

TOXINOLOGIA DEL VENENO DE LAS SERPIENTES

Alejandro Alagón Cano. Departamento de Reconocimiento Molecular y Bioestructura, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México. Apartado Postal 510-3, Cuernavaca 62271, Morelos, México.

RESUMEN

Los componentes más abundantes de los venenos de las serpientes son de naturaleza peptídica. Algunos ejercen su actividad de manera catalítica, en tanto que otros interaccionan con moléculas blanco a las que inhiben en algunos casos o activan en otros. Un efecto dado puede ser producido por un conjunto de moléculas que actúan en niveles distintos. Este artículo analiza la actividad, a nivel molecular, de algunos de los componentes de los venenos y la asocia con el mecanismo fisiopatológico de los principales efectos observados en las víctimas -dolor, edema, hipotensión, alteraciones de la coagulación, necrosis-. Da énfasis a los venenos de los géneros *Bothrops*, *Crotalus* y *Agkistrodon*, ya que en México son los que ocasionan el mayor número de accidentes.

PALABRAS CLAVE: Venenos de serpientes, fisiopatología, mecanismos moleculares.

ABSTRACT

The major components of snake venoms are of peptidic nature. Some of them act catalytically, while others are inhibitors or activators of their target molecules. A given effect can be produced by a group of molecules acting at different levels. This paper analyzes the activity, at a molecular level, of the main venom components and correlates it with the physiopathological mechanisms of the main effects upon the victims -pain, edema, hypotension, coagulation disturbances, necrosis-. Emphasis is given to venoms belonging to the genera *Bothrops*, *Crotalus* and *Agkistrodon*, since they cause most of the snakebites in Mexico.

KEY WORDS: Snake venoms, physiopathology, molecular mechanisms.

CLASIFICACION DE LAS SERPIENTES

México es el país con mayor variedad de serpientes. Se han descrito alrededor de 700 especies y subespecies que comprenden tanto a las venenosas como a las que

no lo son; aproximadamente la séptima parte son venenosas. Las peligrosas para el hombre pertenecen a las subfamilias Elapinae (coralillos del género *Micrurus*) e Hydrophini (serpiente marina del género *Pelamis*) de la familia Elapidae, y la subfamilia Crotalinae de la familia Viperidae. Los tres géneros de mayor importancia médica en nuestro país están clasificados dentro de la subfamilia Crotalinae: *Bothrops* (nauyacas o cuatro narices), *Crotalus* (víboras de cascabel) y *Agkistrodon* (zolcuates o cantiles).

CARACTERISTICAS GENERALES DE LOS VENENOS

Los venenos de las serpientes son mezclas altamente heterogéneas de compuestos biológica y farmacológicamente especializados; sirven a las serpientes para cazar sus presas, para ayudar en su digestión y para defenderlas de posibles depredadores. No hay que olvidar que los venenos son secretados por las glándulas venenosas y que éstas son glándulas salivales.

La cantidad de veneno que producen las víboras varía, desde unos cuantos miligramos (coralillos) hasta casi un cuarto de gramo (cascabeles grandes y nauyacas). La cantidad de veneno varía también de acuerdo a la robustez (no sólo la longitud) y estado nutricional del ejemplar. En términos generales, los Elápidos producen menos veneno que los Crotálidos, si bien la potencia del veneno de los primeros es mayor que la de los segundos.

Como se desprende de la Tabla I, los venenos de los Elápidos actúan principalmente sobre células excitables. El efecto tóxico más importante de estos venenos es impedir la transmisión del impulso nervioso en las sinapsis colinérgicas; un mismo veneno puede contener toxinas (tipo β) que interfieren con la liberación del neurotransmisor, toxinas (tipo α) que son antagonistas del receptor postsináptico para acetilcolina así como acetilcolinesterasa, que hidrolisa al neurotransmisor. Ocasionan, por tanto, parálisis

