

Modificaciones en los marcadores

enzimáticos hepáticos promovidos por veneno de ejemplares jóvenes de crotalus DURISSUS CUMANENSIS

Modifications in the enzymatic liver markers promoted by the venom of young crotalus DURISSUS CUMANENSIS

José Rugby Noriega Alvarado³ *, Roberth Gabriel Marín Barico^{2*}, José Antonio Mendoza^{2**}, Carmen del Rosario Álvarez Yépez^{3**}, Alexander Antonio Mogollón Saldivia^{2**}, Mirleny del Carmen Pérez-Urrieta^{3*}, Yaritza Salas³ ***

*Área de Bioquímica, Decanato de Ciencias Veterinarias, Universidad Centroccidental "Lisandro Alvarado", **Laboratorio de Toxicología, Decanato de Ciencias Veterinarias, Universidad Centroccidental "Lisandro Alvarado", *** Laboratorio de Anatomía Histopatología del Decanato de Ciencias Veterinarias, Universidad Centroccidental "Lisandro Alvarado".

jnoriega@ucla.edu.ve

Título corto: Marcadores enzimáticos hepáticos y C. d. cumanensis

1- TSU, 1- Médico Veterinario 2- Magíster3.

Correspondencia a: José R. Noriega Alvarado, 0251-2592423, jnoriega@ucla.edu.ve.

Este trabajo fue financiado por el Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico de la Universidad Centroccidental "Lisandro Alvarado", Proyecto N 017-Ve-2005.

Recibido: 25/05/2010

Aceptado: 13/09/2010

Resumen

Se determinaron los cambios séricos de ALT, AST, FA, promovidos por veneno de ejemplares jóvenes *Crotalus durissus cumanensis*. Ratones Balb/C inoculados con 0,75 mg proteínas de veneno/kg vía intraperitoneal y controles con ssf. Se obtuvieron muestras a diferentes intervalos post-inyección (1, 3, 6, 12 y 24 h) determinándose los niveles séricos de: ALT, AST, y FA, posterior al sacrificio se tomaron muestras de hígado para la valoración histopatológica. Los valores de ATL, AST y FA se incrementaron significativamente, siendo más temprano el aumento de AST (1h) y más tardío el de la FA (24). El hallazgo histopatológico del tejido hepático reveló tumefacción celular severa, células de Kuffer activadas y necrosis coagulativa focal. El incremento de los marcadores enzimáticos ALT, AST, y FA, paralelo a los daños histológicos encontrados en este estudio, sugieren daño hepato-biliar, adicionalmente, los niveles séricos de AST podrían indicar daño al tejido muscular esquelético y/o cardíaco.

Palabras claves: *Crotalus*, daño hepático, Alanina-amino transferasa, Aspartato amino-transferasa, fosfatasa alcalina.

Abstract

To determinate the effect of the venom of young *Crotalus durissus cumanensis* on levels of ALT, AST and AP, Balb/C mice were inoculated intraperitoneal with 0,75 mg/Kg of purified venom. Serum samples were obtained at different post-injection intervals (1, 3, 6, 12, 24h) and serum levels of ALT, AST and AP were determined. A significative difference ($P < 0,01$) was observed in serum levels of ALT at 6h and at 24h post-venom injection, with a maximum of 587,64 U/L at 24 h, when compared with controls. In addition, AST shows a significative elevation between 1h and 12h post venom injection, with a maximum level of 2327 U/L at 3 h, while AP only showed significant differences at 24 h post-venom injection. These results suggest that the venom of young *Crotalus durissus cumanensis* induced liver-biliar injury, with a possible effect on skeletal muscle and/ or cardiac tissue.

Key words: *Crotalus*, Liver injury, Alanin-amino transferase, Aspartate-amino transferase, Alkaline Phosphatase.

