

BIOQUIMICA DE VENENOS OFIDICOS

Los venenos ofídicos son los más complejos entre las ponzoñas de origen animal, tanto por la heterogeneidad de su composición como por la multiplicidad de los efectos tóxicos que producen simultáneamente sobre la sangre y los sistemas cardiovascular, respiratorio y nervioso. La clasificación tradicional de los venenos ofídicos en hemorrágicos, necrosantes y neurotóxicos parece en la actualidad objetable.

En principio, el supuesto predominio de algunos de los efectos parece depender de la dosis, la vía de inoculación y la especie animal empleada para el estudio. En segundo lugar, es frecuente lo que se conoce como "disociación de efectos". Así, si bien los venenos de Hydrophidae son fuertemente neurotóxicos y carentes de actividad proteolítica, en el emponzoñamiento humano se observa miólisis y mioglobinuria, que predominan sobre los síntomas de neurotoxicidad.

Los venenos de Elapidae, que son hemolíticos directos, no producen hemólisis "in vivo" y en cambio sí la producen venenos de Viperidae y Crotalidae, que son hemolíticos indirectos pero poseen una fuerte actividad procoagulante.

De algunos venenos es posible obtener una (o pocas) fracciones de alto poder letal, capaces de reproducir la mayor parte de los efectos tóxicos del veneno. Tales componentes suelen presentar una potencia letal superior a la del veneno entero y se los denomina "toxinas". Este término se emplea tradicionalmente para designar enzimas (p. ej. crototoxina, Bungarotoxina) y proteínas no enzimáticas (p. ej. cobrotoxina, bungarotoxina) altamente letales. En esos casos es posible, hasta cierto punto, caracterizar el componente responsable del efecto farmacotóxico más conspicuo de ese veneno y relacionarlo con la sintomatología que se observa en el ofidismo humano. Sin embargo ésta es su excepción y no la regla.

En general, existen varios componentes con acción letal, pero ninguno de ellos por separado son capaces de reproducir completamente los efectos tóxicos del veneno entero. En esos casos se admite que el efecto letal se debe a la acción simultánea y sinérgica de varios componentes. Por ejemplo, la acción cardiotoxica del veneno de *Bitis gabonica* desaparece luego de fraccionar el veneno y se restituye por la mezcla de los componentes.

De la comparación de los valores de la LD50 resulta que algunos venenos ofídicos son relativamente poco tóxicos. Sin embargo, ofidios que poseen venenos

relativamente poco letales son potencialmente capaces de inocular cantidades de veneno importantes, que pueden resultar de un rápido efecto letal. Al respecto puede mencionarse que los rendimientos de veneno por extracción y por individuo depende de la especie (desde unos mg en *Micrurus* hasta 2,5 g en *Lachesis muta* y 3,0 g en *Bitis gabonica*) y la severidad del emponzoñamiento depende no sólo de la letalidad del veneno sino también de la cantidad de veneno inoculado. Debe enfatizarse que, si bien la mordida y la inoculación de veneno son procesos neurológicamente secuenciales, la secuencia no es obligatoria. La inoculación de veneno depende, entre otros factores, de si la mordida es defensiva o agresiva, y en el primer caso puede haber mordidas sin inoculación de veneno. De hecho, en un 40% de los accidentes humanos, los pacientes no manifiestan signos clínicos de ofidismo; y en muchos casos se producen síntomas tóxicos pero no son fatales. En experimentos con ejemplares de *Vipera palestinae* a los que se había administrado aminoácidos marcados con N15, la cantidad de veneno inoculado luego de mordidas espontáneas a ratones se determinó midiendo la radioactividad local. Las cantidades variaron entre 0 (no inoculación) y 250 mg, y esa cantidad representaba sólo el 8% del veneno contenido en la glándula. Estas consideraciones previas deben tenerse en cuenta si se intenta estudiar seriamente el problema de ofidismo, ya que representan una seria dificultad cuando se trata de correlacionar la gravedad del accidente ofídico por una especie con la potencia letal de su veneno.

Corresponde ahora mencionar algunos aspectos bioquímicos, farmacológicos y tóxicos bien conocidos provocados por los venenos ofídicos.

