

## Daños pulmonar y renal causado por el veneno de *Philodryas patagoniensis* en ratas

Peichoto, María E.<sup>1</sup> - Teibler, Pamela<sup>2</sup> - Guaimás Moya, Luz<sup>3</sup> - Leiva, Laura<sup>1</sup> - Acosta, Ofelia<sup>2</sup>

1. Cátedra de Química Biológica I, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales y Agrimensura, UNNE.  
 Av. Libertad 5470, Corrientes 3400, Argentina.
2. Cátedra de Farmacología, Facultad de Ciencias Veterinarias, UNNE.  
 Sargento Cabral 2139, Corrientes 3400, Argentina.
3. Cátedra de Patología Quirúrgica, Facultad de Ciencias Veterinarias, UNNE.  
 Sargento Cabral 2139, Corrientes 3400, Argentina.

### Antecedentes

*Philodryas patagoniensis* es una culebra opistoglifa con una glándula de Duvernoy bien desarrollada, que habita el nordeste argentino (Alvarez et al., 2002). Aunque son escasos los reportes de mordeduras en humanos por esta culebra (Nishioka and Silveira, 1994; Araújo and dos Santos, 1997), se sabe que la secreción de su glándula de Duvernoy posee una toxicidad suficiente como para producir daños locales severos, tales como: edema, hemorragia, mionecrosis y dermonecrosis (Acosta et al., 2003; Peichoto et al., 2004a). Al igual que en los casos de mordeduras por *P. olfersii*, los signos y síntomas locales producidos por mordeduras de *P. patagoniensis* pueden ser confundidos con los producidos por mordeduras de especies de *Bothrops* (yarárá), lo que es necesario evitar para impedir la aplicación del antiveneno específico, que podría desencadenar efectos perjudiciales sobre la salud del individuo (Nishioka and Silveira, 1994).

Se conoce poco sobre los efectos sistémicos causados por el veneno de *P. patagoniensis*. En trabajos previos (Peichoto et al., 2004b; Peichoto et al., 2005), demostramos que este veneno, al ser administrado por vía endovenosa, induce hemorragia pulmonar en ratones, y disminución del fibrinógeno plasmático de ratas. Teniendo en cuenta que se trata de una secreción cuya potencia letal - DL<sub>50</sub> 2.93 µg/g- (Acosta et al., 2003) es similar a la de especies de *Bothrops* (Acosta et al, 1998), es de interés ampliar el estudio de los efectos sistémicos potenciales de esta secreción. Para tal fin, en el presente trabajo se evaluaron las alteraciones histológicas en pulmón y riñón de ratas inoculadas por vía intravenosa con el veneno de *P. patagoniensis*.

### Materiales y Métodos

#### Veneno de *Philodryas patagoniensis*

Se obtuvo a partir de serpientes adultas (90 – 120 cm de longitud) mantenidas en cautiverio en el Serpentario del Zoológico de la ciudad de Corrientes.

La extracción del veneno se realizó introduciendo una micropipeta de 100 µl en cada colmillo, siguiendo el procedimiento de Ferlan et al. (1983). El veneno crudo fue desecado, homogeneizado y conservado a -20 °C. Para la realización de los ensayos, el veneno se disolvió en solución salina amortiguada con fosfato 0.1 M, pH 7.4 (PBS). La pequeña cantidad de material insoluble que pudo formarse se separó por centrifugación, obteniéndose un sobrenadante límpido que se destinó para los ensayos.

#### Animales de experimentación

Ratas macho Sprague-Dawley (220-270 g de peso corporal) fueron suministradas por el bioterio de la Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional del Nordeste.

#### Caracterización histológica de los daños pulmonar y renal inducidos por el veneno de *P. patagoniensis*

Se usó el método descrito por Assakura et al. (1994). Ratas macho adultas fueron anestesiadas con hidrato de cloral (300 mg/kg, por vía intraperitoneal). Cuatro ratas fueron inoculadas por vía intravenosa (i.v.) con cada una de las siguientes dosis: 0.23, 0.45 y 0.90 mg de veneno disuelto en 0.3 ml de PBS. Las dosis fueron elegidas de acuerdo a un cálculo estimativo de la cantidad de veneno que podría causar lesiones sin causar la muerte de los animales. Las ratas controles fueron inoculadas i.v. con 0.3 ml de PBS.

Después de 2 horas de administrado el veneno, las ratas fueron sacrificadas por sobredosis de anestesia. Muestras de pulmón y riñón fueron obtenidas por disección, fijadas en solución de Bouin durante 24-48 horas, procesadas con las técnicas clásicas de histopatología, y embebida en parafina. Secciones de 5 µm de espesor fueron cortadas con micrótopo y teñidas con hematoxilina-eosina (HE) para ser examinadas con microscopio óptico Olympus CH-2. Las muestras controles fueron procesadas de idéntica manera.