Introducción

El veneno de serpientes contiene proteínas con poderoso efecto farmacológico, clasificadas por su actividad proteolítica, hemolítica, citotóxica, miotóxica y neurotóxica¹, las cuales constituyen del 90 al 95% del peso seco del veneno y son

responsables de sus efectos². Las serpientes *Crotalus durissus cumanensis* y *Crotalus durissus ruruima* son dos sub-especies de *Crotalus* en Venezuela³, su veneno contiene una mezcla compleja de enzimas, toxinas y péptidos, conocidos

como: crotamina y crotolina de acción miotóxica, principalmente sobre las fibras esqueléticas tipo I^{4,5,6}. La crotolina (crotapotina y fosfolipasa A₂) tiene acción neurotóxica^{6,7,8}, giroxina y convulsina producen convulsiones, alteraciones circulatorias y respiratorias^{9,10} y una enzima parecida a la trombina que su actividad permanente hace incoagulable la sangre al agotar al fibrinógeno, con disminución del contaje plaquetario^{11,12}. Son bien conocidos sus efectos locales y sistémicos en animales de experimentación^{13,14}. Trabajos previos sugieren daño hepático por elevación de los niveles séricos de las enzimas: alanina-amino transferasa (ALT), aspartato-amino transferasa (AST) y fosfatasa alcalina (FA).^{15,16,17}. Se ha observado que el veneno de ejemplares jóvenes de *Crotalus* tienen una alta toxicidad, debido a que contienen niveles elevados de crotolina^{18,19}, sin embargo, poco se conoce sobre los daños hepáticos producidos por ejemplares jóvenes. El objetivo de este estudio fue determinar las modificaciones en los marcadores enzimáticos hepáticos y el daño celular promovido por veneno de ejemplares jóvenes de *Crotalus durissus cumanensis*.

Método

El estudio se realizó con pool de veneno obtenido por ordeño manual de ejemplares jóvenes de *Crotalus durissus cumanensis* mantenidos en cautiverio individualmente en el Laboratorio de Toxicología en un terrarium de vidrio de 40cm de largo x 40cm de ancho x 30cm de alto con tapa de madera y malla metálica, a una temperatura diurna de 30°C y nocturna de 24°C, todas las serpientes se alimentan una vez al mes con ratones cepa MNRI del Bioterio del DCV de la UCLA y se les administra agua ad libitum. Se utilizaron 50 ratones ratones Balb/C del Bioterio, del DCV-UCLA divididos en 5 grupos, subdivididos a su vez en: subgrupo experimental de 5 ratones inoculados con veneno vía intraperitoneal a dosis de 0,75 mg de proteínas de veneno/kg de peso en 50µl de NaCl 0,9%, 5 ratones (subgrupo control) inoculados con 50µl de NaCl 0,9%. Se realizó extracción de sangre de la vena caudal, a intervalos de 1, 3, 6, 12, y 24h post-inyección. Las muestras fueron centrifugadas a 800 g por 10 min., determinando los niveles séricos de: alanina-amino transferasa (ALT), aspartato-aminotransferasa (AST), fosfatasa alcalina (FA), mediante kit comercial (invelab®), analizadas en Star Fax (Ω Omega IV). Las muestras de hígado se obtuvieron a las 24 horas post inoculación, el material fue preservado con formol al 10% preparado en PBS a pH 7,3 y enviado al Laboratorio de Histopatología Animal del Decanato de Ciencias Veterinarias para su montaje, tinción y análisis basados en técnicas histológicas clásicas, con Hematoxilina-eosina.

Análisis estadístico: Para determinar la validez estadística de los tratamientos, se aplicó la prueba t para muestras independientes, empleando para ello el programa estadístico SPSS 11,5 para Windows.

Resultado y discusión

El grupo experimental no presentó diferencias significativas en los niveles séricos de ALT con respecto al grupo control a la 1h post-inyección (gráfico 1), sin embargo, presentó un aumento progresivo y altamente significativo ($P < 0,01$) desde las 6h hasta las 24h, con un máximo de 587,64 U/L a las 24h, representando un incremento del 857%. La ALT es una enzima específica para determinar daño del tejido hepático²⁰, Estudios in vivo que han analizado este tópico han encontrado resultados similares al respecto^{15,16}; Noriega y col.¹⁷ reportan niveles séricos de ALT inferiores a los encontrados en esta investigación en especies de *Crotalus durissus cumanensis*, donde se empleó la misma dosis de veneno pero de ejemplares adultos de *Crotalus durissus cumanensis*; sin embargo, también presentan un pico máximo a las 24 horas¹⁵, mientras que otras especies adultas como *Bothrops asper* y *Bothrops alternatus*, empleando dosis de veneno superiores a la utilizada en este estudio, la ALT tiene un pico máximo a las 9h pero con valores inferiores¹⁶. Esto pudiera indicar que el veneno de *Crotalus durissus cumanensis* de ejemplares jóvenes es más tóxico para el tejido hepático que el veneno de ejemplares adultos, así como de *Bothrops*.