NEUROTOXICIDAD: Varios venenos ofídicos son capaces de interferir la función del sistema nervioso periférico. Estos efectos, probablemente entre los más llamativos, han sido extensivamente estudiados. Los componentes responsables se denominan "neurotoxinas" y su efecto más importante consiste en el bloqueo de la transmisión del impulso del nervio al músculo. Este bloqueo de la transmisión neuromuscular puede ocurrir por diferentes mecanismos:

a) a nivel postsináptico: Las neurotoxinas que bloquean la transmisión neuromuscular a nivel postsináptico se encuentran típicamente en los venenos de Hydrophidae y Elapidae y se los denomina genéricamente ~~o~~ toxina. Tiene numerosos caracteres comunes: son péptidos no enzimáticos, altamente básicos (punto isoeléctrico 9,0), termoestables, ricos en puentes -S-S- que son esenciales para el efecto tóxico y altamente letal.

Producen el bloqueo de la unión neuromuscular de tipo antidespolarizante, ligándose a la subunidad del receptor de acetilcolina. La parálisis se asemeja a la

producida por la D tubocuranina, pero se diferencia porque (a) sólo son bloqueados los receptores de tipo nicotínico (la unión neuromuscular) y no los muscarínicos (por ej. ganglios) (b) presentan una latencia prolongada (c) pobre reversibilidad y (d) antagonismo incompleto o transiente por inhibidores de la colinesterasa. Desde el punto de vista estructural, un grupo de estas neurotoxinas tienen pesos moleculares entre 6700 y 7000, constituidas por 61 a 67 aminoácidos y contienen 4 puentes -S-S-. Se denominan neurotoxinas de "cadena corta" o de tipo I. La comparación de la secuencia de aminoácidos de las neurotoxinas de tipo I aisladas del veneno de cobra de Formosa (cobrotoxina) y del veneno de Laticauda semifasciata (las erabutoxinas a y b) exhiben un grado considerable de identidad. Se encuentran tanto en Hydrophidae como en Elapidae.

De los venenos de Elapidae se han obtenido neurotoxinas de 71 a 74 aminoácidos (peso molecular 7800) con 5 puentes -S-S- que se denominan "cadena larga" o del tipo II. A este grupo pertenecen la toxina α del veneno de Naja nivea, la toxina del veneno de N. melanoleuca, la toxina β del veneno de N. naja sianensis, la toxina A del veneno de N. naja naja y la α -bungarotoxina de veneno de Bungarus multicinctus. En la región central de estas moléculas se encuentran triptofano, tirosina, la mayoría de los aminoácidos básicos (lisina) y un residuo de glutámico, que serían responsables de la especificidad. El complejo que forman con el receptor de acetilcolina es excepcionalmente estable, con una constante de disociación del orden de 10^{-9} a 10^{-10} M. Más recientemente se han aislado otro grupo de toxinas postsinápticas de los venenos del género Dendroaspis (mambas africanas) que estructuralmente se asemejan a las neurotoxinas de cadena corta, pero no producen bloqueo de la unión neuromuscular. La "fasciculina" (de D. angusticeps) y la toxina C (de D. polylepsis) producen fasciculaciones (contracciones asincrónicas de grupos de fibras musculares) por aumento de la concentración efectiva del neurotransmisor acetilcolina ya que inhiben la acetilcolinesterasa en forma incompleta. Debe mencionarse que los inhibidores de la acetilcolinesterasa conocidos sobrepasan los 2000 y todos son inhibidores del sitio activo de la enzima. Por el contrario, las fasciculinas serían los únicos inhibidores conocidos que se ligan al "sitio periférico" o "aniónico" de la enzima.

b) a nivel presináptico: Estas toxinas (llamadas B-toxinas) se encuentran en los venenos de algunos Elápidos, Crotálicos y Vipéridos.