### Discusión de resultados

Dos horas después de la administración de 0.23, 0.45 y 0.90 mg de veneno de *P. patagoniensis*, se observó hemorragia en algunas áreas de los pulmones, evidenciada por la presencia de abundantes eritrocitos en el espacio alveolar (Fig. 1-A). Sin embargo, las muestras de pulmón controles mantuvieron una morfología normal (Fig. 1-B).

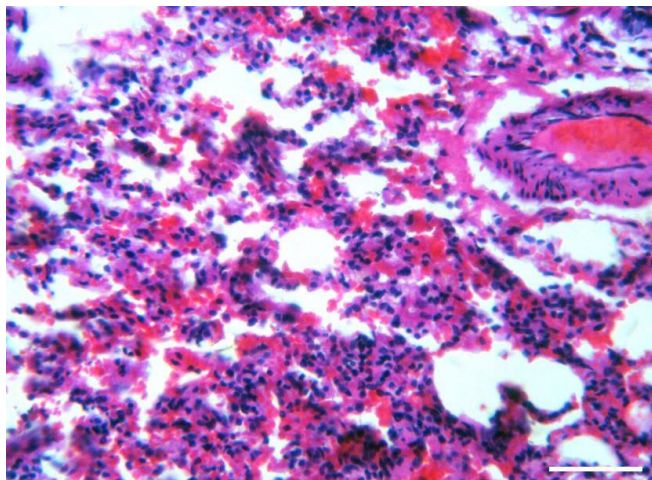
Estudios previos han demostrado que el veneno de *P. patagoniensis* posee actividad proteolítica prominente (Acosta et al., 2003). Por lo tanto, la capacidad de este veneno para inducir hemorragia sistémica depende de su potencia hemorrágica intrínseca, la cual muy probablemente depende de su capacidad para hidrolizar enlaces peptídicos de componentes de la lámina basal que son críticos para la estabilidad de esta matriz extracelular (Bjarnason and Fox, 1994; Baramova et al., 1990a, 1990b, 1991; Gutiérrez and Rucavado, 2000; Gutiérrez et al., 2005). Además, es probable que este veneno contenga proteinasas hemorrágicas que sean resistentes a la acción de inhibidores plasmáticos de proteinasas (macroglobulinas) (Baramova et al., 1990a, 1990b; Kamiguti et al., 1994; Anai et al., 1998; Gutiérrez et al., 2005), y por lo tanto sean las principales causantes de hemorragia sistémica. Esto último podrá ser dilucidado cuando se lleve a cabo la purificación y caracterización de los componentes del veneno de *Philodryas patagoniensis*.

También es importante tener en cuenta que el veneno de *P. patagoniensis* contiene enzimas fibrinogenolíticas que son capaces de producir *in vivo* una disminución del fibrinógeno plasmático de ratas (Peichoto et al., 2005). Aunque la actividad fibrinogenolítica no sería esencial para inducir hemorragia, se presume que esta actividad podría jugar un rol importante en la hemorragicidad de los venenos por impedir la formación del tapón hemostático (Markland, 1998; Gutiérrez and Rucavado, 2000).

En riñón se observó intensa congestión vascular peritubular y dilatación tubular (Fig. 2-A) luego de dos horas de la administración de 0.23, 0.45 y 0.90 mg de veneno de *P. patagoniensis*. Sin embargo, no se observaron manifestaciones hemorrágicas con ninguna de las dosis empleadas. Las muestras de riñón controles mantuvieron una morfología normal (Fig. 2-B).

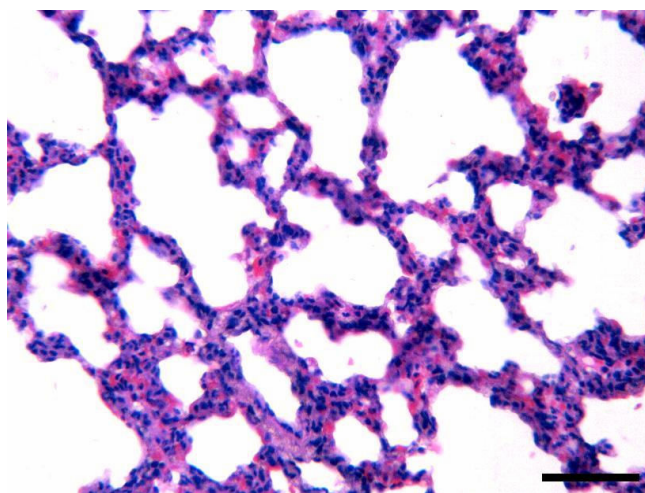
Es importante hacer resaltar que pacientes mordidos por especies de *Bothrops* comúnmente presentan hemorragia tanto en pulmones como en túbulos renales (además de otros órganos) (Efrati, 1979). Por lo tanto, el conocimiento de las complicaciones sistémicas causadas por la mordedura de *P. patagoniensis*, permitirá diferenciarlo del envenenamiento bothrópico, lo que propiciará tratamientos más eficaces para los pacientes accidentados.