muscular, que lleva a una insuficiencia respiratoria y que puede llegar a la asfixia, si el diafragma está fuertemente afectado. En cambio, los venenos de los Crotalinos producen principalmente destrucción de tejidos (necrosis), notoriamente de músculo estriado; además, otros efectos importantes son edema en el área de la mordedura y diátesis hemorrágicas locales y/o a distancia. Estas patologías son ocasionadas por proteínas con actividad enzimática o que interactúan con moléculas blanco a las que inhiben en algunos casos o activan en otros. Un efecto dado puede ser producido por un conjunto de moléculas que actúan a distintos niveles. Hay que destacar que los venenos de varias especies de *Crotalus* poseen también componentes neurotóxicos que juegan un papel muy relevante en la fisiopatología del envenenamiento correspondiente.

En la Tabla I se encuentran también enlistadas las enzimas principales que forman parte de los venenos de serpientes (1); varias de ellas son analizadas más adelan-

TABLA I

CARACTERISTICAS GENERALES DE LOS VENENOS DE SERPIENTES	
ELAPIDOS:	
+ Mayormente	cardio y neurotóxicos
+ Proteínas pequeñas:	40 a 75%
+ Enzimas principales:	
- Fosfolipasas	A2 y B
- Hialuronidasa	
- Acetilcolinesterasa	
VIPERINOS Y CROTALINOS:	
+ Mayormente	necróticos, miotóxicos, edematizantes y hemolíticos
+ Proteínas grandes:	40 a 90%
+ Algunas especies,	también neurotóxicas
+ Enzimas principales:	
- Fosfolipasas	A2
- Hialuronidasa	
- Endopeptidasas	específicas (trombina, fibrinogenasa, metaloproteinasas de tejido conectivo, calicreína)

te. Las hialuronidasas son las enzimas más ubicuas en todos los venenos, como los de los alacranes, abejas, avispa, arañas, saurios, etc. Son escasamente tóxicas, si acaso, pero juegan un papel muy relevante al ayudar en la diseminación de los componentes de los venenos. Todas ellas degradan hialuronidato y, algunas también, condroitín sulfato; ambos, forman parte de la sustancia basal del tejido conectivo en forma de proteoglicanos (cemento intercelular) (2).

FAMILIA DE LAS FOSFOLIPASAS A2

Las fosfolipasas A2 de venenos de serpientes constituyen una familia de proteínas estructuralmente relacionadas. Muchos miembros de la familia se han especializado a tal grado que su efecto es selectivo e independiente de su actividad enzimática, sobre tejidos diferenciados por medio de receptores particulares. Las fosfolipasas A2 catalizan la hidrólisis del éster de la posición 2 de los 3-*sn*-fosfoglicéridos (Fig 1) y participan en varios de los efectos de los venenos, como: citotoxicidad en general, hemólisis, mionecrosis, neurotoxicidad y anticoagulación (3).

La actividad fosfolipásica A2 causa citotoxicidad y hemólisis por medio de un mecanismo indirecto, por la