Elápidos:

B-bungarotoxina (Bungarus multicinctus)

toxinas III A y III B (B. ceruleus)
Taipoxina (Oxyuranus scutellatus)
Notexina (Notechis scutatus)

Crotálicos:

Crotoxina (Crotalus durissus terrificus)
Mohave toxin (C. scutulatus scutulatus)
Fosfolipasa A₂ básica (Trimeresurus mucrosquamatus)

Vipéridos:

Caudoxina (Bitis arietans)
Fosfolipasas A₂ tóxicas (Vipera berus)
Ammodytoxinas (Vipera ammodytes)

Desde el punto de vista bioquímico son fosfolipasas A₂ y su actividad enzimática es esencial para la toxicidad.

Su acción farmacológica presenta las siguientes características: (a) luego de una fase inicial de facilitación, producen una disminución progresiva de la liberación de acetilcolina, (b) se produce la disminución en frecuencia de los potenciales miniatura de placa terminal y disminuye la cantidad de neurotransmisor liberado por "quantum" y (c) producen poco o ningún efecto sobre la membrana postsináptica.

Si bien tiene efectos semejantes, presentan una considerable variedad estructural entre ellas. Así notexina, caudoxina y ammodytoxinas contienen una sola cadena peptídica. La B-bungarotoxina (y probablemente también las toxinas III A y III B) poseen dos cadenas peptídicas diferentes unidas por puentes -S-S-: la α de punto isoeléctrico elevado y que es responsable de la actividad fosfolipásica y la β , que es homóloga de los inhibidores de proteasas.

La crotoxina es un complejo no covalente formado por una fosfolipasa A₂ básica y un péptido ácido, carente de actividad enzimática o de toxicidad.

La notexina es un complejo de tres subunidades: α (básica) que es una fosfolipasa A₂; β (neutra) y γ (ácida) que contiene carbohidratos.

En cuanto al mecanismo de acción, es de especial interés el complejo crotoxina que se encuentra en el veneno de Crotalus durissus terrificus. La subunidad básica (crotoxina B) es el agente farmacológico crucial del complejo, ya que puede reproducir todo el efecto, si bien se requieren dosis elevadas. El péptido ácido (crotoxina A) forma espontáneamente un complejo con crotoxina B que potencia su acción letal. Para ejercer su acción tóxica el complejo debe disociarse a nivel de la unión neuromuscular, la fosfolipasa A₂ (crotoxina B) queda ligada a la membrana presináptica y cataliza la hidrólisis de los fosfolípidos de la membrana, lo que resulta en la liberación del neurotransmisor y el

consecuente bloqueo de la transmisión neuromuscular. La disociación del complejo sería promovida por la acetilcolina, a concentraciones estimadas como fisiológicas, lo que determinaría la especificidad de esta toxina por la región presináptica de la unión neuromuscular.

Recientemente se han aislado de venenos de mambas africanas otro grupo de toxinas presinápticas (dendrotoxinas y toxinas I y K) que actúan a nivel presináptico aumentando la liberación evocada de acetilcolina. No poseen actividad fosfolipásica y estructuralmente son análogas de los inhibidores de proteasas.

Se ha mencionado que las fosfolipasas y algunas proteínas básicas no enzimáticas serían capaces de alterar la conducción del impulso a través del nervio. Sin embargo, las evidencias no son probatorias.

Por el contrario, el aumento en frecuencia de los potenciales de acción del nervio frénico (como consecuencia del estímulo del centro respiratorio frente a la hipoxia resultante de la parálisis) y la contractilidad muscular conservada por estímulo directo, demuestran que el principal efecto ocurre a nivel presináptico.

SHOCK: El efecto más conspicuo producido por la inoculación de venenos ofídicos es el colapso. La abrupta hipotensión inicial se acompaña de un incremento en el volumen sistólico, atribuible a la reducción de la impedancia aórtica secundaria a la disminución de la resistencia periférica.

La frecuencia cardíaca y el electrocardiograma están esencialmente inalterados, si bien se produce un aumento de la circulación coronaria, al menos durante el período inicial de la hipotensión. Dosis repetidas de veneno producen una respuesta hipotensiva menor, lo que sugiere una especie de taquifilaxia. Existen varias explicaciones posibles para esta fase de hipotensión abrupta y reversible. (a) Se produce la liberación de histamina y serotonina, así como de prostaglandinas, de las que sería responsable la fosfolipasa A_2 . (b) En venenos de Crotalidos, un grupo de enzimas (TAME-esterasas) producen liberación de bradiquinina que es el agente hipotensor más poderoso conocido.

