicaría, sin embargo, la ocurrencia de casos severos y aun mortales en humanos. Esta aparente elevada toxicidad del veneno podría explicarse por las grandes cantidades de veneno que los ejemplares de *L. muta muta* son capaces de inyectar a sus víctimas. Así, por ejemplo, se conoce que de ejemplares adultos de tamaño promedio es posible obtener cantidades de veneno desecado que fluctúan entre los 250 y 350 mg por serpiente y por extracción. Esta cantidad es de 6 a 8 veces mayor que aquélla obtenida de serpientes *Bothrops atrox* [9, 10].

En ratones los efectos más característicos del envenenamiento por vía intraperitoneal incluyen hemorragia, hipotermia, dificultad respiratoria, parálisis del tren posterior y muerte. Aun cuando es ampliamente conocido, que de las diferentes vías de aplicación de fármacos, la vía endovenosa es la que usualmente presenta menores valores para la LD₅₀, y permite utilizar menores

TABLA 3: Toxicidad aguda (DL₅₀) de venenos de serpientes de la Familia Crotalidae por vía intraperitoneal en ratones albinos*

ESPECIE	PROCEDENCIA	DL ₅₀ (ug/raton)*
<i>Agkistrodon bilineatus</i> b.	Costa Rica	29.0
<i>Bothrops asper</i>	Sudamérica	62.5
<i>B. alternatus</i>	Brasil	64.1
<i>B. cotiara</i>	Brasil	106.9
<i>B. godmani</i>	Brasil	73.0
<i>B. jararaca</i>	Brasil	40.4
<i>B. jararacusu</i>	Brasil	103.8
<i>B. lateralis</i>	Brasil	108.7
<i>B. moojeni</i>	Brasil	105.5
<i>B. nasutu</i>	Brasil	106.9
<i>B. neuwiedii</i>	Brasil	54.2
<i>B. nigroviridis</i> n.	Brasil	61.5
<i>B. nummifer mexicanus</i>	México	125.0
<i>B. ophryomegas</i>	Sudamérica	73.0
<i>B. pradoi</i>	Brasil	95.4
<i>Crotatus durisus terrificus</i>	Sudamérica	13.6
<i>Lachesis muta muta</i>	Colombia	166.6
	Perú	186.8
<i>Lachesis muta stenophyrs</i>	Costa Rica	
	(var. Atlántica)	112.0
	Costa Rica	
	(var. Pacífico)	151.9

* 14 a 18 gramos de peso corporal, 48 horas de envenenamiento.

cantidades de agente tóxico. Sin embargo, Incio e Incio [33] y Siles y col. [55] no pudieron obtener la LD₅₀ debido a la ocurrencia de gran número de muertes inmediatas, después de la inyección del veneno por esta vía. Esta imposibilidad de evaluar la toxicidad por vía endovenosa, puede ser atribuida a la acción inmediata del factor hipotensor del veneno, y la ocurrencia de trastornos severos del sistema cardio-respiratorio [67].

Herrera ha demostrado que la radiación gama del cobalto-60 eleva la LD₅₀ del veneno de *L. muta muta*, disminuyendo la actividad letal del veneno [29, 30]. En este mismo estudio, se sugirió que las actividades enzimáticas que presentan mayor asociación con la letalidad en el ratón son la actividad de tamerterasa (marcador de la enzima coagulante similar a trombina), exonucleasa y endonucleasa. Lamentablemente ese estudio no incluyó a la actividad hipotensora, la que hemos demostrado, previamente, tiene un rol importante en la toxicidad y mortalidad observada en perros [67]. Balvin y Rodríguez-Tafur reportaron resultados similares de neutralización de la actividad tóxica letal de veneno de *B. atrox*, por acción de la radiación con ⁶⁰Co [7], y Becerra reportó recientemente la inactivación de varias actividades biológicas en el veneno de *L. muta muta*, por acción de la radiación neutrónica [8].

EFFECTOS LOCALES DEL VENENO DE *Lachesis muta muta*:

El veneno de *Lachesis muta* posee acción citotóxica, edematizante, hemorrágica y mionecrótica local. [68].

CITOTOXIDAD

La actividad citotóxica de los venenos ofídicos se ha relacionado a la actividad proteolítica y lipolítica (fosfolipásica) [3, 36, 60]. Esta última es responsable de los cambios específicos de la permeabilidad iónica transmembrana en células neuronales, musculares y eritrocitos. Goffi y col. estudiaron la acción citotóxica del veneno de *L. muta muta* y otros 5 venenos de crotálicos (*B. atrox*, *B. barnetti*, *B. pictus*, *B. brazilii* y *C. durissus terrificus*) sobre células de estirpe fibroblastoide de ratón (línea 3T3). Todos los venenos presentaron efecto citotóxico *in vitro* sobre éstas, y el veneno de *L. muta muta*, resultó ser poseedor de elevada potencia citotóxica (DE₅₀ = 681 ng/ml) [21].

