

COMUNICACIONES

Actividad hemolítica de venenos de serpientes de los géneros
Bothrops, *Lachesis*, *Crotalus* y *Micrurus*.
(Serpentes: Viperidae y Elapidae)

Elba Martínez Cadillo¹, César Bonilla Ferreyra¹ y Alfonso Zavaleta^{1,2*}

¹ Laboratorio Afiliado, Centro de Investigación en Salud "Hugo Lumbreras Cruz", Instituto Nacional de Salud.

² Laboratorio de Farmacología, Departamento Académico de Ciencias Fisiológicas, Facultad de Ciencias y Filosofía, Universidad Peruana Cayetano Heredia, A.P. 5045, Lima 100, Perú.

(Rec 24-IX-1990. Acep. 18-IV-1991)

Abstract: Hemolytic activity of eight Peruvian snake venoms from the families Viperidae and Elapidae (*Bothrops atrox*, *B. pictus*, *B. hyporrhorus*, *B. bilineatus*, *B. neuwedii*, *Lachesis m. muta*, *Crotalus d. terrificus*, *Micrurus tschudi*), and three Brazilian viperids (*B. jararacussu*, *B. alternatus* and *C. d. collilineatus*) is described. None of the venoms caused direct lysis on washed human erythrocytes. However, all of them caused indirect hemolysis provided that the incubation medium contains an exogenous source of lecithin. Venom of *Micrurus tschudi* was the most hemolytic (HD50 2.8 ug/ml) while that of *B. bilineatus* was the least (HD50 681.3 ug/ml). Only six of eleven venoms showed parallel curves of hemolytic activity, and the HD50 varied from 198 to 681 ug/ml and the following decreasing order of hemolytic activity was obtained: *L. muta*, *C. d. terrificus*, *C. d. collilineatus*, *B. hyporrhorus*, *B. bilineatus*, *B. alternatus*.

Key words: Venom, snake, Viperidae, Elapidae, hemolysis.

Desde comienzos de siglo, el efecto hemolítico de los venenos de serpiente atrajo el interés de numerosos investigadores, quienes observaron que ciertas especies del género *Naja* (familia Elapidae), producían la lisis de los glóbulos rojos humanos y de varios animales, lo que no ocurría frecuentemente con los venenos de especies de otras familias (Condrea 1979). Actualmente se aceptan dos mecanismos de producción de hemólisis inducida por veneno de serpientes: hemólisis directa, mediada por la acción de un componente proteico del veneno, el factor lítico directo (FLD); y hemólisis indirecta, donde es necesaria la acción de la fosfolipasa A2 del veneno sobre un sustrato exógeno, la lecitina. La enzima fosfolipasa A2 convierte a la lecitina en lisolecitina, un agente tensioactivo conocido, el que es a su vez el responsable de la hemólisis. La resultante final de

ambos mecanismos, es la desorganización de la membrana del glóbulo rojo que provoca la liberación de la hemoglobina al medio extracelular. En el envenenamiento producido por algunas especies de serpientes elápidas, la acción sinérgica del FLD y la fosfolipasa A2 traerían como resultado la producción de una hemólisis intensa con amplia repercusión en el envenenamiento (Condrea 1979). Los informes sobre la actividad hemolítica de venenos peruanos son escasos, y se han circunscrito a las especies *B. atrox* y *Lachesis muta*, en las que se ha informado sobre la presencia de actividad hemolítica directa (Cruz & Yarlequé 1984) y *B. barnetti* en la que se informó ausencia de actividad hemolítica directa, y presencia de actividad hemolítica indirecta (Martínez, Bonilla & Zavaleta 1989).

En este trabajo se evalúa la presencia de actividad hemolítica directa e indirecta (fosfolipásica) en los venenos de 11 especies de serpientes venenosas sudamericanas, ocho de ellas dis-

* Dirección para correspondencia.

tribuidas en Perú, y tres en Brasil, y se compara su potencia hemolítica indirecta.

