

## Alteraciones cardiovasculares inducidas por el veneno de *Lachesis muta* (Serpentes: Viperidae) y por su enzima fibrinogenolítica

Jorge Granados-Zúñiga<sup>1</sup> y Federico Aragón-Ortíz<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Laboratorio Clínico, Hospital San Juan de Dios, San José, Costa Rica.

<sup>2</sup> Departamento de Bioquímica, Escuela de Medicina, Universidad de Costa Rica, 2060 San José, Costa Rica.

Recibido 8-I-1998. Corregido 9-IX-1998. Aceptado 11-IX-1998.

**Abstract:** The fibrinolytic activity of *Lachesis muta stenophrys* venom was studied. Wistar rats catheterized at carotid artery and jugular vein were inoculated with crude venom or enzyme and changes in arterial pressure, cardiac frequency and electrocardiogram were monitored. The enzyme induced a greater fibrinogen reduction than the crude venom without any cardiovascular or histological alteration. In vitro crude venom coagulated blood whereas the enzyme reduced fibrinogen in 23%. Results suggest the potential use of the fibrinolytic enzyme as antithrombotic agent.

**Key words:** Snake venom, protease, fibrinogen, antithrombotic agent, *Lachesis muta stenophrys*.

Los venenos de serpientes son motivo de intenso estudio debido a los efectos patológicos que causa en el ser humano el accidente ofídico (Bolaños 1984, Lomonte 1994). Además, los venenos de víperidos son una importante fuente de enzimas con potencial poder terapéutico para el tratamiento de enfermedades hemostáticas (Verstraete 1993). Dentro de estas enfermedades están los procesos tromboembólicos para cuya prevención se emplean, entre otros, agentes desfibrinogénantes (Verstraete y Zoldhelyi 1995) como el ancrod® (aislado de *Agkistrodon rhodostoma*) (Ouyang y Teng 1978) y la batroxobina (aislada de *Bothrops atrox*) (Verstraete y Zoldhelyi 1995). Otra enzima tipo trombina desfibrinogénante ha sido purificada de *Bothrops asper* (Ortíz y Gubensek 1976, Aragón-Ortíz y Gubensek 1978).

En Costa Rica la familia Viperidae esta representada por los géneros *Agkistrodon*, *Crota-*

*lus*, *Bothrops* y *Lachesis*. La subespecie *Lachesis muta stenophrys* se encuentra en la región atlántica (Bolaños 1984) y de su veneno se ha aislado una enzima coagulante (Aragón-Ortíz y Gubensek 1993), una enzima fibrinogenolítica anticoagulante (Aragón-Ortíz 1992) y una lectina (Aragón-Ortíz *et al.* 1996). Se ha demostrado que la enzima fibrinogenolítica es una metaloproteasa que hidroliza cadenas alfa y beta del fibrinógeno, similar a la enzima proteolítica del veneno de *Bothrops asper* (Aragón-Ortíz y Gubensek 1987). Esta enzima puede contribuir a la severa hipotensión (debida a la liberación de quininas) e hipofibrinogenemia descrita en los pacientes mordidos por la serpiente (Barrantes *et al.* 1985, Bolaños *et al.* 1981) ya que degrada el fibrinógeno y libera quinina (Aragón-Ortíz 1992). La propiedad de ser hipofibrinogenante la convierte en un posible agente anticoagulante de importancia en el tratamiento de la trombosis.

En este trabajo se describe el efecto agudo que produce el veneno de *Lachesis muta stenophrys* y su enzima fibrinogenolítica *in vitro* e *in vivo* sobre la coagulación, presión arterial e integridad tisular.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Se empleó veneno liofilizado de *Lachesis muta stenophrys* (Instituto Clodomiro Picado, Universidad de Costa Rica, lote # 1-92). El equipo empleado fue: un Laboratorio de Coagulación Automatizado (ACL 3000, Instrumentation Laboratory, Milán, Italia), un transductor de presión arterial modelo RP-1500 i conectado al polígrafo Hewlett-Packard modelo 7754A, y un espectrofotómetro Shimadzu UV-1203.

La enzima fibrinogenolítica fue purificada del veneno de *L. m. stenophrys* según el procedimiento descrito por Aragón-Ortíz (1992), la enzima liofilizada se disolvió en 2 ml de cloruro de sodio al 0.9% para obtener una concentración final de 1 mg/ml y se asumió que una absorbancia a 280 nm de 1.00 equivale a una concentración de proteína de 1 mg/ml. La enzima fue calibrada con respecto a la actividad proteolítica del veneno crudo según el procedimiento descrito anteriormente. El cambio de absorbancia causado por la enzima se interpoló en la curva de calibración del veneno y se estimó la cantidad de veneno crudo en mg necesaria para producir igual cambio en absorbancia al producido por la enzima aislada.