Además, los venenos de Bothrops contienen péptidos que ejercen dos efectos: bloquean la actividad de la enzima convertidora, que cataliza la transformación de angiotensina I en angiotensina II (de fuerte acción hipertensora) y bloquean las enzimas que degradan la bradiquinina. En consecuencia, la liberación de bradiquinina da lugar a una profunda caída en la resistencia periférica (vasodilatación) y marcada hipotensión.

De manera que la fase inicial de la hipotensión parece ser de origen autofarmacológico. Se ha propuesto un efecto neurotóxico selectivo sobre los centros vasomotores con veneno de Vipera palestinae; así como la acción directa de péptidos de los venenos de Crotalus viridis helleri y C. atrox sobre el músculo liso.

La evolución ulterior de la lesión cardiovascular es variable y depende del veneno. Con ciertos venenos de elápidos, se denomina "shock retardado" al que se observa luego de la inyección intravenosa de dosis altas de veneno. Este sería debido a la presencia de péptidos básicos no neurotóxicos, que pueden producir cardiotoxicidad en los mamíferos, con disminución del volumen sistólico, que origina un shock cardiogénico irreversible.

Además, se ha demostrado que algunas fosfolipasas A_2 de venenos de elápidos (p. ej. Naja melanoleuca) producen cardiotoxicidad.

Los venenos de algunos vipéridos (Bitis gabonica) producen una insuficiencia progresiva en la relajación de los ventrículos (el izquierdo más afectado que el derecho) con una fuerte reducción de la amplitud de contracción y acortamiento del potencial de acción.

En los venenos de crotalidos, en general, a la brusca hipotensión inicial puede seguir el shock irreversible casi sin solución de continuidad, debido a que la vasodilatación se acompaña de alteraciones en la permeabilidad vascular y hemorragias masivas, disminución del volumen circulante, característico del shock irreversible determinado por venenos de vipéridos y crotalidos.

HEMORRAGIAS: Las hemorragias profusas son características en el envenenamiento severo por Bothrops. La mayoría de los venenos ofídicos exhiben efectos procoagulantes y anticoagulantes.

Los venenos de las tres familias de serpientes terrestres exhiben efectos "procoagulantes", por distintos mecanismos:

a) acción trombínica, practicaamente restringida a los venenos de crotalidos y vipéridos, que da cuenta del potente efecto coagulante "in vitro" de la mayoría de estos venenos y es debida a hidrolasa de ésteres de arginina, no proteolíticas, denominadas genéricamente "enzimas similares a trombina" o "tromboserpentinas". Se han purificado las de los venenos de Agkistrodon rhodostoma (ARVIN o ANCROD), de Bothrops jararaca (Reptilase) y de Bitis gabonica (Gaboanase).

b) activación del factor X, típica de los venenos vipéridos, como el de Vipera russelli.

Este mecanismo se encontraría presente en los venenos de Crotalidae si bien enmascarado por el potente efecto trombínico.

c) acción protrombínica, presente en algunos vipéridos y elápidos.

Un mayor número de mecanismos pueden dar cuenta del efecto "anticoagulante in vitro":

a) actividad antitromboplástica, en venenos de elápidos y vipéridos.

b) inactivación del factor V en las tres familias terrestres de serpientes ponzoñosas.

c) fibrinogenolisis y fibrinolisis, características de venenos de crotálicos, relacionada con la actividad proteolítica de los mismos.

d) activación directa del plasminógeno en vipéridos y crotálicos.

Con la excepción de un pequeño grupo de elápidos, que presentan sólo propiedades coagulantes, el grupo mayor produce netos efectos anticoagulantes.

"In vivo" la administración de pequeñas cantidades de venenos coagulantes (p. ej. Bothrops) provoca inmediatamente un aumento transiente de la coagulabilidad (dosis mayores pueden producir coagulación intravascular) seguido de incoagulabilidad. La incoagulabilidad se debe al consumo de fibrinógeno debido a la acción de las enzimas similares a trombina.