Para el estudio empleamos veneno cristalizado de serpientes adultas peruanas: *Bothrops atrox*, *B. pictus*, *B. hyoprurus*, *B. bilineatus*, *B. neuwedii*, *Crotalus d. terrificus*, *Lachesis m. muta* y *Micrurus tschudi* así como de las especies brasileñas: *Crotalus d. collilineatus*, *B. alternatus* y *B. jararacussu*. El contenido proteico de los venenos se estimó según el método de Lowry (Stauffer 1975), empleando una curva de calibración con albúmina sérica bovina (Sigma Chemical Co, E.U.A.). Para la obtención de los eritrocitos, se recogió sangre humana en tubos con citrato de sodio al 3.8%, en proporción de 1:9 (v/v) y se centrifugó por 20 minutos a 750 xg. A continuación se separó el paquete celular, el cual fue lavado tres veces con NaCl 0.95% a pH 7.3 y una cuarta vez con tampón glicina-NaCl (glicina 0.1 M en cloruro de sodio al 0.6%) a pH 5.8. La suspensión de eritrocitos se ajustó finalmente al 10% (v/v) en tampón glicina-NaCl, y fue preparada cada día. Para la determinación de la hemólisis se cuantificó la hemoglobina liberada según el método de la cianometahemoglobina (ICSH 1978). La hemólisis fue expresada como porcentaje con respecto a la lectura de un tubo con hemólisis total y un blanco carente de hemólisis (Martínez, Bonilla & Zavaleta 1989). Para el cálculo de la potencia hemolítica del veneno se determinó la Dosis Hemolítica Media (DH50), la cual se define como la concentración de veneno en ug/ml, que es capaz de lisis el 50% de los glóbulos rojos en las condiciones experimentales utilizadas. La DH50 se calculó según el método de Probits (Finney 1971), empleando como parámetros el logaritmo de la dosis y el porcentaje de hemólisis. La existencia de paralelismo entre las curvas de dosis y respuesta hemolítica indirecta fue determinada según el método de líneas paralelas. En aquellos casos en que se comprobó la existencia de paralelismo entre las curvas de dosis respuesta, se calculó la potencia relativa (Finney 1971), utilizando el veneno de *L. m. muta* y su curva de dosis-respuesta hemolítica teórica como patrón en la estimación de la potencia relativa.

La actividad hemolítica directa se evaluó por triplicado, mezclando 0.2 ml de suspensión de glóbulos rojos, 0.2 ml de solución de veneno (ámbito: 100 a 600 ug/ml), y 1.6 ml de tampón glicina-NaCl a pH 5.8. La mezcla se incubó a

37°C durante 5 horas y luego se centrifugó a 750 xg durante 10 minutos estimándose la hemólisis. El blanco carente de hemólisis contenía 0.2 ml de NaCl 0.85% en lugar del veneno. La actividad hemolítica indirecta se evaluó por triplicado mediante el método de Grassmann y Hannig modificado (Da Silva & Bier 1981). La mezcla de reacción contenía: 0.5 ml de una emulsión de yema de huevo al 6.4% en Tris-HCl 50 mM a pH 7.5 y 0.5 ml de solución de veneno de concentraciones crecientes (ámbito: 10 a 1400 ug/ml para venenos de vipéridos y 1 a 100 ug/ml para venenos de elápidos). El blanco contenía 0.5 ml de NaCl 0.85% en lugar de veneno. La mezcla de reacción se preincubó a 37°C por 10 minutos, luego se transfirió 0.2 ml del preincubado del veneno ó blanco, a tubos que contenían 0.2 ml de una suspensión de eritrocitos lavados al 10% y 1.6 ml de NaCl 0.85%, y se continuó la incubación de la mezcla resultante a 37°C por 1 hora. Finalmente la mezcla fue centrifugada a 750 xg durante 10 minutos y la hemólisis se cuantificó en el sobrenadante.

El contenido proteico y la actividad hemolítica indirecta de los venenos estudiados se muestran en el Cuadro 1. Para los venenos de las serpientes peruanas el contenido proteico fluctuó entre 60 y 96 % ; y para las serpientes brasileñas entre 87 y 90 %.