La actividad proteolítica del veneno crudo se determinó incubando a 37 °C durante 1 hora 2 ml de caseína (Fischer, USA) al 2% pH 8.0 en amortiguador de fosfatos (Sigma, USA) con cantidades crecientes de entre 10 y 50 mg de veneno. La reacción se detuvo agregando 2 ml de ácido tricloroacético (Sigma, USA) al 5%, se dejó en reposo durante 5 min, se centrifugó a 10 000 g durante 30 min y se leyó la absorbancia del sobrenadante a 280 nm contra el blanco.

Para la determinación de la dosis máxima que toleraría la rata se tomó como punto de referencia una dosis letal 50% (DL50) de 94 mg/20 g de peso para el veneno de *L. m. ste-*

*nophrys* (Bolaños 1972). Se utilizaron dosis de 50, 60, 70, 100, 200 y 300% de la DL50 (equivalentes a 47, 56.4, 65.8, 94, 188 y 282 µg/20 g de peso corporal respectivamente) en una, dos o tres aplicaciones en días sucesivos a la misma hora (entre las 9 y 10 de la mañana). Los experimentos realizados con el veneno crudo se indican en el cuadro 1. Los cambios en presión arterial (PA) y electrocardiograma (ECG) se evaluaron simultáneamente a la aplicación del veneno y durante los 20 min posteriores. Las muestras de sangre o de tejidos se tomaron 20 min después de la última aplicación del veneno. Para la determinación de la actividad fibrinogenolítica y coagulante del veneno y de la enzima *in vitro* se obtuvieron muestras de sangre humana del Banco de Sangre del Hospital San Juan de Dios, San José, Costa Rica, recolectada en tubos plásticos con 2 ml de citrato de sodio al 3.8% o 0.1 ml de heparina de 5 000 U/ml (Sáenz 1981); cada uno de los siguientes experimentos con veneno crudo se hizo por triplicado observando el tiempo de coagulación y de disolución del coágulo y agregando a los blancos solución salina al 0.9% en lugar de veneno: se mezcló 4 ml de sangre citratada con 232 µg de veneno crudo en solución salina (equivalente al 70% de la DL50, Bolaños 1972) y se incubó a 37 °C durante 15, 60 o 120 min. Se mezcló 2 ml de plasma citratado con 116 µg de veneno crudo en solución salina y se incubó durante 15, 30 o 60 min. Se mezcló 0.5, 1.0, 1.5 y 2.0 ml de plasma heparinizado con 116 µg de veneno crudo, el volumen final se llevó a 2 ml con solución salina al 0.9% y se incubaron a 37 °C.

Para los experimentos con la enzima se mezcló 2 ml de plasma heparinizado con 29 µg de enzima y se incubó a 37 °C durante 1 hr. Cada experimento se hizo por triplicado. El blanco recibió un volumen equivalente de agua destilada. Se determinó el tiempo de coagulación y los niveles de fibrinógeno y de factores de coagulación. Cuando se formó un coágulo parcial este se cuantificó midiendo la longitud del mismo dentro del tubo de ensayo empleando una escala milimétrica y expresando el resultado como porcentaje respecto a la altura de la columna de plasma.

CUADRO 1

Experimentos realizados en ratas albinas empleando veneno crudo de *L. m. stenophrys*.  
DL50=4.7µg/g (Bolaños 1972)

Experimento No.	%DL50	Frecuencia (cada 24 horas)	Tiempo de toma de muestra de sangre desde la última dosis
1	0	—	—
2	33	3	1 hr
3	33	3	24 hr
4	50	1	20 min
5	70	1	15 min
6	70	1	1 hr
7	70	1	2 hr
8	70	1	40 min
9	70	1	24 hr
10	70	2	24 hr
11	70	3	24 hr
12	70	3	12 hr

Ratas (*Rattus norvegicus*) macho de la cepa Wistar (de 200 a 250 g), provenientes del bioterio del Laboratorio Clínico del Hospital San Juan de Dios se canularon por vía arterial y venosa empleando cánulas plásticas PE-50 y se observó el efecto desfibrinogénico, hipotensor y necrótico del veneno crudo y de la enzima fibrinogenolítica. En los experimentos con animales se siguió la normativa ética y legal existente (Anónimo 1994, Howard-Jones 1985). Suponiendo un volumen sanguíneo medio en la rata de 0.0567 ml/g (Anónimo 1980) se empleó 58 µg de veneno por cada ml de sangre de rata. Con el fin de mantener la misma proporción sangre/veneno en los experimentos *in vitro* con sangre humana se empleó la relación 4 ml de sangre/ 232 µg de veneno.

Se sangraron por punción cardíaca ratas anestesiadas con éter para obtener sangre en citrato de sodio (129 mmol/l) en una proporción sangre/citrato de 9 a 1. Una vez separado el plasma se realizaron las pruebas de coagulación: el tiempo de tromboplastina parcial activada (TTPA), el tiempo de protrombina (TP) y la concentración de fibrinógeno (FIB).