El ataque de fibrinógeno resulta en la formación de microtrombos de una trombina anormal y rápidamente degradada por el sistema fibrinolítico endógeno, activado como consecuencia de la microcoagulación intravascular.

Si bien la síntesis de fibrinógeno no parece estar afectada, el fibrinógeno formado es continuamente consumido por las enzimas similares a la trombina. De allí la persistencia de la fibrinopenia, la inutilidad del tratamiento con fibrinógeno y el incremento dramático del fibrinógeno plasmático luego de la administración de suero antiofídico. Esto explica el porqué los venenos "coagulantes in vitro" (p. ej. Bothrops) producen incoagulabilidad de la sangre "in vivo".

ALTERACIONES DE LA PERMEABILIDAD VASCULAR: Al incremento de la permeabilidad vascular debido a agentes como histamina, serotonina, prostaglandinas y particularmente bradiquinina, liberados por efectos autofarmacológicos, debe agregarse la acción de las hemorraginas.

Algunas de ellas (p. ej. Bothrops) presentan actividad proteolítica, mientras que otras no poseen actividad enzimática (p. ej. HR2 de Trimeresurus flavoviridis).

Estas toxinas alteran las uniones intercelulares en el endotelio vascular y producen la extravasación de glóbulos rojos a través de la pared capilar que, morfológicamente, parece intacta.

Las hemorraginas producen extravasación de sangre y plasma en los tejidos y órganos. Junto con la incoagulabilidad de la sangre, son responsables de las hemorragias generalizadas y la hipovolemia del shock secundario irreversible que caracterizan el emponzoñamiento severo por venenos del género Bothrops. **NECROSIS:** El efecto necrótico característico de los venenos de Crotálicos es el menos estudiado, en buena parte debido a la carencia de sistemas modelo adecuados. Existen claros ejemplos de disociación entre las actividades hemorrágica, necrótica y la presencia de enzimas proteolíticas. Así, las mordeduras por cobras de Malaya (que poseen venenos no hemorrágicos y carentes de actividad proteolítica) provocan necrosis local que predomina sobre los efectos neurotóxicos.

Los venenos de Trimeresurus okinavensis, Bitis gabonica, B. arietans y B. nasicornis contienen actividad proteolítica y son fuertemente hemorrágicos pero no monecróticos. Se ha aislado del veneno de Crotalus viridis viridis un componente carente de actividad proteolítica o hemorrágica, que produce degeneración con vascularización de fibras musculares.

Puede concluirse que los venenos ofídicos pueden contener, además de hemorraginas, factores necrotizantes que no son necesariamente enzimas proteolíticas. La inyección de proteasas (p. ej. tripsina, en dosis unas 500 veces mayores que el factor mictóxico del veneno de C. viridis) produce necrosis del músculo, de modo que las enzimas proteolíticas podrían contribuir al menos en parte a la necrosis producida por el veneno.

HEMOLISIS: Si se mezclan "in vitro" glóbulos blancos lavados con venenos ofídicos, algunos producen hemólisis (hemolíticos directos, p. ej. los venenos de elápidos). Los otros pueden producir hemólisis solo en presencia de lipoproteínas. Estos últimos de denominan "hemolíticos indirectos".

La necesidad de adicionar lipoproteínas exógenas indica que la "hemólisis indirecta" es debida a los productos de hidrólisis por fosfolipasa A₂ (ácidos grasos y lisofosfátidos) y que estas enzimas son incapaces de hidrolisar los fosfolípidos de la membrana de eritrocitos enteros.

Se requiere una cierta concentración de lisofosfátidos para producir alteraciones en la membrana, tales que determinen la lisis de las células o bien de la accesibilidad de los fosfolípidos de la membrana a la fosfolipasa A₂. Por el contrario, la enzima es capaz de hidrolizar los fosfolípidos de "ghosts" de eritrocitos.

