

UNIVERSIDAD DE COSTA RICA
SISTEMA DE ESTUDIOS DE POSGRADO

ALTERACIONES TEMPRANAS INDUCIDAS POR EL VENENO DE
TERCIOPELO, *Bothrops asper* (Serpentes: Crotalidae), EN LA
MICROVASCULATURA DEL MUSCULO ESQUELETICO MURINO

Tesis sometida a la consideración del Programa de
Estudios de Posgrado en Biología para optar por el grado
de *Magister Scientiae*

LISELA MOREIRA CARMONA

CIUDAD UNIVERSITARIA "RODRIGO FACIO"
SAN JOSE, COSTA RICA

1996

Agradecimientos:

Al Dr. José María Gutiérrez, guía de este trabajo y sin cuya colaboración no se hubiera concretado, gracias por su atenta disposición para mis consultas y la amistad brindada.

Al M.Sc. Francisco Hernández, por la amistad, el apoyo de siempre y su invaluable colaboración en la revisión de los borradores.

Al M.Sc. Rafael Acuña Mesén, por la confianza y amistad brindada, por la colaboración y apoyo en la fase final de este trabajo.

Al Sr. Javier Nuñez, por su amistad y por su colaboración con la toma y procesamiento de las muestras.

A la M.Sc. Sonia Hernández y a la Dra. Virginia Solís por su amistad y guía en el inicio de mis estudios de posgrado.

A la Dra. Guisselle Mora y a la M.Sc. Jollyanna Malavasi, por su ayuda para resolver los problemas que se presentaron días antes de la presentación oral.

A cada uno de mis ex-compañeros de trabajo y amigos en la Unidad de Microscopía Electrónica, por su apoyo y cariño brindado.

Al personal del bioterio, secretaria y grupo de investigación del Instituto Clodomiro Picado por su amabilidad, colaboración y atenta disposición en todo momento.

A los compañeros del CIBCM por su amistad y palabras de apoyo, cuando las necesitaba, en especial a Reynaldo, Melanie, William y a doña Carmen, por "empujarme" a terminar y permitirme el tiempo que he necesitado.

A las amigas que de una u otra forma me brindaron su ayuda: Gaby Dolz, María de los Angeles Villalobos y Ethel Sánchez.

A William por el apoyo y colaboración, de igual manera a su bella familia por las palabras de apoyo.

A mis padres, Miryam y Danilo, a quienes dedico este trabajo y doy infinitas gracias por su amor y apoyo.

Esta tesis fue aceptada por la Comisión del Programa de Estudios de Posgrado en Biología de la Universidad de Costa Rica, como requisito parcial para optar al grado de *Magister Scientiae*.



Dra. Guisselle Mora,
Representante de la Decana del Sistema
de Estudios de Posgrado



Dr. Bruno Lomonte V.,
Representante de la Directora a.i. del
Programa de Estudios de Posgrado en Biología



Dr. José María Gutiérrez G., Director



M.Sc. Francisco Hernández Ch., Asesor



M.Sc. Rafael Acuña M., Asesor



Lisela Moreira Carmona, Candidata

INDICE

	Página	
Portada	i	
Agradecimientos	ii	
Hoja de Aprobación	iv	
Indice	v	
Resumen	vii	
Lista de Cuadros	ix	
Lista de Figuras	x	
Lista de Abreviaturas	xv	
CAPITULO I	INTRODUCCION	1
CAPITULO II	ANTECEDENTES	
2.1.	Los venenos de serpientes y sus efectos biológicos	4
2.1.2.	Composición de los venenos	4
2.2.	Hemorraginas	9
2.2.2.	Hemorraginas del género <i>Bothrops</i>	10
2.2.3.	Hemorraginas aisladas de <i>Bothrops asper</i>	11
2.3.1.	Efectos sobre el endotelio inducidos <i>in vivo</i> por veneno crudo	14
2.3.2.	Efectos sobre el endotelio inducidos <i>in vivo</i> por hemorraginas	15
2.3.3.	Efectos de las hemorraginas sobre los componentes de la matriz extracelular	16
CAPITULO III	MATERIALES Y METODOS	
3.1.	Veneno crudo	19
3.2.	Hemorragina BaH-1	19
3.3.	Control	20