Para realizar el ECG se utilizaron electrodos de aguja colocados subcutáneamente y conectados al polígrafo en derivación II. Estas observaciones se realizaron con el animal bajo anestesia por éter.

Para la determinación de las alteraciones tisulares animales se sacrificaron por exsanguinación mientras estaban anestesiados para obtener muestras de tejidos de corazón, músculo esquelético, intestino delgado, riñón, pulmón, cerebro e hígado. Cada uno de estos animales recibió uno de los siguientes tratamientos con veneno crudo: control, una dosis de 31, 47, y 65.8 µg/20 g y tres dosis de 65.8 µg/20 g. Las muestras se conservaron en formalina al 10% y posteriormente se procesaron para ser incluidos en parafina. Los cortes se tiñeron con hematoxilina-eosina y se realizaron observaciones en microscopía de luz para observar daño tisular en comparación con muestras de animales control.

Se calibró la dosis de la enzima equivalente a una dosis de veneno que produce una proteólisis de caseína equivalente a la del veneno empleando también los resultados del experimento de la actividad caseinólítica. Esta dosis se aplicó una, dos o tres veces en días sucesivos observando los cambios en PA, ECG, fibrinógeno y tejidos según se indicó anteriormente y los resultados obtenidos se compararon con los observados con el veneno crudo. Los tratamientos realizados con la enzima fibrinogenolítica se indican en el cuadro 2. Los resultados se analizaron mediante pruebas de comparación de las medias de dos poblaciones y análisis de variancia empleando un nivel de significancia del 0.05.

CUADRO 2

Experimentos realizados en ratas albinas empleando la enzima fibrinogenolítica de *L. m. stenophrys* en una dosis de 0.82 µg / g.

Experimento No.	Frecuencia de dosis (cada 24 horas)	Tiempo de toma de muestra de sangre desde la última dosis
1	0	—
2	1	20 min
3	2	20 min
4	2	48 hr
5	3	20 min
6	3	12 hr
7	3	48 hr

## RESULTADOS

Cantidades de 5 o 10  $\mu\text{g}$  de enzima fibrinogenolítica produjeron un cambio de absorbancia a 280 nm de 0.12 y 0.24 respectivamente sobre caseína al 2% en tanto que cantidades similares del veneno crudo produjeron un cambio de absorbancia de 0.03 y 0.06.

A partir de las observaciones realizadas *in vivo* se determinó que la dosis del veneno crudo que produce cambios en los niveles de FIB sin afectar PA ni ECG es el 70% de la DL50 (3.29  $\mu\text{g/g}$ ).

El tiempo promedio de coagulación de las muestras de sangre total citratada al agregarle el veneno (concentración final 58  $\mu\text{g/ml}$ ) fue de 4 s (S.D.=1, n=9). No se observó disolución del coágulo durante ninguno de los períodos de incubación (15, 60 y 120 min).

El tiempo promedio de coagulación de sangre total citratada al agregar veneno crudo (concentración final 58  $\mu\text{g/ml}$ ) fue 30 s (S.D.=4, n=9). No se observó disolución del coágulo durante ninguno de los períodos de incubación (15, 30 y 60 min).

Los tiempos de coagulación de plasmas heparinizados al agregar el veneno crudo (concentración final 58  $\mu\text{g/ml}$ ) fueron de  $58 \pm 4$  (n=2),  $41 \pm 1$  (n=2),  $24 \pm 2$  (n=2) y  $18 \pm 2$  s (n=2) para volúmenes de plasma de 0.5, 1.0, 1.5 y 2.0 ml respectivamente; en tanto que los controles no coagularon.

Con respecto el efecto de la enzima fibrinogenolítica sobre el plasma heparinado se observó que no hubo coagulación durante los diez primeros minutos de incubación. Al cabo de 60 min se observó un coágulo parcial promedio de un  $20 \pm 3\%$  (n=3) del volumen total del plasma. Los niveles de fibrinógeno en mg/dl después de una hora de incubación fueron los siguientes: para el control  $190 \pm 5$  (n=3), para los plasmas incubados con la enzima  $146 \pm 6$  (n=3). Los análisis de variancia de los resultados obtenidos con el veneno crudo sobre los tiempos de coagulación y los niveles de fibrinógeno en ratas (Figs. 1 y 2) indicaron lo siguiente:

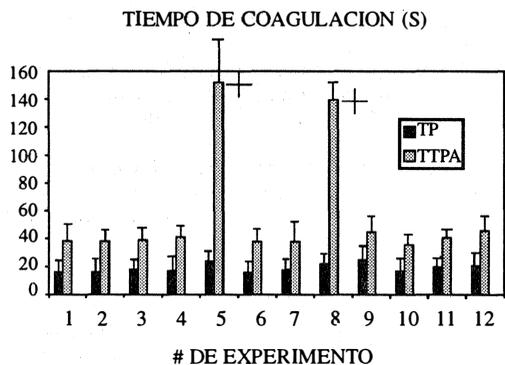


Fig. 1. Efecto *in vivo* de diferentes experimentos con el veneno crudo de *L. muta stenophrys* sobre los tiempos de coagulación de ratas albinas. TP=tiempo de protrombina, TTPA=tiempo de tromboplastina parcial activado. Los tratamientos se especifican en el Cuadro 1.