Los venenos "hemolíticos directos" presentan un péptido básico, no neurotóxico, identificable con la cardiotoxina, de acción lítica directa sobre glóbulos

rojos lavados. Sobre los eritrocitos lisados, la fosfolipasa A₂ producirá lisoderivados que resultan en la lisis de otros eritrocitos. La adición de cardiotoxina de veneno de cobra a venenos hemolíticos indirectos los transforman en hemolíticos directos.

Si bien la presencia de hemólisis en el emponzoñamiento por elápidos es común, no es constante y los componentes responsables de la muerte del animal no están relacionados con la hemólisis. Por otra parte, se observa frecuentemente hemólisis en el emponzoñamiento por Echis coloratus, que es hemolítico indirecto.

El mecanismo de hemólisis por los venenos hemolíticos indirectos sería el siguiente: a medida que se forman lisofosfátidos por la actividad de fosfolipasa A₂ sobre las lipoproteínas del plasma, estos productos se ligan a eritrocitos. La cantidad de lisofosfátido ligado a eritrocitos (2.6×10^{-14} mol) está por debajo de la requerida para producir hemólisis y esto se debe (a) a que la cantidad de fosfolípidos en plasma es limitada y (b) al efecto "protector" de las proteínas plasmáticas, ya que la albúmina es capaz de ligar lisofosfátidos.

Sin embargo, la cantidad de lisofosfátidos adsorbidos a la membrana del eritrocito es suficiente para producir cambios en la forma (esferocitosis), fragilidad osmótica discretamente aumentada y un gran incremento de la fragilidad mecánica.

La hemólisis se debería a la sensibilización de la membrana por los lisofosfátidos seguida por el atrapamiento de estas células en los microtrombos producidos por las enzimas procoagulantes.

Esto explica porqué algunos venenos hemolíticos "in vitro" pero sin actividad coagulante no producen hemólisis "in vivo" y, en cambio, pueden producir venenos con fuerte actividad procoagulante, a la cual podría contribuir la extravasación de los eritrocitos en los tejidos.

Dr. Juan Carlos Vidal
Conferencia dictada como parte del "Curso de Zoopatías Médicas" dictado en el Instituto Nacional de Microbiología "Dr. Carlos G. Malbran". 1985.

PARA LOS AUTORES

Informamos a los autores de notas, novedades zogeográficas, comentarios bibliográficos, etc., que los mismos deben ser remitidos a:

Lic. Néstor G. Basso
Instituto de Limnología
Casilla de correo 55
1923 Berisso, Argentina

O

Lic. Marta S. Fernández
Div. Paleont. Vert.
Museo de La Plata
Paseo del Bosque s/n
1900 La Plata, Argentina

Recordamos que para facilitar revisiones de los mismos, los autores deberán enviar original y dos copias mecanografiadas a doble espacio, colocando título en mayúsculas y nombre y apellido del autor a pie de página, (el apellido deberá ser escrito en letras mayúsculas), y a continuación el lugar de trabajo.

Los dibujos o gráficos deberán ser realizados con tinta negra sobre fondo blanco mate o papel vegetal, en una caja de 17 x 20 o en una columna de 8 cm. Solo se citará la bibliografía mencionada en el texto.

CONGRES DE LA SOCIÉTÉ HERPETOLOGIQUE DE FRANCE

III^{ème} SYMPOSIUM EUROPEEN SUR LES CHELONIENS

Marseille, 6 - 9 juillet 1988

Muséum d'Histoire Naturelle, Palais Longchamp

Il aura lieu au Muséum d'Histoire Naturelle, Palais Longchamp, Marseille les mercredi 6, jeudi 7 et vendredi 8 juillet 1988. La journée du 8 juillet 1988 sera consacrée à la visite de la Station d'Observation et de Protection des Tortues des Maures (SOPTOM) à Gonfaron, Var.

Les communications feront l'objet d'articles ou de notes publiés dans Mésogée 1988.

Pour tous renseignements :

III^{ème} Symposium Européen sur les Chéloniens
à l'attention de Madame Duron ou Monsieur Delcourt
Muséum d'Histoire Naturelle
Palais Longchamp
13004 - Marseille (France)
tél. : 91.62.30.78