CAPITULO IV	RESULTADOS	
4.1.	Observaciones en la microvasculatura de los músculos control	21
4.2.	Observaciones en la microvasculatura de los músculos inyectados con veneno crudo	21
4.3.	Observaciones en la microvasculatura de los músculos inyectados con BaH-1	26
CAPITULO V	DISCUSION	55
CAPITULO VI	CONCLUSIONES	66
	BIBLIOGRAFIA	70

RESUMEN

La *Bothrops asper* (Serpentes: Crotalidae), conocida como terciopelo, rabo o barba amarilla, entre otros, es en Costa Rica y en el resto de Centroamérica, la especie de serpiente venenosa asociada con mayor frecuencia a accidentes ofídicos. El veneno de esta especie induce el desarrollo rápido de inflamación y hemorragia acompañado de dolor intenso y necrosis tisular alrededor del sitio de la mordedura. Estos efectos pueden difundir a toda la extremidad involucrada y en los casos más severos desarrollarse en forma sistémica afectando órganos vitales. El suministro rápido del suero antiofídico favorece el pronóstico, sin embargo, la hemorragia se neutraliza sólo en forma parcial, provocando daños que impiden la adecuada regeneración de la extremidad involucrada lo cual lleva a pérdida funcional.

Buscando la forma de comprender los mecanismos y los agentes involucrados en la generación de la hemorragia, para con ello aumentar en el suero antiofídico algunos factores que puedan disminuirla, se inició por parte del Instituto Clodomiro Picado en colaboración con el Departamento de Zoología de la Universidad de Tel-Aviv, el estudio de los componentes hemorrágicos en el veneno de este ofidio. Sin embargo se hace necesario conocer las alteraciones ultraestructurales en la microvasculatura generadas por el veneno completo para compararlas con aquellas inducidas por las hemorraginas purificadas. Con este fin, se inyectó una dosis individual de 50 μg de veneno crudo de *B. asper* en el músculo gastronemio de ratones de la cepa Swiss-Webster, a las muestras control se les inyectó solución salina. Para reconocer las alteraciones inducidas a diferentes intervalos de tiempo, los ratones fueron sacrificados mediante dislocación cervical a diferentes intervalos de tiempo posteriores a la inyección del veneno. Los músculos fueron disecados de inmediato al sacrificio y procesados para microscopía electrónica de transmisión. Por otra parte otro grupo de ratones se sometió a una dosis individual de 10 μg de la hemorragina purificada BaH-1 y se procedió a la inyección, sacrificio, toma y procesamiento de la muestra bajo el mismo protocolo seguido en el caso de los ratones inyectados con veneno crudo de *B. asper*, variando solamente el tiempo de sacrificio para la toma de muestras.

Los músculos empleados como controles mostraron aspecto y arquitectura normal. Los espacios extravasculares se encontraron libres de agregados, precipitados, sin presencia de eritrocitos u otras células que evidenciaran hemorragia o procesos inflamatorios. La microvasculatura también mostró características normales. El lumen de la misma se observó libre de fibrina, plaquetas o congestión eritrocítica

Al comparar las alteraciones inducidas por el veneno crudo y la hemorragina BaH-1 se encontró que en ambos casos se produjo disminución y hasta ausencia de las vesículas plasmalemales, alteración de las organelas citoplasmáticas y de la lámina basal. Además, la generación de un patrón de ampollas o "blebbing" de la membrana celular hacia el lumen de la microvasculatura. Se observaron dos patrones degenerativos ya fuera como edema o adelgazamiento del endotelio. También apertura de brechas en la continuidad de la microvasculatura pero no de las uniones intercelulares. Fue común en ambos tratamientos la presencia de trombos plaquetarios, fibrina y congestión eritrocítica en el lumen de la microvasculatura, así como la extravasación de eritrocitos a través de las brechas abiertas en el endotelio.