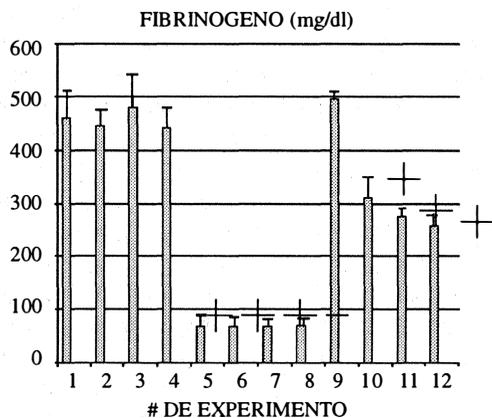


Fig. 2. Efecto *in vivo* de diferentes experimentos con veneno de *L. m stenophrys* sobre los niveles de fibrinógeno en ratas albinas. Los tratamientos se especifican en el Cuadro 1.

1. El TP no aumentó significativamente, 15 min después de administrar una sola vez 65.8  $\mu\text{g}/20$  de peso corporal ( $X=24 \pm 2$  s, control:  $X=16 \pm 5$  s). La administración repetida cada 24 hr 2 o 3 veces no prolongó en mayor magnitud el TP.

2. El TTPA aumentó significativamente a los 15 ( $152 \pm 32$  s, control  $38 \pm 11$  s) y 40 min ( $140 \pm 13$ ) después de administrar una sola vez 65.8  $\mu\text{g}$  de veneno/20 de peso corporal.

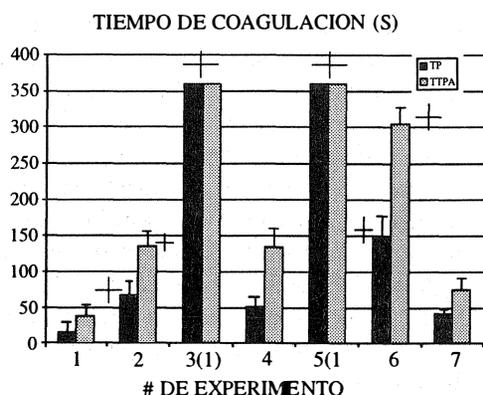


Fig. 3. Efecto *in vivo* de diferentes experimentos con la enzima fibrinogenolítica de *L. m. stenophrys* sobre los tiempos de coagulación de ratas albinas. TP=tiempo de protrombina, TTPA=tiempo de tromboplastina parcial activado. (1) Con este tratamiento no hubo coagulación durante el período de observación indicado. Los tratamientos se especifican en el Cuadro 2.

3. El FIB disminuyó significativamente a los 15 min, 40 min, 1 hr o 2 hr después de administrar una sola vez 65.8 µg de veneno/20 de peso corporal (68±19, 70±6, 67±4 y 68±5 respectivamente, control: 460±56 mg/dl). Solo con el FIB (y no con TP o TTPA) se observó un cambio significativo con la administración repetida del veneno cada 24 hr.

Los análisis de variancia de los resultados obtenidos con la enzima fibrinogenolítica (dosis=0,82 µg/g) sobre los tiempos de coagulación y los niveles de fibrinógeno en ratas (Figs. 3 y 4) indicaron lo siguiente:

1. Hubo un cambio significativo en el TP, TTPA y FIB con los siguientes tratamientos:

a. Una dosis cada 24 hr para dos dosis en total con sangrado a los 20 min de terminado el tratamiento (TP y TTPA>6 min, FIB indetectable).

b. Una dosis cada 24 hr para tres dosis en total con sangrado a los 20 min de terminado el tratamiento (TP y TTPA>6 min, FIB indetectable).

c. Una dosis cada 24 hr para tres dosis en total con sangrado a las 12 hr de terminado el tratamiento (TP=150 s, TTPA=305 s, FIB=50 mg/dl).

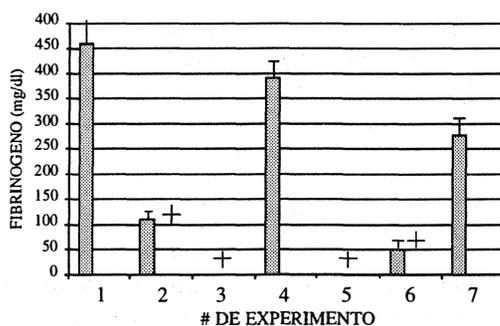


Fig. 4. Efecto *in vivo* de diferentes experimentos con la enzima fibrinogenolítica de *L. m. stenophrys* sobre los niveles de fibrinógeno de ratas albinas. Los tratamientos se indican en el Cuadro 2.

d. Una dosis con sangrado 20 min después (TP=60 s, TTPA=135 s, FIB=115 mg/dl).