EDEMA

El edema es uno de los efectos más precoces y prominentes del envenenamiento por mordedura de serpientes crotálicas. La génesis del edema producido por el veneno de *Lachesis muta muta* no es aún totalmente conocida, sin embargo, su ocurrencia ha sido reportada tanto en humanos, como en modelos experimentales animales [11, 23, 27].

El edema se define como el incremento de fluido intersticial ocasionado por un incremento de la permeabilidad en los vasos de pequeño calibre, causando extravasación del plasma y acúmulo de éste en el espacio extravascular intersticial [11]. Los mecanismos de producción del edema inducido por veneno de serpiente son múltiples, mereciendo citarse entre ellos:

- Deterioro de la membrana celular.
- Acción de un factor peptídico capaz de incrementar la permeabilidad de la membrana vascular, sin destruirla. En este grupo se incluirían las kininas, y otros péptidos [34, 38, 39, 40, 41, 53, 59].
- Acción de las anafilatoxinas, histamina y otros eutacoides, los que pueden ser liberados en el curso del envenenamiento [36].

Entre los factores proteicos del veneno, capaces de inducir edema se cuentan:

- Las fosfolipasas A2 provocan un edema persistente. Estas se han descrito en los venenos de *Vipera ruselli* [64], y de *T. flavoviridis* [65]. Se ha postulado que la inducción de edema por las fosfolipasas puede deberse a procesos que promueven disfunción en la membrana celular con pérdida de los fosfolípidos de membrana y/o la generación de productos de hidrólisis como los lisofosfátidos y ácidos grasos libres, incluyendo al ácido araquidónico [49, 53, 64, 65].
- Las kininogenasas ó polipéptidos liberadores de kininas. Existen múltiples ejemplos reportados en los venenos de crotálicos [38, 53], y su presencia en el veneno lachésico ha sido reportada por nosotros en 1985 [67].
- Otras enzimas proteolíticas similares a tripsina [36].

Aun cuando el efecto edematígeno no ha sido estudiado en detalle en este veneno, es previsible que guarde relación con la actividad kininogénica, la que ha sido detectada en varios estudios previos [37, 67]. El efecto edematoso producido por el veneno lachésico estaría asociado a la marcada disminución de las proteínas plasmáticas y/o solutos plasmáticos observada en los ratones envenenados [31] (figura 1), en forma similar a la descrita por Pancorbo en 1988, para el veneno de otro crotárido peruano, la *B. barnetti* [47].

HEMORRAGIA

La hemorragia local es uno de los efectos biológicos particularmente importantes de los venenos de las serpientes vipéridas y crotálicas [1, 5, 11, 17, 22, 51]. En los casos menos severos, la hemorragia se limita al tejido cutáneo y subcutáneo de sitio de inyección, pero en los casos más graves puede afectar la capa muscular, contribuyendo a la hipoxia regional y la mionecrosis [36, 51]. In vitro, el sustrato más empleado para el estudio de la actividad proteásica de las hemorraginas del veneno de serpiente, ha sido la caseína. Sin embargo, no todas las hemorraginas son activas sobre este sustrato, lo que dio pie a la hipótesis de que algunas de las hemorraginas no fueran proteasas. Recientemente, y con el empleo de otros sustratos específicos para proteasas, se ha determinado que todas ellas poseen alguna variedad de efecto proteolítico. (Tabla 4).

Hasta hace poco tiempo se creía que algunos factores de coagulación eran responsables de la hemorragia inducida por el veneno de serpiente; y que las proteasas eran capaces de lesionar los capilares y provocar la hemorragia. El primer concepto es aparentemente erróneo; la hemorragia es provocada por proteasas tóxicas, las que actúan lesionando el endotelio capilar y provocando extravasación sanguínea. Estas toxinas son conocidas como factores hemorrágicos o hemorraginas, aceptándose que el estado de anticoagulación coadyuva al sangrado, pero por si solo no es capaz de provocarlo [36].

De los estudios histológicos de las lesiones hemorrágicas producidas por venenos de serpientes a nivel cutáneo se conoce que las hemorraginas de estos venenos provocan dos tipos de efectos en los capilares:

- a) La destrucción de porciones del endotelio, formando rupturas por donde escapan los hematíes.
- b) La formación de espacios virtuales entre las células endoteliales, por donde migran los eritrocitos.