Lista de Cuadros

Cuadro	Título	página
1	Propiedades de las toxinas hemorrágicas de venenos de algunas especies del género <i>Bothrops</i> .	12
2	Propiedades de las toxinas hemorrágicas aisladas del veneno de <i>Bothrops asper</i> .	13
3	Efectos observados en el endotelio de la microvasculatura del músculo gastronemio murino, posterior a la inyección de 50 µg de veneno crudo de terciopelo (<i>Bothrops asper</i>).	23
4	Hallazgos en el lumen de la microvasculatura y en el espacio extravascular del músculo gastronemio murino, inyectado con 50 µg de veneno crudo de terciopelo (<i>Bothrops asper</i>).	24
5	Efectos observados en el endotelio de la microvasculatura del músculo gastronemio murino, posterior a la inyección de 10 µg de la hemorragina BaH-1.	27
6	Hallazgos en el lumen de la microvasculatura y espacio extravascular del músculo gastronemio murino, inyectado con 10µg de hemorragina BaH-1.	28

Lista de Figuras

Figura	Título	página
1	Porción de músculo esquelético murino inyectado con solución salina.	31
2	Capilar muscular murino expuesto a solución salina.	31
3	Alteración de las organelas del endotelio microvascular, 5 minutos posteriores a la inyección de veneno de <i>B. asper</i> .	32
4	Capilar de músculo murino, 5 minutos de exposición al veneno de <i>B. asper</i> .	32
5	Formación de proyecciones ("gemaciones") en el endotelio de los microvasos expuestos al veneno crudo de <i>B. asper</i> .	33
6	Microvaso de músculo inyectado con veneno crudo de terciopelo, mostrando avanzado el evento de la "gemación".	33
7	Microvaso de músculo inyectado con veneno crudo de <i>B. asper</i> , con "gemación" avanzada.	34
8	Adelgazamiento y electrodensidad pronunciada del endotelio capilar, alteración de organelas y ausencia de lámina basal.	35
9	Patrón de degeneración frecuente en los microvasos del músculo inyectado con veneno crudo de <i>B. asper</i> .	36
10	Patrón de degeneración de los microvasos, algunas de las células endoteliales se muestran difusas.	36

11	Patrón de degeneración difuso homogéneo, observado con frecuencia en los microvasos expuestos al veneno crudo de <i>B. asper</i> .	37
12	Patrón de degeneración observado en la microvasculatura expuesta al veneno de <i>B. asper</i> .	37
13	Presencia de fibrina en el lumen de la microvasculatura muscular al exponerse al veneno crudo de <i>B. asper</i> .	38
14	Presencia de fibrina en el espacio intersticial muscular al exponerse al veneno de <i>B. asper</i> .	38
15	Presencia de agregados de "pequeñas vesículas" en los microvasos de músculo expuesto al veneno crudo de <i>B. asper</i> .	39
16	Agregados de plaquetas en los microvasos expuestos al veneno crudo de <i>B. asper</i> .	39
17	Presencia de eritrocitos extravasados, 5 minutos de exposición al veneno de <i>B. asper</i> .	40
18	Presencia de eritrocitos extravasados, 15 minutos de exposición al veneno de <i>B. asper</i> .	40
19	Presencia de eritrocitos extravasados y alteraciones de las fibras musculares, 30 minutos de exposición al veneno crudo de <i>B. asper</i> .	40
20	Hemorragia generalizada y presencia de leucocitos en intersticios al exponerse al veneno de <i>B. asper</i> .	40
21	Estructuras en forma de anillo en microvasos de músculo murino expuestos a la hemorragina BaH-1.	41

22	Prolongaciones del endotelio, originando estructuras anulares, en la microvasculatura murina expuesta a la BaH-1.	41
23	Estructuras en forma de anillo libres en el lumen de los microvasos expuestos a la hemorragina BaH-1.	41
24	Aspecto fenestrado en el endotelio de la microvasculatura de músculo inyectado con BaH-1.	42
25	Desanclaje del endotelio producto del edema subendotelial en los microvasos de músculos expuestos a la BaH-1.	43
26	Edema subendotelial y desanclaje del endotelio en microvasos expuestos a la hemorragina BaH-1.	43
27	Desanclaje del endotelio de la lámina basal al exponerse a la hemorragina BaH-1.	43
28	Dilatación de una de las células endoteliales que conforman el microvaso y retención de las uniones intercelulares, al exponerse a la hemorragina BaH-1.	44
29	Dilatación de las células endoteliales y retención de las uniones celulares en microvasos expuestos a la BaH-1.	44
30	Dilatación de las células endoteliales y retención de las uniones intercelulares en microvasos expuestos a la hemorragina BaH-1.	44
31	Heterogeneidad de respuesta de las células endoteliales que conforman el microvaso luego de la exposición a la BaH-1.	45
32	Heterogeneidad de respuesta de las células endoteliales que conforman el microvaso luego de la exposición a la BaH-1.	45