Los efectos del veneno crudo y de la enzima fibrinogenolítica sobre la presión arterial media (PAM), frecuencia cardíaca (f.c.) y electrocargiograma (E.C.G.) fueron los siguientes:

1. El veneno crudo en dosis de 0,31 y 47 µg/g no produjo efecto apreciable sobre la PAM. Una dosis de 65.8 µg/g produjo una caída promedio de 32 mmHg (26%) (S.D.=7, n=10)(PAM inicial=125, final=93); el tiempo promedio de inicio de la caída de la PAM después de terminar de inyectar el veneno fue 1.75 min. (S.D.=1.2 min) y el tiempo de recuperación hasta los niveles normales después de terminar de inyectar el veneno fue de 10.2 min. (S.D.=5,7 min). El efecto sobre la frecuencia cardíaca (f.c.) siguió un patrón similar: dosis de veneno menores de 65.8 µg/g no produjeron ningún cambio evidente en tanto que 65.8 µg/g aumentó un 25% la f.c. (f.c. inicial=380 latidos por minuto, f.c. final=466, S.D.=48, n=10). No se notaron cambios en el E.C.G. a dosis de 65.8 µg/g o menos. Dosis mayores produjeron efectos generalmente irreversibles por lo que no se utilizaron.

2. La enzima fibrinogenolítica en la dosis empleada (0.82 µg/g) no produjo ningún cambio evidente en la P.A.M., f.c. ni E.C.G.

Finalmente, ninguna de las dosis empleadas del veneno crudo ni de la enzima fibrino-

genolítica produjo alteraciones apreciables en la estructura normal de los órganos examinados en microscopía de luz.

### DISCUSIÓN

Los accidentes cardiovasculares son la principal causa de mortalidad en Costa Rica (Anónimo 1997) y en los países industrializados (Verstraete 1993). Se ha demostrado que el fibrinógeno es un factor predisponente de enfermedad cardíaca coronaria tan importante como el fumado, colesterolemia y la hipertensión (Kannel *et al.* 1987) por lo que se justifica la búsqueda de sustancias hipofibrinogénicas. Una estrategia para el desarrollo de agentes antitrombóticos ha sido el aislamiento de sustancias provenientes de secreciones de quirópteros, hirudíneos, dípteros y triatómidos (Markwardt 1994) así como de los venenos de vipéridos (p. ej. Martínez *et al.* 1991, Pirkle y Marsh 1991, Fujimura *et al.* 1996, Pantigoso *et al.* 1996, Verstraete y Zoldhelyi 1995).

*L.m.stenophrys* es un vipérido que se encuentra en la región atlántica de Costa Rica de cuyo veneno se aisló una enzima fibrinogenolítica y quininogénica de 14 KDa y 116 residuos de amino ácidos (Aragón-Ortíz 1992) por lo que es una de las fibrinogenasas más pequeñas aisladas hasta ahora de un veneno de serpiente (Markland 1991).

La enzima fibrinogenolítica purificada mostró cuatro veces mayor actividad proteolítica sobre caseína que el veneno crudo. No coaguló los plasmas heparinizados y redujo significativamente los niveles de fibrinógeno (de 190 a 146 mg/dl, reducción del 23%, en 60 min). Esto se explica por su acción proteolítica sobre las cadenas alfa y beta del fibrinógeno (Aragón-Ortíz 1992, Henschen 1993) lo cual posiblemente haría que este pierda otras funciones procoagulantes características (Cawaz *et al.* 1995, Mosesson 1992, Rabhi-Sabile y Piddard 1995).

La sangre total citratada en contacto con veneno crudo coaguló en un tiempo significativamente menor que el plasma citratado (4 y 30 s respectivamente) como cabría esperarse

por la presencia de los componentes celulares de la sangre (Medved *et al.* 1994, Nesheim *et al.* 1993, Maragánore 1993); en tanto que los plasmas heparinizados coagularon en tiempos significativamente menores que los plasmas citratados. El poder procoagulante del veneno puede atribuirse a la actividad de la stenoxobina, una enzima de 30 KDa similar a trombina capaz de liberar fibrinopéptido A (FPA) y, en menor grado, fibrinopéptido B (FPB) y que no es inhibida por heparina (Aragón-Ortíz y Gubensek 1993).

La trombina remueve FPA y FPB produciendo la polimerización de fibrina (Mosesson 1992) y la stenoxobina de *L.m.stenophrys* produciría un efecto procoagulante similar a la trombina. Otros venenos de vipéridos producen proteinasas coagulantes similares, como *L.m.melanocephala* (Aragón Ortíz 1988), *Bothrops asper* (Ortíz y Gubensek 1976, Aragón-Ortíz y Gubensek 1978) y *B.jararaca* (Kamiguti *et al.* 1994).