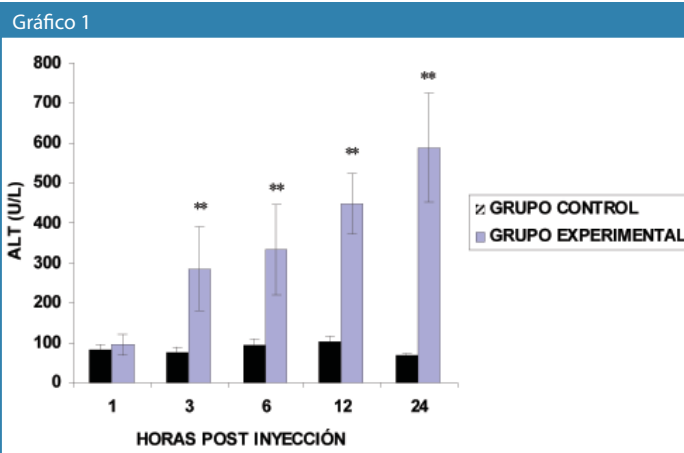
El gráfico 2 muestra un incremento altamente significativo ($P < 0,01$) de la AST del grupo experimental con respecto al control, desde la 1h hasta las 24h con un valor máximo de 2327 U/L a las 3h representando un aumento del 4.356%. La enzima AST está presente como isoenzima citosólica y mitocondrial en numerosos tejidos²¹. En este estudio, el veneno produjo un aumento en los niveles séricos de AST que es indicativo junto con ALT de un daño hepático, sin embargo, la AST puede aumentar también en respuesta a un daño muscular severo²⁰. Investigaciones realizadas en la misma especie pero con ejemplares adultos de *Crotalus durissus cumanensis*, indican niveles séricos elevados de AST con un pico máximo a las 12h post-inyección¹⁷, siendo los valores reportados inferiores a los encontrados en este estudio. El veneno de ejemplares adultos de *Crotalus durissus terrificus* presentan picos máximos de AST a las 24h¹⁵, mientras que, ejemplares adultos de *Bothrops asper* y *Bothrops alternatus* su pico máximo de AST fue entre las 3-9h¹⁶, ambos valores son inferiores a los aquí encontrados, esto podría sugerir que el veneno de los ejemplares jóvenes es más tóxico.

En el grupo experimental los niveles de la FA durante las primeras 12h permanecen estable, con respecto al control, con un aumento altamente significativo ($P < 0,01$) a las 24h, del 622%. Poco se conoce sobre el efecto del veneno de *Crotalus* sp sobre la actividad de la FA, esta enzima presente principalmente en tejido hepático y óseo, su incremento patológico se debe mayormente a trastornos hepatobiliares²². Resultados similares describen aumentos en los niveles séricos de la FA entre las 12 y 24h post-inyección en ratones inoculados con veneno de ejemplares adultos de *Crotalus durissus cumanensis*¹⁷, igualmente, se ha descrito un aumento de FA entre las 24 y 48h después de la inyección intramuscular del

veneno de *Crotalus durissus terrificus* en caninos²³, mientras que, el veneno crudo y fraccionado de *Bungarus caeruleus* aumenta los niveles séricos de FA en ratones²⁴. El aumento en los niveles séricos de la FA encontrado en este estudio pudiera interpretarse como una colestasis intrahepática, sin embargo, es necesario realizar estudios complementarios, ya que, el veneno de *Crotalus durissus cumanensis* en vez de producir colestasis intrahepática, quizás induzca daño de las células de los canalículos biliares y no se debe descartar además, el daño que en forma simultánea podría experimentar el resto de los tejidos donde la FA está presente. El aumento en los niveles séricos de la FA es tardío y no paralelo en relación a las ALT y AST, por lo que es necesario incluir en las futuras investigaciones la detección de las isoformas para establecer cual tejido es afectado por la exposición al veneno de esta serpiente. El aumento en los niveles séricos de las enzimas ALT, AST y FA quizás puedan deberse a las modificaciones sobre la permeabilidad de la membrana celular hepática producida por la crotoxina de ejemplares jóvenes de *Crotalus durissus cumanensis*.