Los venenos de las once especies estudiadas carecen de actividad hemolítica directa en las condiciones experimentales utilizadas, sin embargo todos hemolisaron indirectamente los hematíes humanos en el ámbito de concentración estudiado y para un tiempo de hidrólisis de 10 minutos. El veneno de *Micrurus tschudi* resultó el más hemolítico (HD50 de 2.8 ug/ml) y el veneno de *B. bilineatus* presentó la menor actividad (HD50 de 681 ug/ml) (Cuadro 1; Fig. 1).

Encontramos paralelismo entre la curva de dosis respuesta del veneno de *L. m. muta* y las curvas de otros 5 de 11 venenos estudiados: *C. d. terrificus*, *C. d. collilineatus*, *B. hyoprurus*, *B. bilineatus* y *B. alternatus*, correspondiendo sus potencias relativas a: 0.7, 0.6, 0.6, 0.2 y 0.2 respectivamente (Fig. 1a).

La ausencia de actividad hemolítica directa en los venenos de estas especies, aún a concentraciones elevadas (hasta 600 ug/ml), hace posible descartar la existencia del factor lítico directo en sus venenos. Este resultado concuerda con los obtenidos previamente por Gómez-

CUADRO 1

Contenido proteico y actividad hemolítica indirecta del veneno de serpientes peruanas y brasileñas de los géneros *Bothrops*, *Lachesis*, *Crotalus* y *Micrurus*

Serpientes	% Proteína	Actividad Hemolítica	
		DH50+ (ug/ml)	ámbito* (ug/ml)
<i>Serpientes peruanas</i>			
Elapidae			
<i>Micrurus tschudi</i>	95.7 ± 0.6**	2.8	2.3 - 3.4
Viperidae			
<i>Bothrops pictus</i>	94.8 ± 0.2	56.9	52.3 - 61.8
<i>Bothrops hyoprurus</i>	86.9 ± 0.3	297.6	263.4 - 336.2
<i>Bothrops bilineatus</i>	81.8 ± 0.7	681.3	580.4 - 799.8
<i>Crotalus d. terrificus</i>	81.6 ± 0.3	276.4	245.8 - 332.2
<i>Bothrops neuwedii</i>	77.7 ± 0.3	269.3	243.0 - 298.4
<i>Bothrops atrox</i>	73.6 ± 1.1	153.6	139.2 - 169.5
<i>Lachesis m. muta</i>	60.4 ± 1.3	198.7	173.2 - 227.9
<i>Serpientes brasileñas</i>			
Viperidae			
<i>Crotalus d. collilineatus</i>	89.7 ± 0.4	287.9	248.2 - 333.9
<i>Bothrops alternatus</i>	88.4 ± 0.6	670.6	560.7 - 801.9
<i>Bothrops jararacussu</i>	87.8 ± 0.6	61.9	51.1 - 76.7

+ DH50 obtenida según el método de Probits.

* Límites fiduciales de la DH50 al 95% de confianza (mínimo - máximo).