33	Heterogeneidad de respuesta de las células endoteliales a la hemorragia BaH-1	46
34	Unión intercelular de microvaso de músculo inyectado con la BaH-1.	47
35	Unión intercelular de microvaso de músculo expuesto a la BaH-1.	47
36	Uniones intercelulares de los microvasos de músculo inyectado con la BaH-1	47
37	Picnosis nuclear y espacio perinuclear dilatado en endotelio microvascular expuesto a la BaH-1.	48
38	Alteraciones nucleares en el endotelio de los microvasos expuestos a la BaH-1.	48
39	Aspecto de la membrana celular, las vesículas plasmalemales y el retículo endoplásmico del endotelio expuesto a BaH-1.	48
40	Condensación de los eritrocitos en los microvasos luego de la exposición muscular a la BaH-1.	49
41	Condensación y extravasación de los eritrocitos en microvasos de músculo expuesto a la BaH-1.	49
42	Condensación y extravasación de los eritrocitos de los microvasos al exponer el músculo a la BaH-1.	49
43	Condensación y extravasación de eritrocitos de los microvasos de músculo expuesto a la BaH-1.	49
44	Plaquetas formando trombos en los microvasos expuestos a la BaH-1.	50

45	Trombo plaquetario adherido a endotelio roto en microvasos expuestos a la BaH-1.	50
46	Trombo de plaquetas y fibrina formando tapón para mantener la pared en los microvasos expuestos a la BaH-1.	50
47	Trombo plaquetario taponeando brechas creadas en el endotelio en los microvasos expuestos a la BaH-1.	50
48	Presencia de fibrina en el lumen de la microvasculatura en músculo expuesto a la hemorragia BaH-1.	51
49	Presencia de fibrina en el intersticio en músculo expuesto a la hemorragia BaH-1.	51
50	Eritrocitos empujando porciones de restos celulares en microvasos.	52
51	Eritrocitos migrando entre las células que componen la pared del vaso.	53

Lista de Abreviaturas

ADN	ácido desoxiribonucleico
Ala	alanina
AMP	adenosina monofosfato
ATP	adenosina trifosfato
<i>B. asper</i>	<i>Bothrops asper</i>
BaH-1	hemorragina 1 de <i>B. asper</i>
BaP-1	proteasa 1 de <i>B. asper</i>
BH-2	hemorragina 2 de <i>B. asper</i>
BH-3	hemorragina 3 de <i>B. asper</i>
C	colágeno
<i>C. atrox</i>	<i>Crotalus atrox</i>
Ca ⁺²	calcio catiónico
[Ca ⁺²] _i	concentración intracelular de calcio catiónico
CE	célula endotelial
C I	colágeno I
C II	colágeno II
C III	colágeno III
C IV	colágeno IV
C V	colágeno V
Cl-	cloruro
EDTA	etilen diamino tetra-acetato de sodio
EPN	espacio perinuclear
Fe ⁺²	hierro catiónico
Fig. (s)	figura (s)
g	gramos
His	histeína
Hr	hora (s)
kD	kilodaltons
kV	kilovoltios
LB	lámina basal
Leu	leucina
LPS	lipo-polisacárido
M	molar

<i>M. musculus</i>	<i>Mus musculus</i>
M.H.D.	dosis mínima hemorrágica
MB	membrana basal
ME	microscopio electrónico
MEC	matriz extracelular
MET	microscopia (o) electrónica (o) de transmisión
min	minuto (s)
ML	microscopio de luz
NaCl	cloruro de sodio
ng	nanogramos
OsO ₄	tetraóxido de osmio
PAF	factor activante de las plaquetas
PC	poscapilar
Phe	fenilalanina
PLA ₂	fosfolipasas A ₂
RE	retículo endotelial
<i>T. flavoviridis</i>	<i>Trimeresurus flavoviridis</i>
TIMPs	inhibidores tisulares de las metaloproteasas
Tyr	tirosina
UI (s)	unión (es) intercelular (es)
VEGF	factor de crecimiento del endotelio vascular
VPs	vesículas plasmalemales
vs	versus
Zn ⁺²	zinc catiónico
µg	microgramos