El estudio histopatológico realizado a las muestras de hígado a las 24 horas post inyección (Figura 4 y 5) revelo tumefacción celular severa, células de Kupffer activadas y necrosis coagulativa focal, lo cual evidencia junto con las determinaciones enzimáticas que el veneno de ejemplares jóvenes de *Crotalus durissus cumanensis* produce un daño agudo al tejido hepático. En estudios similares Acosta de Pérez y col.¹⁵ en envenenamientos experimentales en ratas con serpientes adultas de *Crotalus durissus terrificus* observaron congestión y dilatación de los vasos sanguíneos grandes del tejido hepático, hemosiderina en los vasos periféricos. Teiber y col.¹⁶ en ratas Wistar encontraron en las biopsias hepáticas a las 9 horas de exposición con el veneno de *Bothrops alternatus* adultas, degeneración hidrópica difusa, comprometimiento de distintas aéreas del lobulillo, incluyendo zonas periportales mediozonales y centrololulillares; a las 24 horas la degeneración hidrópica fue de mayor intensidad, observándose menos grado de colestasis canalicular.

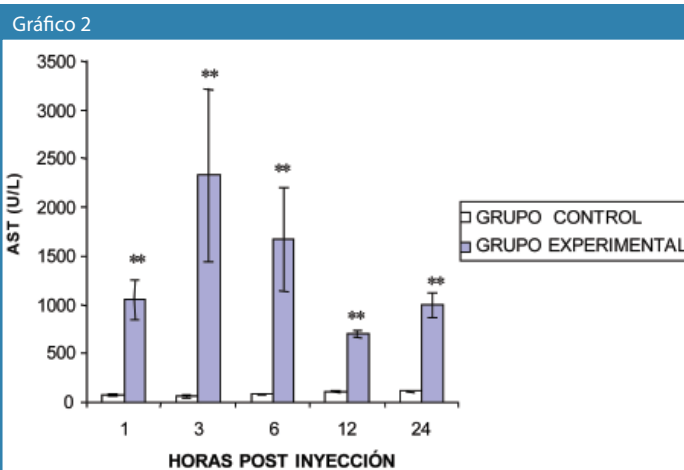
Se concluye que el veneno de ejemplares jóvenes de *Crotalus durissus cumanensis* induce el incremento de los niveles séricos de la enzimas: ALT con un valor máximo a las 24h, de AST a las 3h y de FA a las 24h post-inyección, lo cual asociado a las alteraciones histológicas encontradas, sugieren daño al tejido hepato-biliar.



Las barras representan la media \pm la desviación estándar, n = 5

** P<0,01

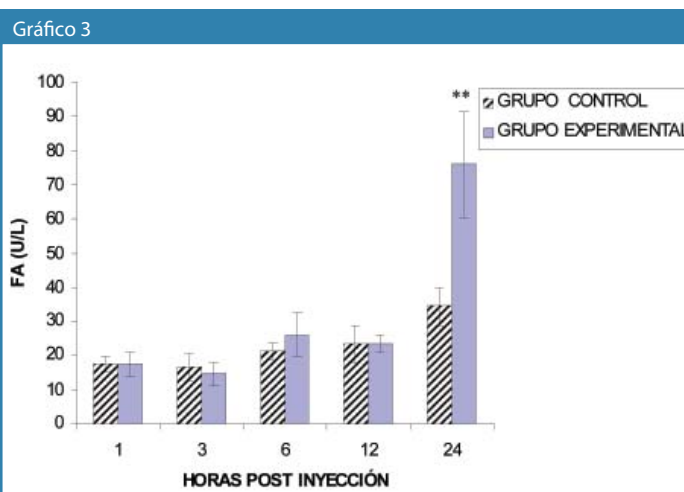
Niveles séricos de la enzima alt en ratones balb/c inoculados con 0,75 mg/kg de veneno de ejemplares jóvenes de *crotalus durissus cumanensis*