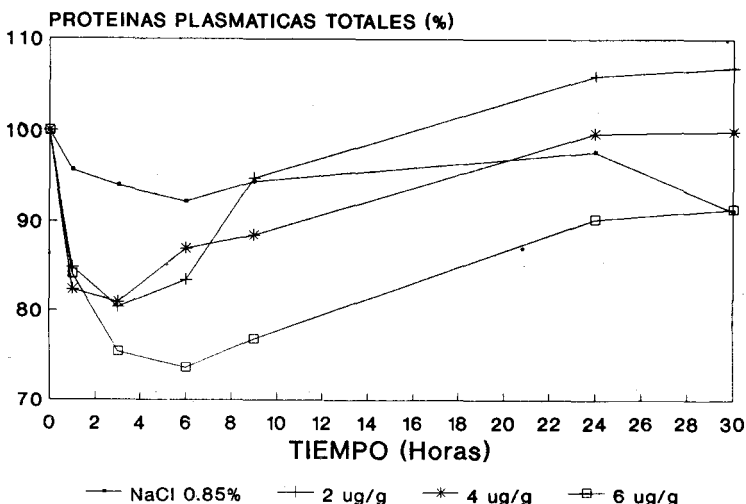


Figura 1: Efectos del veneno de *Lachesis muta muta* sobre los niveles de las proteínas plasmáticas totales de ratones envenenados por vía intramuscular. (Fuente: Zavaleta, 1989, referencia 69).

TABLA 4: Propiedades de hemorraginas purificadas y enzimas proteolíticas aisladas de venenos de serpiente.

VENENOS (origen)	Nombre	Peso molecular (daltons)	Actividad biológica detectada
Agkistrodon acutus (Formosa)	AC ₁ proteinasa	24000	hemorrágica, proteolítica
Crotalus atrox (USA)	Toxina hemorrágica		
	a	68000	hemorrágica, proteolítica
	b	24000	hemorrágica, proteolítica, miotóxica
	c	25000	hemorrágica, proteolítica
	d	24000	hemorrágica, proteolítica
	e	25700	hemorrágica, proteolítica
Crotalus horridus horridus (USA)	HP-IV	56000	hemorrágica, proteolítica
Trimeresurus flavoviridis (Japón)	Proteinasa	56000	hemorrágica, proteolítica

modificado de Tu, A.T. (1977) (referencia 70).

La primera referencia sobre el efecto hemorrágico del veneno lachésico fue presentada por Vellard en Lima en 1954 [62], quien menciona que “este veneno era fuertemente hemorrágico”, sin llegar a cuantificar esta actividad. En 1981 y 1985 reportamos que el veneno de *L. muta muta* inyectado por vía subcutánea produce hemorragia en la piel del ratón [66, 67] y es capaz de provocar hemorragia local en la superficie pleural del perro luego de su aplicación tópica [67]. Incio e Incio corroboraron nuestros resultados en 1986, y cuantificaron la actividad hemorrágica tanto en piel de ratón como en pulmón canino [33]. De sus resultados se puede deducir que el veneno de *L. muta muta* es menos hemorrágico que el veneno de *B. barnetti*, y que el(los) factor(es) responsables de la hemorragia, son antigénicos.

Kondo y col. reportaron en 1960, un método práctico y sencillo para cuantificar la hemorragia inducida por veneno de serpiente en la piel del conejo [35]. En este método se inyectan diluciones del veneno (o de la hemorragina) por vía subcutánea y el área hemorrágica producida por el veneno se mide después de un tiempo fijo en la cara interna de la piel. una dosis hemorrágica mínima se define como la menor cantidad de veneno que produce una lesión hemorrágica de 10mm de diámetro en 24 horas. Este método fue revisado, y precisado en sus aspectos estadísticos por Aguirre y col. [2], y constituye el método de referencia nacional para el estudio de la acción hemorrágica de venenos ofídicos peruanos y sus antivenenos homólogos.

La presencia de hemorraginas en el veneno de *L. muta muta* se ha demostrado hasta la fecha en cinco modelos diferentes: piel de ratón [23, 67]; la superficie pleural del perro [33, 67] y en la piel del cobayo y la rata [68]. El quinto modelo experimental (conejo), ha sido empleado recientemente por Castillo en nuestro laboratorio (Castillo, 1989, resultados no publicados).

La DHM obtenida en cobayo fue de 2.28 ug, mientras que la DHM en ratas fue diez veces mayor que la registrada en cobayos (DHM = 24.5 ug), lo que confirma la existencia de sensibilidades diferentes para la fracción hemorrágica en la piel de mamíferos (Figura 2). La DHM registrada por Incio e Incio para veneno crudo cristalizado de *L. muta muta* en ratones, fue de 2.5 ug siendo ligeramente mayor que la obtenida por nosotros en cobayos [33].