CAPITULO I

INTRODUCCION

La mayoría de mordeduras de serpiente en Centroamérica son causadas por miembros de la familia Crotalidae. Dentro de este grupo *Bothrops asper* (Serpentes: Crotalidae) conocida localmente como "terciopelo", "barba amarilla" o "rabo amarillo", es responsable de más del 50% de los accidentes ofídicos y casi el 90% de las defunciones, en los casos en que se logra identificar la especie involucrada en el accidente. Se le encuentra desde el sur de Tamaulipas en México hasta la provincia de Misiones en la Argentina. Es el crotárido del área centroamericana que produce más veneno; según Bolaños (1984) es posible recuperar una cantidad de veneno equivalente a un peso seco (liofilizado) promedio de 458 mg, con un máximo de 1530 mg, en ejemplares recién capturados.

Una de las consecuencias más dramáticas del envenenamiento por *Bothrops asper*, así como por las otras especies de las familias Crotalidae y Viperidae, es la hemorragia causada por algunos factores del veneno (Bjarnason y Fox 1988/1989, Imai *et al.* 1989). En aquellos casos en donde el envenenamiento no es muy severo la hemorragia generalmente se localiza en el sitio de la mordedura. La hemorragia es un problema de difícil manejo debido a que se desarrolla rápidamente después de la inyección del veneno y es responsable de pérdida sanguínea importante, acarreado problemas de irrigación al tejido muscular (Bjarnason y Fox 1988/1989). El daño a la microvasculatura por toxinas hemorrágicas afecta el proceso regenerativo del músculo, dado que un adecuado suministro sanguíneo, que asegure nutrientes y el intercambio gaseoso, es requisito básico para la regeneración muscular (Arce *et al.* 1991). La pérdida de la microvasculatura puede llevar a secuelas como pérdida tisular o amputación (Bjarnason y Fox 1988/1989) y la hemorragia puede abarcar áreas considerables en la extremidad involucrada. En los casos de envenenamiento severo puede desarrollarse hemorragia en órganos vitales, tales como corazón, pulmones, riñones y cerebro (Ownby 1975, Bjarnason y Fox 1988/1989). Se considera que los principales factores responsables son las toxinas hemorrágicas, cuyo efecto se suma al de otros factores del veneno, como proteasas o inhibidores de la coagulación y enzimas que liberan quininas del quinínogeno.

Los vasos sanguíneos pequeños son particularmente susceptibles a los efectos del veneno, resultando en una alteración de la permeabilidad cuya consecuencia es el escape del plasma y eritrocitos al tejido que rodea los capilares, produciendo equimosis, cianosis y el edema característicos en los accidentes ofídicos (Bjarnason y Fox 1988/1989).

El efecto mionecrótico inducido por los venenos de algunos crotálicos ha sido estudiado (Gutiérrez *et al.* 1980, Gutiérrez y Chaves 1980, Arroyo y Gutiérrez 1981, Arroyo y Cerdas 1984, Arce *et al.* 1991), también se ha estudiado el efecto de algunas fracciones aisladas y caracterizadas de estos venenos (Oshima *et al.* 1972, Fabiano y Tu 1981, Xu *et al.* 1981, Gleason *et al.* 1983, Gutiérrez *et al.* 1984, 1991; Queiroz *et al.* 1985, Mori *et al.* 1987). Otros estudios han intentado determinar el mecanismo inductor de la hemorragia y la patogénesis inducida sobre los vasos sanguíneos por los venenos crudos (Ownby *et al.* 1974, Ownby 1975, Gutiérrez *et al.* 1980) o por fracciones particulares de éstos (Ownby *et al.* 1978, Ownby y Geren 1987, Ownby *et al.* 1990). Sin embargo, aún no se conoce el mecanismo productor de la hemorragia en los accidentes ofídicos con *Bothrops asper*.

El antiveneno polivalente producido en el Instituto Clodomiro Picado (ICP) de la Universidad de Costa Rica, usado como medida terapéutica básica para el tratamiento del envenenamiento por mordeduras de serpientes crotálicas, neutraliza sólo parcialmente la actividad hemorrágica local, aún cuando el antiveneno se suministre en forma inmediata al individuo accidentado (Gutiérrez *et al.* 1981). Esta es una de las razones por lo que es necesario entender la naturaleza y mecanismo de acción del veneno crudo y de las hemorraginas purificadas de *B. asper*.