Las barras representan la media \pm la desviación estándar, n = 5

** P<0,01

Niveles séricos de la enzima ast (tgo) en ratones balb/c inoculados con 0,75 mg/kg de veneno de ejemplares jóvenes *crotalus durissus cumanensis*

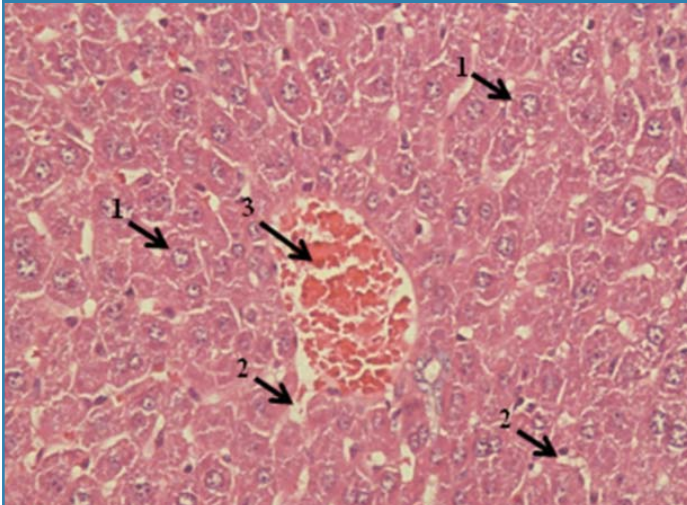


Las barras representan la media \pm la desviación estándar, n = 5

** P<0,01

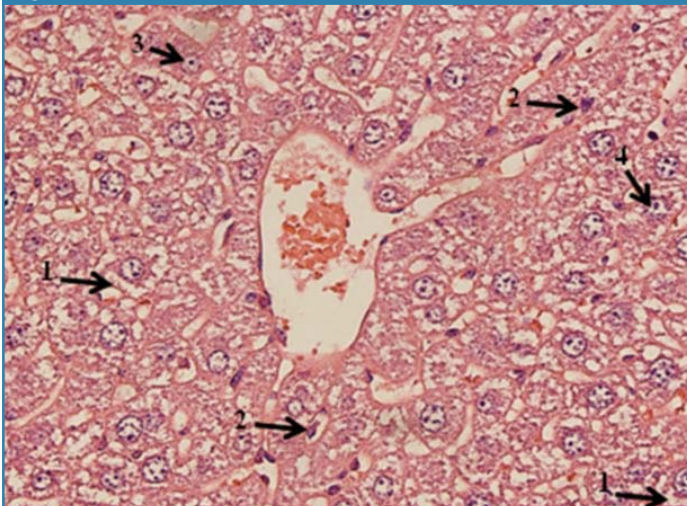
Niveles séricos de la enzima fa en ratones balb/c inoculados con 0,75 mg/kg de veneno de ejemplares jóvenes *crotalus durissus cumanensis*

Figura 4



Corte histológico de hígado de ratón Balb/C inoculados con NaCl 0,5%, a las 24 horas post inyección. Hepatocito (1); sinusoides (2) y vena central (3); H-E (40X).

Figura 5



Corte histológico de hígado de ratón Balb/C inoculado con 0,75 mg/kg de proteína de veneno de *Crotalus durissus cumanensis* a las 24 horas post inyección. Hepatocito tumefacto (1); célula de Kupffer (2); picnosis (3) y careorresis (4) indicativo de necrosis coagulativa focal (40x).

Agradecimientos:

Al Laboratorio de Histopatología Animal del Decanato de Ciencias Veterinarias-UCLA.

Este trabajo fue financiado por el Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico de la Universidad Centroccidental "Lisandro Alvarado", Proyectos N° 017-VE-2005.

Referencias

- Berger, B, Bhatti, A.R. Snake venom components and their cross-reactivity: a review. *Biochem Cell Biol* 1971; 67: 597-601.
- Bon, C. Snake venom & Pharmacopoeia. En: Bauchot, R.(1st ed). *Snake A natural history*. New York: Sterling Publ.1994.194-2093.
- Hoge, AR Preliminary account on neotropical Crotalinae (Serpentes: Viperidae). *Mem. Inst Butantan* 1965; 32: 109-184.
- Rosefeld, G, Kelen, EMA, Nudel, F. Hemolytic activities of animal venoms, classification in different types and activities. *Mem Inst Butantan* 1960; 30: 103-116.