Gutiérrez y Chávez [24] estudiaron la potencia hemorrágica de una serie de venenos ofídicos, empleando el modelo ratón. Dichos resultados coinciden con los obtenidos por nosotros, demostrándose que el veneno de *L. muta muta* es poseedor de una potente actividad hemorrágica en comparación con la

HEMORRAGIA EN PIEL (ABDOMEN) VENENO L. MUTA MUTA CRISTALIZADO

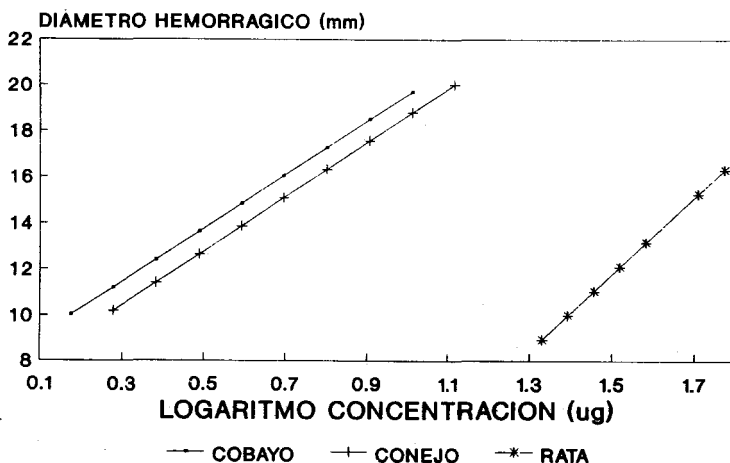


Figura 2: Actividad hemorrágica del veneno de *Lachesis muta muta* en la piel de la región abdominal de *Cavia aperea* var porcellio (cobayo); *Oryctolagus cuniculus* (conejo) y *Rattus rattus* (rata, cepa Holtzman). La piel del cobayo presenta mayor sensibilidad frente a la acción de las hemorraginas del veneno de serpiente. (Fuente: Castillo, Zavaleta y Pino, 1989, resultados no publicados).

mayoría de venenos biotrópicos y el veneno de *C. durissus durissus*. Su actividad fue menor, sin embargo, que la de la serpiente peruana *B. barnetti* [33], y que la de la serpiente costarricense *B. picadoi*, la que tendría el veneno más hemorrágico en el área centro y sudamericana.

Estudios recientes en nuestro laboratorio mostraron que la piel de abdomen del cobayo, es más adecuada que la piel del conejo para el estudio cuantitativo de la hemorragia inducida por veneno de *L. muta muta* [68]. Castillo usó esta técnica para el estudio de la actividad hemorrágica de las fracciones obtenidas luego de la separación cromatográfica del veneno de *L. muta muta*, demostrando la existencia de, por lo menos, 4 fracciones con actividad hemorrágica en el veneno de *L. muta muta* (Castillo y col., 1989, resultados no publicados). Flores y col. han aislado y caracterizado una proteína hemorrágica del veneno de *L. muta muta* colectado en Brasil. Esta hemorragina corresponde a una proteína básica de 23 KD de peso molecular que carece de actividad proteolítica sobre caseína [19].

MIOTOXICIDAD

La capacidad de veneno para producir alteraciones de la fisiología normal del músculo esquelético o cardíaco, resultante en daño muscular, ha sido definida como miotoxicidad [53].

Las miotoxinas se han aislado y caracterizado en la última década, y son clasificadas en 3 grupos diferentes, cuyos mecanismos de acción han sido revisados recientemente por Salas y col. [53]:

- Miotoxinas con actividad de fosfolipasa A2
- Miotoxinas cardiotoxicas (cardiotoxinas)
- Miotoxinas de bajo peso molecular.

Las fosfolipasas A2 miotóxicas se han purificado mediante técnicas de cromatografía en columnas de gel sephadex, intercambio iónico en CM-celulosa. El peso molecular de estas enzimas fluctúa entre 14 y 15 KD, y contienen de 120 a 129 residuos aminoacídicos y 4 enlaces disulfuro por molécula. La composición aminoacídica de 7 fosfolipasas A2 miotóxicas es mostrada en la Tabla 5.

Las cardiotoxinas son proteínas tóxicas carentes de actividad fosfolipásica, tienen naturaleza polipeptídica de cadena única, constituida por 54 a 62 residuos aminoacídicos, contienen hasta 15 aminoácidos diferentes, y poseen 4 enlaces disulfuro. Su peso molecular fluctúa entre 4 y 6 KD. Son termoestables en medio ácido, pero no en medio alcalino, y son constituyentes importantes de los venenos de elápidos (género *Naja*). [52]. La presencia de cardiotoxina ha sido descartada recientemente por nosotros en el veneno de *L. muta muta* [155].