Las investigaciones en la actualidad se orientan al aislamiento de los factores responsables de los daños más severos, para utilizarlos en la producción de sueros más eficaces, capaces de contrarrestar esos efectos, como lo es el daño a la microvasculatura, ya que de ello depende la regeneración del músculo afectado. Al disminuir las alteraciones al endotelio vascular se espera menor daño tisular y por tanto mejor regeneración del músculo esquelético (Dr. JM Gutiérrez, comunicación personal). Para identificar ultraestructuralmente el efecto de esos nuevos factores con los que podría, en el futuro, desarrollarse sueros más

eficientes, primero debe conocerse el desarrollo de la hemorragia inducida por envenenamiento con el veneno crudo de esta especie. Los resultados de esta investigación podrán emplearse como parámetro para conocer los efectos sobre las células endoteliales que inducen las hemorragias purificadas de *Bothrops asper*, así como el veneno crudo.

CAPITULO II

ANTECEDENTES

2.1. Los venenos de serpientes y sus efectos biológicos

Los venenos de los animales, hablando en términos generales, surgieron evolutivamente como mecanismos de defensa o alimenticio. Algunos grupos de serpientes, así como otros vertebrados (anfibios principalmente) y algunos artrópodos, adquirieron con el paso de la evolución una mezcla compleja de sustancias para su defensa, alimentación o ambos. Se desarrollaron además las estructuras especiales para la producción y almacenamiento de las sustancias y el modo de “inyectar” estas sustancias a sus agresores o a su presa. En el caso de las serpientes se desarrollaron glándulas especiales para la producción y almacenamiento de los venenos y la modificación del par superior de colmillos para la inyección de éstas a sus presas o bien a sus agresores. Además, de su papel en la digestión de la presa, los componentes de la mezcla (conocida como veneno) inducen varios efectos farmacológicos, entre ellos hemorrágicos, procoagulantes, anticoagulantes y neurotóxicos (Kini y Evans 1990, 1992), los cuales funcionan como defensa ante los posibles agresores, o permiten la retención de la presa.

2.1.2. Composición de los venenos

Los venenos de serpientes se encuentran constituidos por una mezcla compleja de componentes orgánicos e inorgánicos. Del 70 al 90% de su peso seco corresponde a proteínas y polipéptidos farmacológicamente activos, responsables de la mayoría de los efectos del veneno y de su característica viscosidad alta. El resto de los componentes (10 a 30%) lo constituyen sustancias orgánicas de bajo peso molecular como carbohidratos, lípidos (principalmente fosfolípidos), péptidos pequeños, aminoácidos, aminas biogénicas y nucleótidos (Tu 1983, Bolaños 1984). Aproximadamente el 5% del peso seco de los venenos son carbohidratos. La mayor parte de los carbohidratos (90% ó más) se encuentran formando parte de glicoproteínas y solamente una pequeña porción puede clasificarse como carbohidratos libres. Un número considerable de aminoácidos libres ha sido encontrado en diversos venenos aunque en concentraciones bajas;

su papel biológico se desconoce pero probablemente potencian los efectos farmacológicos de otros constituyentes del veneno (Tu 1983, Bolaños 1984).

Compuestos inorgánicos, tanto aniónicos como catiónicos también se encuentran en los venenos crudos de serpientes. Se ha informado de la presencia de elementos como sodio, potasio, magnesio, calcio, zinc, manganeso, hierro, cobre y fósforo en diferentes venenos. No todos éstos son encontrados en cada tipo de veneno y la cantidad de cada uno varía según la especie de serpiente. El sodio (Na^+) es el que se encuentra en mayor proporción, mientras que el hierro (Fe^{+2}) sólo se demuestra ocasionalmente y en baja concentración. El papel biológico de todos estos elementos no ha sido determinado, es probable que algunos de ellos sean importantes para la estabilización de algunas proteínas del veneno, mientras que otros podrían actuar como catalíticos para ciertas reacciones enzimáticas. En el caso de las proteasas que dependen de iones metálicos para su actividad enzimática, los cationes de calcio y de zinc son los identificados con más frecuencia fluctuando el contenido entre uno y dos moles de catión por mol de la enzima (Tu 1983, Bolaños 1984).