- Cupo, P, Azevedo-Márquez, MM, Hering, SE. Acute myocardial infarction-like enzyme profile in human victims of *C.durissus terrificus* envenoming. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1990; 84:447-451.
- Jorge, MT, Ribeiro, LA Accidentes por serpentes peçonhentas do Brasil. *Rev Assoc Med Bras* 1990; 36:66-77.
- Vital, BO. Pharmacology of crystalline crotoxin II. Neuromuscular blocking action. *Mem Inst Butantan* 1966; 33:981-992.
- Feitosa, RFG, Melo, IMLA, Monteiro, HSA. Epidemiologia dos accidentes por serpentes no Estado do Ceará. *Rev Soc Bras Med Trop* 1997; 30: 295-301.
- Vital, BO, Franceschi, JP, Waishich, E. Pharmacology of crystalline crotoxin. *Tox Mem Inst Butantan*. 1966; 33:973-80.
- Vital, B O. Venenos ofídicos neurotóxicos. *Rev Ass Med Brasil* 1980; 26:212-218.
- Amaral, CFS, Resende, NA, Peroda, TGM. Afibrinogenemia secundaria a accidente ofídico crotálico. *Ver Ins Méd Trop* 1988; 30:288-92.
- Barraveira, B. Accidentes por serpentes do gênero *Crotalus*. *Arq Brás Méd* 1960; 64:14-20.
- Grillo, O, Scannone, H, Parra, N. Enzymatic activities and other characteristics of *Crotalus durissus cumanensis* venom. *Toxicon* 1974; 12: 297-302.
- Pirela, R, Lopéz-Jonsthor, JC, Hernández, J. Caracterización toxicológica del veneno total de la serpiente de cascabel *Crotalus durissus cumanensis* (Viperidae) presente en la localidad de Porshoure, Guajira Venezolana. *Rev Científ FCU-LUZ* 2006; 16 (3):232-238.
- Acosta de Pérez, O, Koscinczuk, P, Teibler, P, Ruiz, R, Sánchez, M, Maruñak, S, Mussart de Coppo, N. Intoxicación por veneno de *Crotalus durissus terrificus* (cascabel) en ratas. *Acta toxicol Argent* 1997; 5 (2):71-74.
- Teibler P, Acosta de Pérez O, Maruñak, S, Ruiz, R, Koscinczuk, P, Sánchez, N, Mussart de Coppo, N. Lesiones locales y sistémicas inducidas por veneno de *Bothrops alternatus* (víbora de la cruz) de Argentina *Acta toxicol Argent* 1999; 7 (1):7-10.
- Noriega-Alvarado, J, Colmenarez, D, Mogollón, A, Márquez, N, Hernández, V, Pérez, M. Cambios séricos en las enzimas ALT, AST, FA, CK-TOTAL, y LDH inducidas por el veneno de *Crotalus durissus cumanensis* en ratones Balb/C. *Rev Científ FCV-LUZ*. 2009; (4) 408-409.
- Lomonte, B, Gené, JA, Gutierrez, JM, Cerdas, L. Estudio comparativo de los venenos de serpiente cascabel (*Crotalus durissus durissus*) de ejemplares adultos y recién nacidos. *Toxicon* 1983; 23: 379-384.
- Gutierrez, JM., Dos Santos, MC., De Fatima-Furtado, M, Rojas G. Biochemical and Pharmacological similarities between the venoms of newborn *Crotalus durissus durissus terrificus* rattlesnake. *Toxicon* 1991; (29):10 1273-1277.
- Limdi, JK, Hyde, GM. Evaluación de las Pruebas de Función Hepática Anormales. *Postgraduate Medical Journal*. 2003; 79 (932):307-312.
- Nishimura, H, Yasaki, Y. Biochemical tests for diagnosis of acute myocardial infarction and stimulation of infarct size. *Nippon Rincho*. 1994; 52: 755-759.
- Kachmar, J, Moss D. Enzymes. En: Tietz, N.W. *Fundamentals of Clinical Chemistry*.2nd Ed. Philadelphia:W.B. Saunders Company. 1976. 652-682.
- De Sousa-E-Silva, MV, Tomy, SC, Tavares, FL, Navajas, L, Larson, MH, Lucas, SR, Kogica, MM, Sano-Martins, IS. Hematological, haemostatic and clinical chemistry disturbances induced by *Crotalus durissus terrificus* snake venom in dogs. *Hum Exp Toxicol* 2003; 22(9):491-500.
- Mirajkar, KK, More, S, Gadag, JR. Isolation and purification of a neurotoxin from *Bungarus caeruleus* (common Indian krait) venom: biochemical changes induced by the toxin in rats. *J basic Clin Physiol Pharmacol* 2005; 16(1):37-52.