El tercer grupo de miotoxinas está constituido por miotoxinas de bajo peso molecular, presentes en los venenos de crotálidos, e incluye a un grupo de polipéptidos fuertemente básicos, cuyo peso molecular oscila entre 4 y 6 KD, contienen 42 a 50 aminoácidos y 2 puentes disulfuro. En este grupo se incluyen la Miotoxina A de *Crótalus viridis viridis*, el péptido C del veneno de *Crótalus viridis helleri*, y la crotamina del veneno de *Crótalus durissus terrificus*. En la Tabla 6 se muestra la composición aminoacídica de 5 miotoxinas de este grupo.

TABLA 5: Composición aminoacídica de Fosfolipasas A2 miotóxicas de venenos crotálicos comparados con miotoxinas de venenos de elápidos australianos (+).

Amino-ácido	Bothrops asper	Trimeresus flavoviridis	<i>Agkistrodon</i>			<i>Pseudechis</i>	
			bilineatus	c. mokeson	piscivorus	porphyriacus	colletti fracción I
Asp.	15	13	13	15	14	18	17
Thr.	6	7	8	7	7	8	8
Ser.	6	5	5	5	5	4	7
Glu.	8	9	10	11	10	10	6
Pro.	5	7	4	6	5	5	7
Gly.	9	9	8	7	8	10	12
Ala.	7	7	7	5	6	10	10
Cys 1/2	14	14	14	14	14	14	14
Val.	3	6	2	2	3	3	4
Met.	1	2	2	2	2	4	3
Ile.	2	3	5	4	3	3	4
Leu.	9	5	9	7	7	3	5
Tyr.	10	9	9	9	7	6	7
Phe.	2	3	3	3	2	3	4
Lys.	20	18	18	19	18	10	14
His.	1	1	3	2	3	2	2
Arg.	5	3	6	5	4	4	3
Trp.	1	2	3	2	2	3	2
Total de residuos	124	123	129	125	120	120	129
Peso molecular	14106	13914	15070	14570	13720	13400	14100

(+) Adaptado de Salas y col, BIOTA XIII (94): 59 (1987). (referencia 52).

MIONECROSIS

La mionecrosis, al igual que la hemorragia, constituye otro de los efectos locales de mayor importancia médica en el ofidismo, conduciendo en casos extremos a la pérdida total del músculo con amputación del miembro afectado [51]. Una amplia revisión de la metodología empleada para el estudio de mionecrosis y los factores mionecróticos del veneno de serpiente fue reportada recientemente [52]. Una de las técnicas más utilizadas para el estudio de la mionecrosis *in vivo*, es la cuantificación de la enzima CPK en el plasma. Bolaños ha demostrado en el envenenamiento experimental por *B. asper* que, cuando el CPK alcanza los valores más altos, el cuadro histológico todavía no ha evaluado totalmente, es decir la determinación de CPK puede

predecir la severidad del evento, aún cuando todavía no haya manifestaciones histológicas visibles, por lo que resulta un indicador de utilidad en la práctica médica [11].

Para el estudio de la actividad mionecrótica del veneno de *Lachesis muta* medimos los niveles plasmáticos de la enzima CPK en cobayos tratados con veneno por vía im. Los niveles de esta enzima incrementaron significativamente en los cobayos tratados con veneno, lo que es consistente con la existencia de mionecrosis (figura 3), al igual como se ha reportado para otros venenos de serpiente [23, 24, 25, 26, 42]. El efecto mionecrótico ha sido observado también por uno de nuestros colaboradores, en cortes histológicos de músculo de ratón tratado con veneno lachésico, el que estuvo asociado a un incremento en los niveles de CPK plasmático (Salas, M., 1989, comunicación personal).

TABLA 6: Composición aminoacídica de tres toxinas de serpientes del género *Crótalus* con actividad mionecrótica comparadas con la miotoxina A y el péptido C. (+).

Amino-ácido	<i>Crotalus adamanteus</i> (F III)	<i>C. durissus terrificus</i> (Crotamina)	<i>C. horridus horridus</i> (F III)	<i>C. viridis viridis</i> (Miotoxina A)	<i>C. viridis Helli</i> (Péptido C)
Asp.	4	3	3	2	3
Thr.	2	0	1	0	1
Ser.	4	3	3	3	3
Glu.	1	2	1	2	0
Pro.	4	3	3	3	3
Gly.	5	5	4	5	4
Ala.	0	0	0	0	0
Cys 1/2	6	6	6	6	6
Val.	2	0	2	0	2
Met.	1	1	1	1	1
Ile.	1	1	1	2	1
Leu.	1	1	1	1	1
Tyr.	1	1	1	1	1
Phe.	2	2	2	1	2
Lys.	9	9	7	10	9
His.	2	2	2	2	2
Arg.	3	2	3	1	2
Trp.	2	2	2	2	2
Total de Residuos	50	43	43	42	43
Peso Molecular	5787	5024	5019	4847	4990