Los experimentos realizados con el veneno crudo *in vivo* indican una probable disminución de los factores VIII, IX, XI o XII de la coagulación pues se observa una prolongación significativa del TTPA pero no del TP (Fig. 1). El TP detecta deficiencias en los factores II, V, VII y X (Porras 1986 a) mientras que el TTPA detecta deficiencias en los factores de coagulación II, V, VIII, IX, X, XI y XII (Porras 1986 b). No se conocen informes de que el veneno de *L. m. stenophrys* reduzca específicamente algún factor de la coagulación. Sin embargo, se ha descrito que el envenenamiento en humanos por un vipérido cercano, *Bothrops asper*, reduce los niveles de los factores II, V, VIII, IX, X y XI, no del XII (Barrantes *et al.* 1985). Los tiempos de coagulación se normalizaron una hora después de la administración del veneno. También se observó al administrar el veneno crudo una disminución del 85% del FIB a los 15 min de administrado el veneno, efecto que se mantuvo incluso hasta dos horas después de la administración. A las 24 hr los niveles del FIB fueron normales (Fig. 2). La aplicación de dos o tres dosis de veneno una vez cada 24 hr produjo una disminución en el FIB del 33 y

40% respectivamente 24 hr después de la última aplicación. Este efecto acumulativo de dosis repetidas del veneno sobre FIB no se observa en los tiempos de coagulación lo cual parece indicar un efecto más específico o de mayor duración sobre el primero.

Además de alterar la hemostasis normal de la rata el veneno crudo de *L.m. stenophrys* produjo modificaciones en las funciones cardiovasculares: dosis del 70% de la LD50 redujo reversiblemente la PAM en un 26% y aumentó en 25% la f.c. El efecto hipotensor del veneno crudo podría atribuirse a la presencia de una lectina a la que se le ha atribuido una capacidad hipotensiva asociada con la aglutinación de glóbulos rojos (Gómez Leiva y Aragón-Ortiz 1986).

La ausencia de daños tisulares en los órganos observados por microscopía de luz al aplicar el veneno crudo pudo deberse al tipo o dosis de veneno, la ruta empleada, o al sujeto huésped (Lomonte 1994, Morais *et al.* 1993). Deberían emplearse otros métodos, además de la microscopía, como la medición de la actividad creatín quinasa plasmática para detectar la actividad miotóxica (Calderón *et al.* 1993).

La enzima no produjo coagulación *in vitro* y redujo en un 23% el FIB lo que indica degradación de fibrinógeno a productos no coagulables. El efecto es más notable *in vivo*: hay un significativo aumento tanto en TP como en TT-PA (Fig. 3) así como una significativa reducción en el FIB (Fig. 4). Este efecto es mayor que con el veneno crudo sin que ocurran cambios en las variables cardiovasculares observadas. Los resultados indican que hay dos tratamientos más eficaces que los demás: dos o tres dosis una vez cada 24 hr con sangrado a los 20 min o a las 12 hr. Cuando se administran solo dos dosis el nivel de FIB vuelve a su valor normal 48 hr después de la última dosis (Fig. 4) pero no ocurre lo mismo con el TTPA lo cual podría indicar el consumo de algún factor de coagulación (como VIII, IX, XI o XII). Es interesante notar que, a pesar que la enzima fibrinogenolítica produce en ensayos *in vitro* quininas a partir de quinínogeno de bajo peso molecular (Aragón-Ortiz 1992) y que las quininas

son hipotensoras (Margolius 1989), no se encontró que la enzima tenga un efecto hipotensor a las dosis empleadas *in vivo*.

El efecto hipofibrinogénico de la enzima estudiada de *L.m.stenophrys* podría explicarse porque la degradación de cadenas alfa y beta del fibrinógeno produciría partículas de fibrina que serían rápidamente eliminadas de la circulación por el sistema retículoendotelial, mecanismo que ha sido propuesto para el anclaje de *Agkistrodon rhodostoma* (Sherman *et al.* 1994). La hipofibrinogenemia resultante reduciría la viscosidad sanguínea aumentando el flujo sanguíneo e inhibiendo la formación posterior de trombos (Id.).

Los resultados apoyan el potencial uso de la enzima fibrinogenolítica como agente antitrombótico *in vivo* pues disminuye FIB sin alterar las funciones cardiovasculares o la estructura normal de los órganos estudiados. Sin embargo, debería evaluarse su efecto sobre factores específicos de coagulación para comprender mejor su actividad *in vivo*. El beneficio clínico real de nuevos agentes antitrombóticos y los riesgos de sangrados asociados a ellos como monoterapias o en combinación solo se aclarará en ensayos clínicos bien diseñados a gran escala (Verstraete y Zoldhelyi 1995).