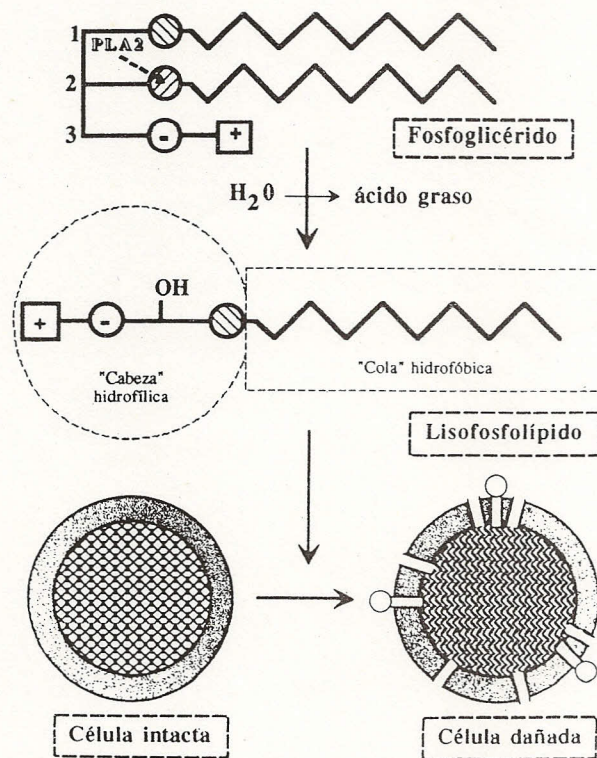


Figura 1. Producción de lisofosfolípidos por fosfolipasas A2 y su acción desestabilizante sobre membranas celulares.

producción de lisofosfolípidos a partir de fosfolípidos (Fig 1). Por ello, a las fosfolipasas A2 se les llama también "factores líticos indirectos". Los lisofosfolípidos tienen propiedades anfipáticas, ya que tienen una "cabeza" polar altamente hidrofílica y una "cola" hidrocarbonada hidrofóbica, lo que les confiere actividad detergente. En otras palabras, los lisofosfolípidos dañan células al romper la continuidad de la bicapa lipídica de sus membranas. Los eritrocitos, que no forman parte de un tejido sólido y que no tienen recambio membranal, son particularmente sensibles a esta acción; si bien todas las células resienten la presencia de lisofosfolípidos (4). Hay que hacer notar que la alteración de las membranas celulares, expone más substrato a la acción de las fosfolipasas A2. Muchos venenos contienen péptidos anfipáticos que actúan sinérgicamente con este tipo de enzimas.

Algunas fosfolipasas A2 son miotoxinas potentes, ya que alteran la fisiología y estructura de las fibras musculares estriadas y llegan incluso a causar su destrucción. Ahora bien, la actividad miotóxica es independiente de la actividad enzimática, la que inclusive es inexistente en las miotoxinas monoméricas que se han descrito en los venenos de *Bothrops* y *Vipera*. A nivel de secuencia de aminoácidos, se puede ver que estas miotoxinas son fosfolipasas A2 con el sitio activo mutado (el aspartato de la posición 49 ha sido substituido por una lisina). El sitio miotóxico se localiza en otra región de la molécula (5). En varias especies del género *Crotalus* se han encontrado miotoxinas formadas por dos subunidades diferentes: la A es ácida y aunque tiene estructura de fosfolipasa A2, carece de dicha actividad; la B es básica, tiene actividad de fosfolipasa A2 y, al igual que las monoméricas, tiene un sitio miotóxico que mapea en otro lugar. El ejemplo típico de este tipo de moléculas es la Crotoxina de *C durissus terrificus*, si bien tanto *C scutulatus scutulatus* y *C viridis concolor* tienen proteínas homólogas. Las crotoxinas son, además, potentes neurotoxinas presinápticas que inhiben la liberación de neurotransmisores (6).

MIOTOXINAS TIPO CROTAMINA

Son proteínas básicas de bajo peso molecular, constituidas por 42 a 45 residuos de aminoácidos. No pertenecen a la familia de las fosfolipasas A2. Producen necrosis local del músculo esquelético. A nivel molecular actúan por medio de la activación de canales de sodio del sarcolema e inhiben la ATPasa de retículo sarcoplásmico, lo que induce una profunda despolarización y alteracio-

nes en la osmolaridad de las fibras musculares; este último efecto se manifiesta por vacuolización inicial de los miocitos con evolución a su lisis total (7).

EFFECTOS DE LOS VENENOS SOBRE LA COAGULACION SANGUINEA

Los venenos tienen factores tanto coagulantes como anticoagulantes. Las acciones son complejas y ocurren en múltiples niveles; algunos de los efectos de los Crotalinos se muestran en la figura 2. Como puede observarse, sus efectos se dan más bien en las últimas etapas de la cascada de la coagulación. Hay que recordar que en el sistema de coagulación sanguínea hay precursores inactivos (zimógenos) que son activados proteolíticamente y dan lugar a proteinasas activas que a su vez activan al siguiente precursor de la cascada.