**A**

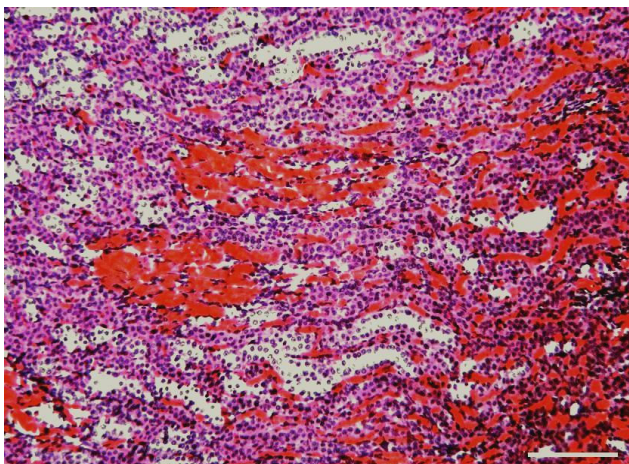


**Figura 1.** Pulmón de rata: **A-** 2 horas después de la inoculación i.v. de 0.90 mg de veneno de *P. patagoniensis*: se observa extravasación de eritrocitos en algunos espacios alveolares; **B-** control. HE. Barra de escala: 50  $\mu$ m.

**B**

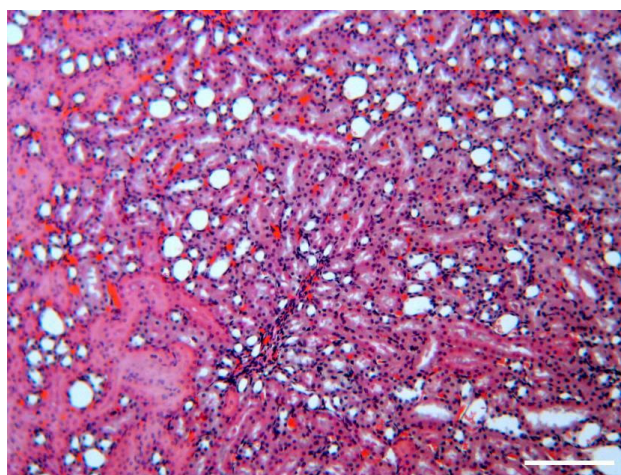


A



**Figura 2.** Riñón de rata: **A-** 2 horas después de la inoculación i.v. de 0.90 mg de veneno de *P. patagoniensis*: se observa congestión vascular peritubular y dilatación tubular; **B-** control. HE. Barra de escala: 100  $\mu$ m.

B



### Conclusiones

Los resultados de este trabajo permiten concluir que el veneno de *Philodryas patagoniensis* induce alteraciones patológicas en pulmón y riñón de ratas, luego de ser administrado por vía intravenosa. Estas alteraciones aparecen en una etapa temprana, pudiendo causar disturbios funcionales de los órganos implicados. Dependiendo de la severidad del caso, estos disturbios pueden conducir a la muerte del animal. De otro modo, estas lesiones pueden conducir a secuelas transitorias y/o permanentes.