## RESUMEN

Se estudió la actividad fibrinolítica del veneno *Lachesis muta stenophrys* y de su enzima fibrinogenolítica. Ratas Wistar cateterizadas en la arteria carótida y vena yugular fueron inoculadas con el veneno crudo o la enzima. Se monitoreó los cambios en la presión arterial, frecuencia cardíaca y electrocardiograma. La enzima indujo una mayor reducción del fibrinógeno que el veneno crudo sin causar alteraciones cardiovasculares o histológicas. *In vitro* el veneno crudo coaguló la sangre mientras que la enzima redujo el fibrinógeno en un 23%. Los resultados sugieren el uso potencial de la enzima fibrinogenolítica como agente antitrombótico.

## AGRADECIMIENTOS

Agradecemos la colaboración de Jorge Vargas y José Rafael Brenes de la Facultad de Medicina, Universidad de Costa Rica; así como al

Instituto Clodomiro Picado, Universidad de Costa Rica, por el veneno suministrado. Este trabajo se hizo bajo el proyecto de la Vicerrectoría de Investigación de la Universidad de Costa Rica No. 422-91-254.

## REFERENCIAS

- Anónimo. 1980. Guide to the care and use of experimental animals. Canadian Council on Animal Care. Vol. 1. Ottawa, Ontario. 112 p.
- Anónimo. 1994. Ley de Bienestar de los Animales. Ley No. 7451. Asamblea Legislativa, República de Costa Rica. La Gaceta No. 236, 13 diciembre 1994.
- Anónimo. 1997. Comportamiento de la mortalidad y la natalidad. Costa Rica, 1995. República de Costa Rica, Ministerio de Salud, Dirección Sistema de Información, Centro de Información. Costa Rica, Junio 1997.
- Aragón Ortíz, F. 1988. Isolation and partial characterization of *Lachesis muta melanocephala* coagulant protease: biochemical parameters of the venom. *Rev. Biol. Trop.* 36: 387-392.
- Aragón-Ortíz, F. 1992. Characterization of a proteolytic enzyme from *Lachesis muta* venom (Serpentes: Viperidae). *Rev. Biol. Trop.* 40:209-213.
- Aragón-Ortíz, F., R. Mentale & E.A. Auerswald. 1996. Amino acid sequence of a lectin-like protein from *Lachesis muta stenophrys* venom. *Toxicon* 34:763-769.
- Aragón-Ortíz, F. & Gubensek, F. 1978. Characterization of thrombin-like proteinase from *Bothrops asper* venom. In P. Rosenberg (ed.). *Toxins: animal, plant and microbial*. Proceedings of the Fifth International Symposium. Pergamon, Nueva York. Pp. 107-111.
- Aragón-Ortíz, F. & F. Gubensek, 1987. Characterization of a metalloproteinase from *Bothrops asper* (terciopelo) snake venom. *Toxicon* 25: 759-766.
- Aragón-Ortíz, F. & F. Gubensek. 1993. A thrombin-like enzyme from bushmaster (*Lachesis muta stenophrys*) venom. *Toxicon* 31: 1435-1443.
- Barrantes, A., V. Solís & R. Bolaños. 1985. Alteración de los mecanismos de la coagulación en el envenenamiento por *Bothrops asper* (Terciopelo). *Toxicon* 23: 399-407.
- Bolaños, R. 1972. Toxicity of Costa Rican snake venoms for the white mouse. *Amer. J. Trop. Med. Hyg.* 21: 360-363.
- Bolaños, R. 1984. Serpientes, venenos y ofidismo en Centroamérica. Universidad de Costa Rica, San José. p. 136.
- Bolaños, R., O. Rojas & C.E. Flores-Ulloa. 1981. Aspectos biomédicos de cuatro casos de mordeduras de serpiente por *Lachesis muta* en Costa Rica. *Rev. Biol. Trop.* 30: 53-58.
- Calderón, L., B. Lomonte, J.M. Gutiérrez, A. Tarkowski & L.A. Hanson. 1993. Biological and biochemical activities of *Vipera berus* (European viper) snake venom. *Toxicon* 31: 743-753.
- Daniel, W.W. 1989. Bioestadística. Limusa, México, 667 p.
- Fujimura, Y., T. Kawasaki & K. Titani. 1996. Snake venom proteins modulating the interaction between von Willebrand factor and platelet glycoprotein 1b. *Thromb Haemos* 76: 633-639.
- Gawaz, M., I. Ott, A.J. Reininger & F.J. Newmann. 1995. Effects of magnesium on platelet aggregation and adhesion. *Thromb Haemos* 72: 912-918.
- Gómez Leiva, M.A. & F. Aragón-Ortíz. 1986. Purification and some properties of hemagglutinating protein Mutina from Bushmaster *Lachesis muta* snake venom. *Rev. Biol. Trop.* 34: 49-53.
- Henschen, A.H. 1993. Human fibrinogen-structural variants and functional sites. *Thromb Haemos* 70: 42-47.
- Howard-Jones, N. 1985. A CIOMS ethical code for animal experimentation. *WHO Chronicle* 39: 51-56.
- Kamiguti, A.S., J.R. Slupsky, M. Zuzel, C.R.M. Hay. 1994. Properties of fibrinogen cleaved by jarrahagin, a metalloproteinase from the venom of *Bothrops jararaca*. *Thromb Haemos* 72: 244-249.
- Kannel, W.B., P.A. Wolf & W.P. Castelli. 1987. Fibrinogen and risk of cardiovascular disease. *JAMA* 258: 1183-1186.
- Lomonte, B. 1994. Tissue damage and inflammation induced by snake venoms. University of Goteborg. Goteborg, Suecia. Pp. 1-88.
- Lomonte, B. & J.M. Gutiérrez. 1983. La actividad proteolítica de los venenos de serpientes de Costa Rica sobre la caseína. *Rev. Biol. Trop.* 31: 37-40.