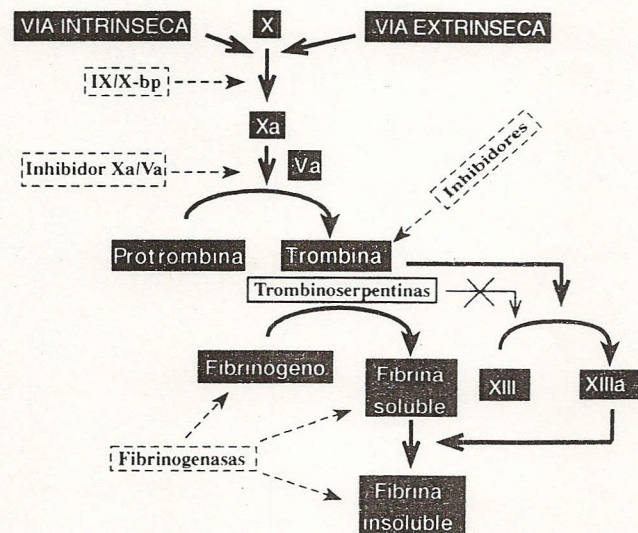


Figura 2. Niveles de acción de algunos componentes de venenos de serpientes en la cascada de la coagulación sanguínea. La vía normal de la coagulación está representada por las flechas gruesas y sus componentes aparecen con letras invertidas. Los factores de venenos con actividad anticoagulante están enmarcados con cuadros discontinuos, en tanto que el procoagulante en cuadro continuo.

Los efectos anticoagulantes se deben a la acción de: a) inhibidores de la activación del factor X, de la activación de la protrombina y de la trombina misma, b) fibrinogénasas (fibrinasas) con actividad degradativa tanto de fibrinógeno como de fibrina, y c) aunque parezca contradictorio, a la actividad de las trombinoserpentinas. Estas últimas generan una fibrina anómala; los coágulos así formados son inestables, tanto porque las trombinoserpentinas no activan al factor XIII, como porque la fibrina producida

es estructuralmente distinta a la producida por la trombina (Fig 2). La remoción de los coágulos inestables por los mecanismos fibrinolíticos usuales y por las fibrinogenasas de los venenos da como resultado que el fibrinógeno circulante disminuya (coagulopatía por consumo), estado que se manifiesta por hemorragias locales y, en ocasiones, en otros órganos (8 y 9).

La actividad coagulante es más evidente poco tiempo después del envenenamiento y se debe principalmente a la acción de proteasas trómbicas (trombinoserpentinias). En ocasiones más bien raras, cuando el veneno es inyectado directamente en un vaso sanguíneo de calibre grande, puede ocurrir algo parecido, por la acción de las trombinoserpentinias, a un síndrome de coagulación intravascular diseminada (CID). Sin embargo, dado que la generación de trombina permanece intacta no se le considera un verdadero CID.

CALICREINAS

Las calicreínas son proteinasas específicas que liberan péptidos farmacológicamente activos (quininas) a partir de proteínas plasmáticas llamadas quinínógenos (Fig 3). Las quininas aumentan la permeabilidad capilar, por lo que forman parte del mecanismo de la génesis del edema en las mordeduras de serpientes (10). También pueden estimular receptores algógenos (dolor) e inducen relajación del músculo liso de los vasos sanguíneos (vasodilatación), lo que lleva a una caída en la presión sanguínea (11). Algunos venenos (por ejemplo del género *Bothrops*) contienen, además, péptidos que inhiben a las quininasas (las enzimas de la víctima que degradan quininas), con lo que se potencian dichos efectos.