(+) Adaptado de Mebs y col, TOXICON, 21(3): 401, (1983) (referencia 42)

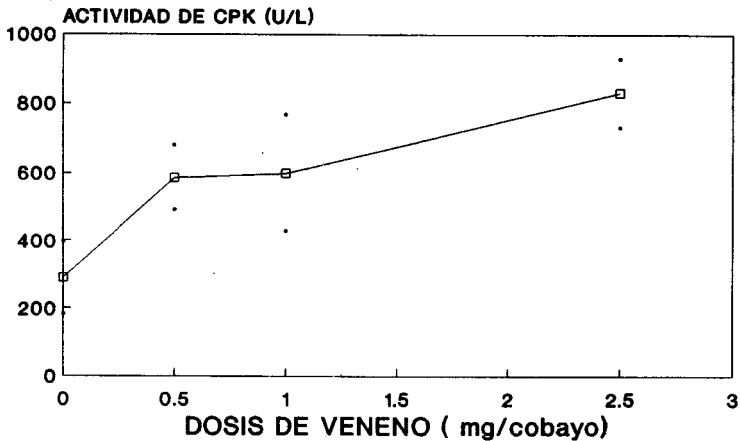


Figura 3: Actividad mionecrótica del veneno de *Lachesis muta muta* en cobayos envenenados por vía intramuscular. Se observa el incremento de los niveles plasmáticos de creatina fosfoquinasa (CPK), luego de tres horas de envenenamiento en función de la dosis de veneno inyectada. (Fuente: Zavaleta, 1989, referencia 69).

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Abalos, J. Walter. (1977). **Que sabe Ud. de Víboras?** Editorial Losada S.A. Buenos Aires, 175 p.
2. Aguirre Santa Cruz, C. Eduardo. (1989). Actividad mionecrótica del veneno de la serpiente peruana *Bothrops barnetti* (Parker 1938). Tesis Bachiller Biología, Facultad de Ciencias y Filosofía. Universidad Peruana Cayetano Heredia, Lima, 85 p.
3. Alvarez Morales, María Teresa. (1988). Actividad fosfolipásica de serpientes peruanas. Tesis Bachiller en Biología. Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Ricardo Palma (Lima), 55p.
4. Aragon-Ortiz, F. and Gubensek, F. (1986) Isolation and properties of blood coagulating enzyme from the venom of *L. muta*. Proceedings of the 7th. European Symposium on Animal, Plant and Microbials. Praga. (Kornalik, F. and Mebs, E. EDS). International Society on Toxicology, 94 p.

5. Arévalo, Julio. (1965). Ofidismo en Loreto. Tesis de Bachiller en Medicina, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima. 60 p.
6. Bailey G. and Shipolini, R. (1976). *Biochem, J.* **153**; 409-414
7. Balvin, N. G. Y Yodriguez-Tafur, J. (1984). *Bol. Inst. Nac. Salud (Lima)*. **5** (4): 113-148, 115-119.
8. Becerra Rusconi, Paul Patrick. (1987). Efecto de la irradiación neutrónica por U-235 sobre la actividad biológica del veneno de la serpiente *Lachesis muta muta* "Shushupe". Tesis, Licenciado en Biología, Universidad Ricardo Palma, Lima, 87 p.
9. Bolaños, R. (1972). *The Amer. J. Tropical Medicine Hyg.* **121** (3): 360-363.
10. Bolaños, R. Muñoz G, Y Cerdas L. (1978). *Toxicon*, **16**: 295-300
11. Bolaños, Roger. (1984). **Serpientes, veneno y ofidismo en Centro América**. Editorial Universidad de Costa Rica, San José, 136p.
12. Campos, S.; Escobar, E.; Lazo, F.; Yarleque, A.; Marsh, N.A.; Peyser, P.M.; Whaler, B.C.; Creighton, T. (1985). *Toxicon*, **23** (4): 558.
13. Carrillo de Espinoza, Nelly. (1983). *Publicaciones Museo de Historia Nat. J. Prado, Serie A*, **30**: 1-55.
14. Cevese, A.; Gatullo, D. (1983). *Toxicon*, **21** (1): 67-74.
15. Chang Neira, J. Y Zavaleta Martínez-Vargas, A. (1987). *Diagnóstico (Lima)*, **20** (4): 115-120
16. Condrea. E. (1979) Hemolytic effects of snake venoms. En: Snake venoms. *Handbook Exp. Pharmacol.* Vol. 52. (Lee, C. Y. Ed), Berlin, Springer Verlag,: 448-472.
17. Fernández Lancho, Manuel. (1969). *Tribuna Médica*, **5**: 1-2.
18. Ferreira, S. H. (1965). *Brit. J. Pharmacol.* **24**: 162-169.