- Maraganore, J.M. 1993. Thrombin, thrombin inhibitors, and the arterial thrombotic process. *Thromb Haemos* 70: 208-211.
- Margolius, H.S. 1989. Tissue kalikreins and kinins: regulation and roles in hypertensive and diabetic diseases. *Annu Rev Pharm Toxicol* 29: 343-364.
- Markland, F.S. 1991. Inventory of a- and b-fibrinogenases from snake venoms. *Thromb Haemos* 65: 438-443.
- Markwardt, F. 1994. Coagulation inhibitors from animals feeding on blood. *Rev Iberoamer Tromb Hemostasia* 7: 225-231.
- Martínez Cadillo, E., C.B. Ferreyra & A. Zavaleta. 1991. Actividad hemolítica de venenos de serpientes de los géneros *Bothrops*, *Lachesis*, *Crotalus* y *Micrurus* (Serpentes: Viperidae y Elapidae). *Rev. Biol. Trop.* 39: 311-314.
- Medved, L.V., A. Vysotchin & K.C. Ingham. 1994. Ca<sup>2+</sup> dependent interactions between Gla and EGF domains in human coagulation factor IX. *Biochemistry* 33: 478-485.
- Morais, J.F., R. Guidolin, M.A. Stéphano & H.G. Higashi. 1993. Letalidade em camundongos por venenos de serpentes brasileiras, de maior importancia médica. *Mem. Inst. Butantan* 55: 101-105.
- Mosesson, M.W. 1992. The roles of fibrinogen and fibrin in hemostasis and thrombosis. *Seminars Hema* 29(3): 177-188.
- Nesheim, M.E. *et al.* 1993. On the existence of platelet receptors for factor V(a) and factor VIII(a). *Thromb Haemos* 70: 80-86.
- Ortíz, F.A. & Gubensek, F. 1976. Isolation and some properties of blood clotting enzyme from the venom of *Bothrops asper*. *Bull Inst Past* 74: 145-148.
- Ouyang, C. & C.M. Teng. 1978. *In vivo* effects of the purified thrombin-like and anticoagulant principles of *Agkistrodon acutus* (hundred pace snake) venom. *Toxicon* 16: 583-593.
- Pantigoso, C., E. Escobar, O. Málaga & A. Yarlequé. 1996. Aislamiento y algunas propiedades de la atroxina, una proteinasa del veneno de la serpiente peruana *Bothrops atrox* "Jergon". *Acta Científica Venezolana* 47: 67-73.
- Pirkle, H. & N. Marsh. 1991. Nomenclature of exogenous hemostatic factors. *Thromb Haemos* 66: 264.
- Porras, A. 1986 a. Preparación del reactivo para la prueba de tiempo de protrombina. *In* Reactivos para uso en laboratorio clínico. Vol. 2. Reactivos Biológicos. EDUCA, San José, Costa Rica. p. 7-14.
- Porras, A. 1986 b. Preparación del reactivo para la prueba de tiempo de tromboplastina parcial. Vol. 2. Reactivos Biológicos. EDUCA, San José, Costa Rica. p. 15-21.
- Rabhi-Sabile, S. & D. Pidard. 1995. Exposure of human platelets to plasmin results in the expression of irreversibly active fibrinogen receptors. *Thromb Haemos* 73: 693-701.
- Saenz, G.R. 1981. Hematología. Universidad de Costa Rica, San José. p. 41.
- Sherman, D.G., P. Barbour, D. Ley, C. Olinger & E.B. Ringelstei. 1994. Ancrod for the treatment of acute ischemic brain infarction. *Stroke* 25: 1755-1759.
- Verstraete, M. 1993. Les promesses des antithrombotiques. *Recherche* 24: 606-610.
- Verstraete, M & P. Zoldhelyi 1995. Novel antithrombotic drugs in development. *Drugs* 49: 856-884.