DAÑO CAPILAR Y NECROSIS TISULAR LOCALIZADA

Uno de los efectos más importantes de los venenos de Crotalinos es la necrosis tisular en el sitio de la mordedura y su entorno. Como es de suponerse, este efecto es producido de manera conjunta por varios de los componentes de los venenos (Fig 4), algunos de los cuales ya han sido mencionados: las hialuronidasas digieren varios de los componentes del cemento intercelular; los lisofosfolípidos, producidos por la actividad de fosfolipasas A2, perturban las membranas celulares de toda clase de células, incluso las endoteliales; las quininas, producto de las calicreínas, favorecen la extravasación de fluidos serosos (edema), lo que aumenta la presión hidrostática extravascular y disminuye la efica-

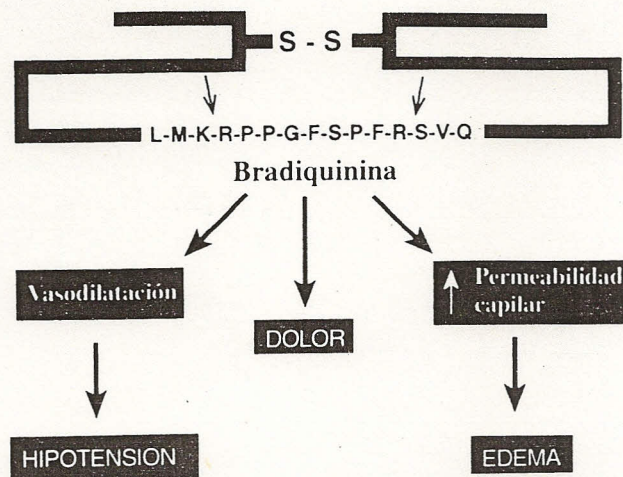


Figura 3. Liberación de bradiquinina por calicreínas. Las flechas sobre la secuencia de aminoácidos indican los sitios de corte. Se indican, también, las principales actividades farmacológicas de las quininas.

cia de la irrigación sanguínea de la zona afectada. Así mismo, los venenos son ricos en metaloproteinasas que degradan tejido conectivo y que son particularmente eficientes cuando actúan sobre membranas basales, tanto subcutáneas como capilares (12). Este último efecto ha hecho que se les conozca como hemorraginas, si bien muchas veces a las fibrin(ogen)asas se les da el

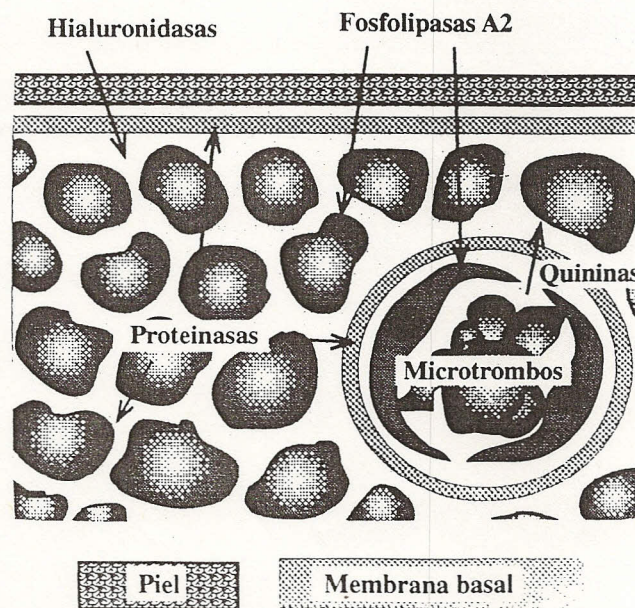


Figura 4. Factores de los venenos de serpientes que participan en la producción de lesión tisular, daño capilar y edema.

mismo calificativo. Se ha descrito, recientemente, otro mecanismo de daño capilar: los venenos de *Viperinos* y *Crotalinos* producen apoptosis (muerte celular programada) (13) específicamente de células endoteliales; este efecto requiere de varias horas para manifestarse. Por otro lado, la disminución en el aporte de oxígeno y nutrientes, por la presencia de microtrombos inducidos por la hemólisis intravascular, así como las trombinoserpentinas y otros agentes procoagulantes, seguramente juega un papel relevante en la patogénesis de la necrosis localizada.