19. Flores Sánchez, E.; Magalhaes, A. and Diniz, C. R. (1987) *Toxicon*, **25** (6): 611-619.
20. Geiger, R. and Kortmann, H. (1977). *Toxicon*, **15**: 257-259.
21. Gofii, M.; Zavaleta Martínez-Vargas, A. y Vaisberg, A. (1988) Cito-toxicidad inducida por veneno de serpiente. V *Jornadas Científicas Y Segundas Jornadas Científicas Estudiantiles de la Universidad Peruana Cayetano Heredia*, Resumen **34**: 108.
22. Gutiérrez, J. Bolaños, R. (1980). *Bol. Ofic. Sanitaria Panamericana*, **89** (2): 149-156.
23. Gutiérrez, J. M. Arroyo, O.; Bolaños, R. (1980). *Toxicon*, **18**: 603-610.
24. Gutiérrez, J. M. y Chávez, F. (1980). *Toxicon*, **18**: 315-321.
25. Gutiérrez, J. M. y Cerdas, L. (1984). *Rev. Biol. Trop.*, **32** (2): 213-222.
26. Gutiérrez, J. M. (1986). Myonecrosis induced by *Bothrops asper* venom: pathogenesis and treatment. Proceedings of the Second American Symposium on Animal, Plant and Microbial Toxins, Stillwater, Oklahoma, (Ownby, Ch. Ed): 27-39.
27. Gutiérrez, J. M.; Rojas, G.; Lomonte, B.; Gene, J. and Cerdas, L. (1986). *Comp. Biochem. Physiol.* **85C** (1): 171-176.
28. Gutiérrez, José María; Rojas, G. y Cerdas, L. (1987). *Toxicon*, **25** (7): 713-720.
29. Herrera Cabrera, Ermelinda H. (1985). Efectos de la radiación gama sobre la actividad biológica del veneno de las serpientes *Lachesis muta* y *Bothrops atrox*. Tesis Licenciado en Biología. Universidad Ricardo Palma, Lima. 66 pp.
30. Herrera, E.; Yarleque, A.; Campos, S. y Zavaleta, A. (1986). *Informe Nuclear* (Lima), **3** (1): 1-14.
31. Hidalgo, J. A.; Guerra, G. R. y Zavaleta Martínez - Vargas, A. (1985). *Revista de la Anbiop*, **3** (2): 47-52.

32. Hoge, A. R. and Romano, S. A. (1971). Neotropical pit Vipers sea snake and Coral snake. En: **Venomous animals and their venoms**. Vol. II: **Venomous Vertebrates**. (Bucherl, W. and Buckley, E. Ed.) New York, Academic Press, p. 211.
33. Incio Ruiz, Rosa E. e Incio Ruiz, Luis E. (1986). Efecto letal y hemorrágico de los venenos de serpientes peruanas de los géneros *Lachesis* y *Bothrops*. Tesis de Licenciado (Microbiología-Parasitología) Universidad Nacional "Pedro Ruiz Gallo", Lambayeque. 57 pags.
34. Kato W. and Susuki, T. (1971). *Biochemistry* **10** (6): 972-980.
35. Kondo H., Kondo S., Ikezawa H., Murata R. (1960). *Japan J. Medical Sciences & Biol*, **13**: 43-51.
36. Lee, Chen-Yuan. (Ed). (1979). Snake venom. New York. Springer Verlag. **Handbook of Exper. Pharmacology**, **49**: 1150 p.
37. Loayza Benzaquen, Simy Lis. (1983). Efecto del veneno de las serpientes *Lachesis muta* y *Bothrops atrox* sobre fibrinógeno bovino y substratos sintéticos. Tesis Licenciado en Biología, Universidad Ricardo Palma (Lima), 30 p.
38. Lomonte, B. (1985). *Toxicon*, **23** (1): 173-176.
39. Magalhaes, A.; María, L. and Diniz, C. R. (1973). *Ciencia e Cultura*, **25** (9): 873.
40. Margolis, J.; Bruce, S. (1965). *Aust. J. Exp. Bil. Med.Sci*, **43**: 237-244.
41. Markaland E.S.; Kettner, C. Schiffman S. (1982). *Proc. Natl. Acad Sci. USA*. **79**: 1688-1692.
42. Mebs, D. Ehrenfels, Samejina, Y. (1983). *Toxicon*, **21** (3): 393-404.
43. Meneses, Oswaldo. (1974a). *Rev. Instituto Zoonosis e Investigación Pecuaria*; **2** (3-4): 69-77.
44. Meneses, Oswaldo. (1974b). *Rev. Inst. Zoonosis e Investigación Pecuaria*, **2** (3-4): 79-84.