### Bibliografía

- Acosta de Pérez, O; Koscienczuk, P.; Teibler, P.; Sánchez Negrette, M.; Ruiz, R. y Bogarín G. Actividades hemorrágica y edematizante y alteraciones histológicas en almohadilla plantar del ratón inducidas por venenos de serpientes de los géneros *Bothrops* y *Crotalus* de Argentina. *Toxicon* 36, 8, 1165-1172, 1998.
- Acosta, O.; Leiva, L.C.; Peichoto, M.E.; Maruñak, S.; Teibler, P.; Rey, L. Hemorrhagic activity of Duvernoy's gland secretion of the xenodontine colubrid *Philodryas patagoniensis* from the north-east region of Argentina. *Toxicon* 41, 1007-1012, 2003.
- Alvarez, B.; Aguirre, R.; Céspedes, J.; Hernando, A.; Tedesco, M; Orfeo, O. Atlas de anfibios y reptiles de las provincias de Corrientes, Chaco y Formosa. FaCENA. Editorial de la UNNE, 2002.
- Anai, K.; Sugiki, M.; Yoshida, E.; Maruyama, M. Inhibition of a snake venom hemorrhagic metalloproteinase by human and rat macroglobulins. *Toxicon* 36, 1127-139, 1998.
- Araújo, M.E.; dos Santos, A.C. Cases of human envenoming caused by *Philodryas olfersii* and *Philodryas patagoniensis* (Serpentes: Colubridae). *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 30, 517-519, 1997.
- Assakura, M.T.; Reichl, A.P.; Mandelbaum, F.R. Isolation and characterization of five fibrin(ogen)olytic enzymes from the venom of *Philodryas olfersii* (green snake). *Toxicon* 32, 819-831, 1994.
- Baramova, E.N.; Shannon, J.D.; Bjarnason, J.B.; Fox, J.W. Identification of the cleavage sites by a hemorrhagic metalloproteinase in type IV collagen. *Matrix* 10, 91-97, 1990a.
- Baramova, E.N.; Shannon, J.D.; Bjarnason, J.B.; Gonias, S.L.; Fox, J.W. Interaction of hemorrhagic metalloproteinase with human  $\alpha$ 2-macroglobulin. *Biochemistry* 29, 1069-1074, 1990b.



**UNIVERSIDAD NACIONAL DEL NORDESTE**  
**Comunicaciones Científicas y Tecnológicas 2005**

---

- Baramova, E.N.; Shannon, J.D.; Fox, J.W.; Bjarnason, J.B. Proteolytic digestion of non-collagenous basement membrane proteins by the hemorrhagic metalloproteinase Ht-e from *Crotalus atrox* venom. *Biomed. Biochim. Acta* 4-6, 763-768, 1991.
- Bjarnason, J.B., Fox, J.W. Hemorrhagic metalloproteinases from snake venoms. *Pharmacol. Ther.* 62, 325-372, 1994.
- Efrati, P. Symptomatology, Pathology and Treatment of the Bites of Viperid Snakes. In: Lee, C.-Y. (Ed.), *Handbook of Experimental Pharmacology*, vol. 52. Springer, Berlin, pp. 956-977, 1979.
- Ferlan, I.; Ferlan, A.; King, T.; Russel, F. E. Preliminary studies on the venom of the colubrid snake *Rhabdophis subminiatus* (red-necked keelback). *Toxicon* 21, 570-574, 1983.
- Gutiérrez, J.M.; Rucavado, A. Snake venom metalloproteinases: Their role in the pathogenesis of local tissue damage. *Biochimie* 82, 841-850, 2000.
- Gutiérrez, J.M.; Rucavado, A.; Escalante, T.; Díaz, C. Hemorrhage induced by snake venom metalloproteinases: biochemical and biophysical mechanism involved in microvessel damage. *Toxicon* 45, 997-1011, 2005.
- Kamiguti, A.S.; Desmond, H.P.; Theakston, R.D.G.; Hay, C.R.M.; Zuzel, M. Ineffectiveness of the inhibition of the main haemorrhagic metalloproteinase from *Bothrops jararaca* venom by its only plasma inhibitor,  $\alpha$ 2-macroglobulin. *Biochim. Biophys. Acta* 1200, 307-314, 1994.
- Markland, F.S. Snake venoms and the hemostatic system. *Toxicon* 36, 1749-1800, 1998.
- Nishioka, S.deA.; Silveira, P.V.P. *Philodryas patagoniensis* bite and local envenoming. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo* 36, 279-281, 1994.
- Peichoto, M.E.; Acosta, O.; Leiva, L.; Teibler, P.; Maruñak, S.; Ruíz, R. Muscle and skin necrotizing and edema-forming activities of Duvernoy's gland secretion of the xenodontine colubrid *Philodryas patagoniensis* from the north-east of Argentina. *Toxicon* 44, 589-596, 2004a.
- Peichoto, M.E.; Teibler, P.; Leiva, L.C.; Guaimás Moya, L.E.; Acosta, O. Actividad hemorrágica sistémica inducida por el veneno de *Philodryas patagoniensis* del nordeste argentino. *Comunicaciones científicas y tecnológicas 2004 – Universidad Nacional del Nordeste (Resistencia-Chaco)*. <http://www.unne.edu.ar/Web/cyt/com2004/8-Exactas/E-048.pdf>, 2004b.
- Peichoto, M.E.; Leiva, L.; Guaimás Moya, L.E.; Rey, L.; Acosta, O. Duvernoy's gland secretion of *Philodryas patagoniensis* from the northeast of Argentina: its effects on blood coagulation. *Toxicon* 45, 527-534, 2005.