Algunas aminos biogénicas que se encuentran en los venenos ofídicos son: histamina, bradiquinina, serotonina, acetilcolina y catecolaminas. Los accidentes por serpientes de la familias Viperidae y Crotalidae se caracterizan, entre otras cosas, por un dolor intenso e inmediato a la mordedura; contrario a lo que ocurre con los accidentes debidos a miembros de la familia Elapidae, donde el dolor se desarrolla paulatinamente. Existe correlación entre estos hechos y la presencia de las aminos biogénicas, las cuales están en el veneno de todos los crotálicos y vipéridos, pero prácticamente no se encuentran en los venenos de los elápidos. Las aminos biogénicas también pueden causar edema y alteraciones en la presión arterial, principalmente por su capacidad de provocar dilatación capilar y aumento de su permeabilidad con extravasación de líquidos (Tu 1983, Bolaños 1984).

Los venenos de serpientes contienen mezclas complejas de péptidos y proteínas. Algunas de estas proteínas son enzimas, tales como fosfolipasas A₂, proteasas y nucleotidasas. Las proteasas de los venenos son un grupo heterólogo de proteínas o glicoproteínas, con un ámbito amplio de pesos moleculares, que va desde 15 kD hasta los 380 kD. Se ha informado de proteínas de cadena simple y

también de múltiples subunidades. Las proteasas difieren en su mecanismo de catálisis, algunas se comportan como serina proteasas y otras como metaloproteasas. Las proteasas de los venenos muestran grandes variaciones en la especificidad del sustrato. Algunas atacan sustratos altamente específicos, mientras otras atacan de manera inespecífica una gran variedad de sustratos (Kini y Evans 1990, 1992). En el caso de las metaloproteasas, éstas pueden inducir varios efectos farmacológicos, entre ellos: hemorragia, inhibición de la coagulación, inhibición de la agregación plaquetaria, e incluso efectos letales (Kini 1995).

La fosfolipasa A₂ (PLA₂) se encuentra presente en todos los venenos de serpientes y está íntimamente relacionada con mecanismos específicos en la patología del envenenamiento (Bolaños 1984). Como enzimas catalizan la hidrólisis del éster de la posición 2 de los fosfolípidos, liberando ácidos grasos insaturados y lisofosfolípidos. A pesar de que las PLA₂ con capacidad enzimática, muestran un tipo común de actividad enzimática, exhiben diversos efectos tóxicos, tales como: hemólisis, miotoxicidad, cardiotoxicidad, neurotoxicidad, actividad anticoagulante y actividad inductora de edema (Fletcher y Jiang 1995, Ogawa *et al.* 1995).

Dentro de las proteasas específicas que actúan sobre sustrato específico y cuyo efecto tiene gran importancia en la patología del envenenamiento se encuentran la quinogenasa (factor liberador de bradiquinina), las enzimas coagulantes y las enzimas fibrinolíticas o fibrinogenolíticas (Tu 1983, Bolaños 1984).

Rocha-Silva y colaboradores (1949) observaron la liberación de bradiquinina en tejidos expuestos al efecto del veneno de *Bothrops jararaca*. Esta sustancia posee efecto vasopresor fuerte y aumenta la permeabilidad capilar por lo que es responsable, en mayor o menor grado, de la brusca caída de la presión arterial y del edema que se manifiesta en el envenenamiento por vipéridos y crotálicos. La quinogenasa, una proteasa específica capaz de hidrolizar ésteres de arginina pero no caseína, es la responsable del efecto. Su sustrato es una globulina plasmática, el quinínogeno o bradiquininógeno, el cual al ser degradado libera el péptido responsable de los efectos mencionados.

Además, en el veneno de algunas serpientes existen otros péptidos capaces de potenciar el efecto de la bradiquinina al inhibir la angiotensinasa, enzima normal productora de la angiotensina, un vasopresor que contrarresta en parte la acción de la bradiquinina (Bolaños 1984).

El mecanismo normal de la coagulación sanguínea se ve alterado por los venenos de serpientes, ya sea induciendo o inhibiendo la coagulación. La mayoría de los venenos contienen factores que pueden producir ambos tipos de efecto, dependiendo el resultado final de las concentraciones relativas de ambos. Sin embargo, cualquiera que sea el mecanismo, las manifestaciones en la víctima son de incoagulabilidad debido a una coagulopatía por consumo del fibrinógeno (desfibrinización) o a la inactivación de los factores de coagulación. La hidrólisis drástica del fibrinógeno (fibrinogenólisis) lo vuelve incoagulable mientras que la fibrinolisis disuelve el coágulo en una acción semejante a la exhibida por la plasmina; la rapidez de la disolución depende de las características y concentración de la enzima (Bolaños, 1984). Sin embargo, los mecanismos fisiopatológicos involucrados en la hemorragia local, inducidos por el envenenamiento por miembros de la familia Crotalidae y Viperidae aún permanecen sin esclarecer (Maruyama *et al.* 1992).