Índice de autores 2010. Volumen 29

- Aguzzi A, 2010; 29(3): 44
Álvarez Yépez Carmen del Rosario, 2010; 29(4): 72
- Bandera Tirado, Juan Francisco, 2010; 29(2): 36
Barreto Seachoque B. 2010; 29(1): 6, 10
Brito Sara; 2010; 29(2): 20
- Capó de Paz B, Virginia, 2010; 29(2): 36
Contreras J., 2010; 29(1): 15
Coronado Raúl, 2010; 29(2): 26
- Chávez Guajardo Elsa Gabriela, 2010; 29(2): 29; 29(4): 60
- Fernández CM, 2010; 29(2): 32; 29(3): 55
- Garay José L.; 2010; 29(4): 66
García Francisco, 2010; 29(2): 26
González B. Gilberto Fleites, 2010; 29(2): 36
González Yibirín M., 2010; 29(1): 6, 10, 15
- Illnait MT, 2010; 29(2): 32; 29(3): 55
- Jerez Puebla LE, 2010; 29(2): 32; 29(3): 55
- Lares Mary, 2010; 29(2): 20
Latouche Orihana, 2010; 29(2): 26
Leal Luís, 2010; 29(2): 26
Lenin Cira; 2010; 29(2): 20
López H William J.; 2010; 29(4): 66
López Pedro, 2010; 29(2): 26
Loureiro D S Nelson E.. 2010; 29(4): 66
- Manfredi Roberto; 2010; 29(1): 1; 29(3): 44
Marín Barico Roberth Gabriel, 2010; 29(4): 72
Martínez A. María Rosarys, 2010; 29(2): 36
Martínez G. 2010; 29(2): 32; 29(3): 55
Mederos Cuervo. Lilian María, 2010; 29(2): 36
- Méndez G.; 2010; 29(1): 15
Mendoza José Antonio, 2010; 29(4): 72
Mogollón Saldivia Alexander A, 2010; 29(4): 72
Montoro Cardoso. Ernesto Hi; 2010; 29(2): 36
Morales Abelardo, 2010; 29(2): 26
Morales Vallarta Mario R., 2010; 29(2): 29; 29(4): 60
Moreno García, María A; 2010; 29(2): 29; 29(4): 60
Mosquera F Elis A.; 2010; 29(4): 66
Müller A., 2010; 29(1): 15
Muñoz E. José Jesús, 2010; 29(2): 29; 29(4): 60
- Noriega Alvarado José Rugby, 2010; 29(4): 72
- Octavio J; 2010; 29(1): 15
- Pérez Elevina, 2010; 29(2): 20
Pérez-Urrieta Mirleny del Carmen, 2010; 29(4): 72
Perurena MR, 2010; 29(2): 32; 29(3): 55
Portillo M.; 2010; 29(1): 15
- Reveles Hernández R. Gabriela. 2010; 29(2): 29; 29(4): 60
Ricco V. 2010; 29(3): 44
Rivero Luís, 2010; 29(2): 26
Rodríguez Carlos; 2010; 29(2): 26
Rodríguez I, 2010; 29(2): 32; 29(3): 55
- Salas Yaritza. 2010; 29(4): 72
Saldívar Elías Sergio J., 2010; 29(2): 29; 29(4): 60
Sánchez Marta, 2010; 29(2): 26
Schroeder Mily, 2010; 29(2): 20
Subiela H. José D.; 2010; 29(4): 66
- Valdés Alonso Lidunka, 2010; 29(2): 36
Valero Z; 2010; 29(1): 15
Virga C, 2010; 29(3): 44