NEFROTOXICIDAD

Los riñones están frecuentemente dañados en el envenenamiento por mordedura de serpientes; sin embargo, los reportes sobre la descripción de las lesiones histológicas que ocurren son escasos. La necrosis tubular aguda es el hallazgo más frecuente, si bien también hay reportes de necrosis cortical difusa y glomerulonefritis. La primera y la última son procesos reversibles, en tanto que la necrosis cortical difusa no lo es.

La fisiopatología de la lesión renal, es otro ejemplo de la concurrencia de múltiples mecanismos desencadenados por la gran variedad de componentes bioquímicos que forman parte de los venenos de las serpientes (Fig 5). Los mecanismos fundamentales son el daño isquémico y el directo (14 y 15). La disminución del flujo sanguíneo a través de los riñones es consecuencia de la hipotensión arterial e hipovolemia producidas por varios factores: la vasodilatación por calicreínas, el edema por factores inflamatorios endógenos y quininas liberadas por calicreínas, las hemorragias consecuencia del consumo de factores de coagulación y las alteraciones hemodinámicas por el daño cardíaco producido por las neurocardiotoxinas presentes en los venenos de algunas especies de *Crotalus*. La nefrotoxicidad directa sucede durante el paso y la eliminación de los componentes de los venenos por los riñones. También se forman cilindros proteináceos de hemoglobina y mioglobina, dentro de los túbulos contorneados distales y colectores, a consecuencia de la hemólisis y la destrucción de músculo estriado, respectivamente. Otro factor que puede ocasionar daño glomerular es el depósito de complejos inmunes formados por anticuerpos (del paciente) antiinmunoglobulinas de caballo y los anticuerpos (de caballo) utilizados para neutralizar los efectos de los venenos. Hay que destacar que este mecanismo de daño renal, cuando se presenta, ocurre después de dos semanas de administrada la

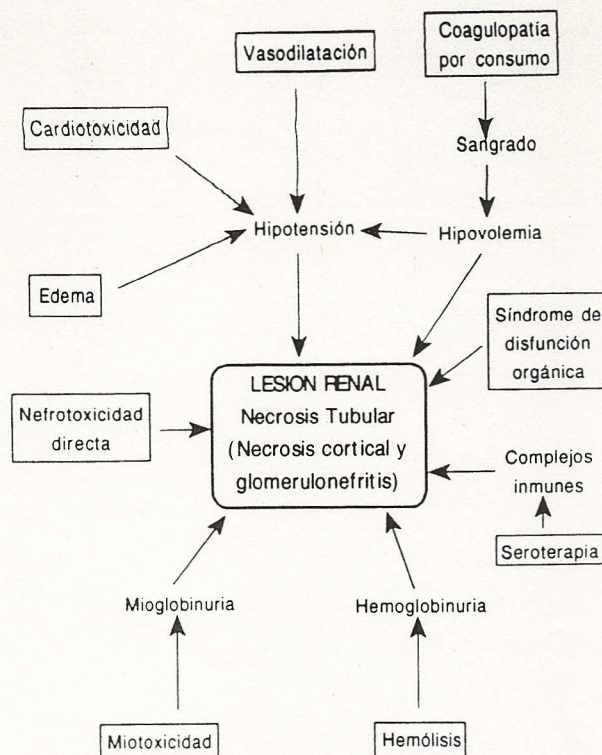


Figura 5. Mecanismos fisiopatológicos de daño renal ocasionado por veneno de serpientes.

seroterapia; afortunadamente es un hallazgo más bien raro dado que los anticuerpos de caballo son en realidad fragmentos Fab (por digestión con pepsina) y están altamente purificados.