** Determinadas según el método de Lowry *et al.* 1951. Los valores representan el promedio ± DS de 3 determinaciones.

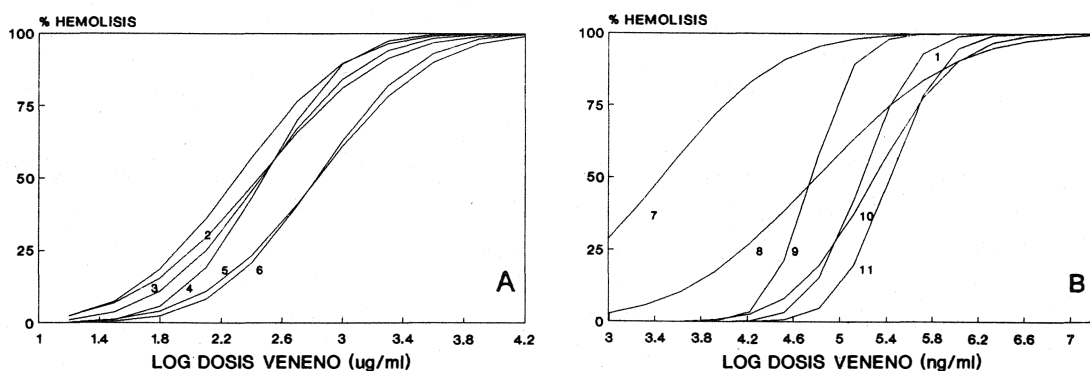


Fig. 1. Curvas sigmoideas de hemólisis indirecta (actividad fosfolipásica) de venenos de serpientes viperidas y elápidas peruanas y brasileñas calculadas a partir de las líneas de regresión Log dosis-probit: Presencia (A) y ausencia (B) de paralelismo con respecto al veneno de *L. m. muta*. Venenos: (1) *L. m. muta*, (2) *C. d. terrificus*, (3) *C. d. collilineatus*, (4) *B. hyoprurus*, (5) *B. bilineatus*, (6) *B. alternatus*, (7) *M. tschudii*; (8) *B. jararacussu*; (9) *B. pictus*; (10) *B. atrox*; (11) *B. neuwedii*.

Leiva (1976), para los géneros *Bothrops*, *Crotalus*, *Lachesis*, *Agkistrodon* y *Vipera*, de la familia Viperidae, así como de los elápidos *Bungarus multicinctus* y *Micrurus nigrocinctus*, todos los cuales carecen de actividad hemolítica directa. Nuestros resultados demuestran que los venenos de *Lachesis m. muta* y *Bothrops atrox* carecen de actividad hemolítica directa, a diferencia de lo informado por Cruz & Yarlequé en 1984. La presencia de actividad hemolítica indirecta (fosfolipásica), en los venenos de las once especies estudiadas concuerda con los resultados obtenidos por Gómez-Leiva para otros venenos de serpientes sudamericanas de los géneros *Bothrops*, *Crotalus* y *Micrurus* (Gómez-Leiva 1976), y confirman la amplia distribución de la enzima fosfolipasa A2 en los venenos de viperidos y elápidos sudamericanos.

AGRADECIMIENTOS

A Martha Córdova, María Salas y León Villegas por la colaboración brindada y a Omar Pesantes, por la donación de los venenos brasileños. Esta investigación fue financiada parcialmente por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONCYTEC) del Perú, y se realizó bajo convenio entre el Instituto Nacional de Salud del Perú y la Universidad Peruana Cayetano Heredia. A. Zavaleta es beneficiario del Programa de Apoyo al Investigador que patrocina el CONCYTEC del Perú.

REFERENCIAS

- Condrea, E. 1979. Hemolytic effects of snake venoms, p. 448-479 In C. Y. Lee (ed.). Snake venoms. Handbook of Experimental Pharmacology, 49. Springer-Verlag, Berlín.
- Cruz, L. & A. Yarlequé. 1984. Hemólisis de eritrocitos humanos por acción del veneno de *Lachesis muta* y *Bothrops atrox*. Bol. Soc. Química Perú 50 :41-48.
- Da Silva, M. H. & O. G. Bier. 1981. Titration of antiserum to South American rattlesnake (*Crotalus d. terrificus*) venom by measuring inhibition of phospholipase A2 activity. Toxicon 20: 563-569.
- Finney, D.J. 1971. Probit analysis. 3a Ed. Cambridge University Press, Londres, 333p.
- Gómez-Leiva, M. A. 1976. A comparative study of a hemolysis by Viperid snake venoms on erythrocytes, p.432 In P. Rosenberg (ed.). Toxins, animal, plant and microbial. Proceedings of the Fifth International Symposium on Animal, Plant and Microbial Toxins. Pergamon Press, Oxford.
- International Committee for Standardization in Haematology (ICSH). 1978. Recommendation for reference method for haemoglobinometry in human blood (ICSH Standard EP 6/2: 1977) and specifications for international haemoglobincyanide reference preparation (ICSH Standard EP 6/3: 1977). J. Clin. Pathol. 31: 139-143.
- Martínez, C.E., C. Bonilla & A. Zavaleta. 1989. Acción hemolítica del veneno de la serpiente peruana *Bothrops barnetti* "macanche" sobre eritrocitos humanos. Bol. Soc. Química Perú 56: 1-12.
- Stauffer, C.E. 1975. A linear standard curve from the Folin Lowry determination of protein. Analyt. Biochem. 69: 645-648.