45. Meneses, Oswaldo. (1974c). **Los animales venenosos y sus peligros.** Publicación 2, Ministerio de Salud. Institutos Nacionales de Salud. 20p
46. Mori, N.; Nikai, T.; Sugihara, H. and Tu, A. (1987). *Arch. Biochem. and Biophys.* **253** (1): 108-121.
47. Pancorbo Luglio, María Zonia. (1989) Evaluación del ofidismo experimental en ratones albinos mediante el método refractométrico. Tesis de Bachiller en Biología. Universidad Ricardo Palma, Lima. 46p.
48. Pernaz Linsuy, Guillermo Antonio. (1982). Ofidismo: Estudio retrospectivo de 103 casos en el hospital general de La Merced (Chanchamayo Junín) Tesis Bachiller en Medicina, Facultad de Medicina, Universidad Peruana Cayetano Heredia, Lima, 50 p.
49. Rosenberg, P. (1976). *Toxicon*, **14**: 416-417.
50. Russell, F. and Puffer, H. (1970). *Clinical Toxicology*, **3** (3): 433-444.
51. Russell, Findlay E. (1980). **Snake venom poisoning.** New York, Scholium International.: 172-176.
52. Salas, M.; Aguirre, E. y Zavaleta, A. (1987). *Biota* (Lima), **94**: 52-68.
53. Sato, T.; Iwanaga, S.; Mizushima, Y. and Suzuki, T. (1965). *J. Biochem*, **57** (3): 380-391.
54. Schachter, M. (1966). *Physiological Reviews*, **49** (3): 509-542.
55. Siles, M.; Zelante, F.; Rolim, R. y de Lorenzo, J. (1981). *Memorias do Instituto Butantan* (Sao Paulo), **44/45**: 281-288.
56. Silva Haad, J. (1980). *Memorias do Instituto Butantan* (Sao Paulo), **46/48**: 403-423.
57. Stocker, K. (1986) Alistar Reid memorial lecture: Use of snake venom proteins in the diagnosis and therapy of hemostatic disorders. Proceedings of the 7th. European Symposium on Animal, Plant and Microbials. Praga. (Kornalik, F. and Mebs, E. Eds.). International Society on Toxicology: 9-40.

58. Suzuki, T.; Iwanaga, J.; Sato, J. (1966). International symposium on vasoactive polypeptides Bradykinin and related kinins. Riberao Preto, Sao Paulo, Brasil, 27p.
59. Theakston, R.D.G. and Reid, H.A. (1983). *Bull. Wld. Hlth. Org.* **61**: 949.
60. Tu, T. Anthony. (1977). **Venoms: Chemistry and Molecular Biology**. Nueva York, John Wiley & Sons Inc, 545 p.
61. Uribe Uribe, L. J. (1985). *Acta Médica Peruana*, **12** (1): 39-46.
62. Vellard, Jean. (1948). *Publicaciones del Museo de Historia Natural "J. Prado"*, Serie A (1), 52p.
63. Vial, J. L. and Jiménez Porras, J. M. (1967). *Ann. Mid. Nat.* **78**; **182**, citado por Bolaños y col (1978), *Toxicon*, **16**: 295.
64. Vishwanath, B. S.; Kini, R. M. and Gowda, T. V. (1988) *Toxicon*, **26**(8): 713-720.
65. Vishwanath, B. S.; Kini, R. M.; Gowda, T. V. (1987) *Toxicon*, **25**: 501-507.
66. Zavaleta, A.; Planas, M. y Col. (1981). Estudios preliminares sobre los efectos locales del veneno de *Lachesis muta*, (Shushupe) en ratones albinos. Libro de Resúmenes I Congreso Nacional de Jóvenes Científicos, Lima. Resumen 20.
67. Zavaleta, Alfonso. (1985). Estudio farmacológico del veneno de la serpiente *Lachesis muta muta* "Shushupe". Tesis Magister en Ciencias (Farmacología), Facultad de Ciencias y Filosofía, Universidad Peruana Cayetano Heredia, Lima, 30 p.
68. Zavaleta, Alfonso. (1989). Caracterización farmacológica del veneno de la serpiente *Lachesis muta muta* "Shushupe". Tesis Doctor en Ciencias (Farmacología), Escuela de Post Grado Víctor Alzamora Castro, Universidad Peruana Cayetano Heredia, Lima, 94 p.
69. Zavaleta, A. (1986). Perspectivas de la utilización de venenos animales en Biología y Medicina. Libro de Resúmenes VIII Congreso Nacional de Biología, Arequipa. Resumen 11. p. 10.