COMENTARIO FINAL

Los venenos de serpientes han sido y son objeto de intensa investigación ya que, aparte de su importancia médica, son fuente de una gran variedad de compuestos con actividades moleculares exquisitas. Muchos de los compuestos son herramientas altamente selectivas que sirven para el estudio de múltiples procesos y mecanismos biológicos. Los venenos de serpientes sirvieron para encontrar al sistema calicreína/cinina, para purificar al receptor de acetilcolina, para disecar varios pasos de la vía hemostática y del sistema del complemento, y para conocer detalles estructurales de las membranas celulares. En la investigación contemporánea se emplean moléculas aisladas de venenos, por ejemplo, para elucidar la función y estructura de los canales iónicos membranales, para definir el mecanismo de acción de un tipo de metaloproteinasas y para profundizar en los mecanismos moleculares apoptóticos. Sin duda alguna, los venenos de las serpientes aún nos deparan muchas sorpresas.

REFERENCIAS

1. Iwanaga S y Suzuki T (1979) Enzymes in Snake Venoms. En Snake Venoms, Editor: Lee C-Y. Springer-Verlag, Berlín, pp 61-158.
2. Cevallos M A, Navarro-Duque C, Varela-Juliá M y Alagón A C (1992) Molecular mass determination and assay of venom hyaluronidases by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *Toxicon* 30:925-930.
3. Manjunatha R y Evans H J (1989) A model to explain the pharmacological effects of snake venom phospholipase A2. *Toxicon* 27:613-635.
4. Sosa B P, Alagón A C, Possani L D y Juliá J Z (1979) Comparison of phospholipase activity with direct and indirect lytic effects on animal venoms upon red blood cells. *Comp Biochem Physiol* 64B:231-234.
5. Lomonte B, Moreno E, Tarkowski A, Hanson L A y Maccarana M (1994) Neutralizing interactions between heparins and miotoxin II, a lysine 49 phospholipase A2 from *Bothrops asper* venom. Identification of a heparin-binding and cytolytic toxin region by the use of synthetic peptides and molecular modeling. *J Biol Chem* 269:29867-29873.
6. Macatenhas Y P, Stouten P F, Beltran J R, Laure C J y Vriend G (1992) Structure-function relationship for the highly toxin crotoxin from *Crotalus durissus terrificus*. *Eur Biophys J* 21:199-205.
7. Samejima Y, Aoki Y y Mebs D (1991) Amino acid sequence of a myotoxin from venom of the Eastern Diamondback rattlesnake (*Crotalus adamanteus*). *Toxicon* 29:461-468.
8. Kornalik F (1991) The influence of snake venom proteins on blood coagulation. En Snake Toxins, Editor: Harvey A L. Pergamon Press, Inc. New York, pp 323-383.
9. Rosing J y Tans G (1992) Structural and functional properties of snake venom prothrombin activators. *Toxicon* 30:1515-1527.
10. Shimokawa K y Takahashi H (1993) Some properties of a capillary permeability-increasing enzyme-2 from the venom of *Agkistrodon caliginosus* (Kankoku-Mamushi). *Toxicon* 31: 1221-1227.
11. Alagón A C, Possani L D, Smart J y Schleuning W-D (1986) Helodermatine, a kallikrein-like, hypotensive enzyme from the venom of *Heloderma horridum horridum* (Mexican beaded lizard). *J Exp Med* 164:1835-1845.
12. Lomonte B, Gutiérrez J M, Borkow G, Ovadia M, Tarkowski A y Hanson L A (1994) Activity of hemorrhagic metalloproteinase BaH-1 and myotoxin II from *Bothrops asper* snake venom on capillary endothelial cells in vitro. *Toxicon* 32:505-510.
13. Araki S, Ishida T, Yamamoto T, Kaji K y Hayashi H (1993) Induction of apoptosis by hemorrhagic snake venom in vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 190:148-153.
14. Burdmann E A, Woronik V, Prado E B, Abdulkader R C, Saldanha L B, Barreto O C y Marcondes M (1993) Snakebite-induced acute renal failure: an experimental model. *Am J Trop Med Hyg* 48:82-88.
15. Sitprija V y Boonpucknavig V (1979) En Snake Venoms, Editor: Lee C-Y. Springer-Verlag, Berlín, pp 997-1018.