En los venenos de serpientes se han identificado gran cantidad de componentes que afectan la coagulación sanguínea y la función plaquetaria. A ellos se les ha clasificado como: componentes coagulantes del fibrinógeno, enzimas fibrinogenolíticas (subclasificadas como α , β o γ fibrinogenasas, según la cadena del fibrinógeno monomérico que ataquen), liberadores del activador del plasminógeno, activadores de la protrombina, inhibidores de la formación del complejo de la protrombina, activadores del Factor X, activadores del Factor V, activadores del Factor XI, activadores de la proteína C, inductores de la agregación plaquetaria, inductores de la agregación plaquetaria dependiente del Factor von Willebrand e inhibidores de la agregación plaquetaria (Ouyang *et al.* 1992).

De los venenos de crotálidos y vipéridos se han aislado inhibidores de la agregación plaquetaria, encontrándose una familia de proteínas no enzimáticas las cuales inhiben la actividad de las integrinas. Estas últimas son componentes esenciales de la superficie plaquetaria, responsables de su agregación. Según

estudios de secuenciación se ha sugerido que estas proteínas no enzimáticas, denominadas desintegrinas, se derivan de precursores mayores. Se ha sugerido que tanto las desintegrinas como las metaloproteasas de los venenos de crotálicos y vipéridos se derivan de proteínas precursoras comunes con una estructura multidominio (Hite *et al.* 1992, Kini y Evans 1992, Kini 1995).

Otras enzimas que se presentan en los venenos son: fosfodiesterasas, hialuronidasa y acetilcolinesterasa. Las fosfodiesterasas son capaces de hidrolizar ésteres del ácido fosfórico actuando sobre ácidos nucleicos, ATP y AMP, entre otras sustancias fosforiladas. La hialuronidasa o factor de difusión actúa hidrolizando el ácido hialurónico y facilitando la difusión del veneno en los tejidos. La acetilcolinesterasa se presenta en serpientes de la familia Elapidae, típicas por su veneno neurotóxico. Entre las enzimas no hidrolíticas se encuentran transaminasas (glutámico, pirúvica y láctica) y la oxidasa L-aminoácido, esta última es la responsable del color amarillo de los venenos (Bolaños 1984).

El veneno es almacenado en el lumen de la glándula del veneno. Durante el almacenamiento las actividades enzimáticas de algunos componentes del veneno, tales como fosfolipasas y las proteasas deben inhibirse para preservar de la autodegradación al resto de los componentes del veneno y a la glándula misma. La concentración de citrato en el veneno es lo suficientemente alta como para inactivar a las enzimas, mediante quelación de los iones metálicos, incluyendo a las fosfolipasas. En el caso de los crotálicos y vipéridos las metaloproteasas hemorrágicas, también son inhibidas durante el almacenamiento mediante glicoproteínas que se acomplejan con las primeras y las neutralizan (Francis *et al.* 1992, Freitas *et al.* 1992, Francis y Kaiser 1993). En el caso del veneno de *B. asper* las metaloproteasas son inhibidas por péptidos endógenos entre ellos el piroglutamato-glutamina-triptófano y el piroglutamato-asparagina-triptófano (Francis y Kaiser 1993). En realidad se conoce poco sobre los mecanismos que previenen el daño celular en la glándula del veneno. Ogawa *et al.* (1995) encontraron que las células cultivadas de la glándula de *Trimeresurus flavoviridis* mueren al exponerse al veneno de este ofidio.

Algunas de las acciones inducidas por los venenos son debidas a polipéptidos denominados neurotoxinas, cardiotoxinas, citotoxinas, miotoxinas y hemorraginas, según sea su blanco (Bolaños 1984, Bjarnason y Fox 1988/1989).

2.2. Hemorraginas

Los componentes hemorrágicos de varios venenos de serpientes se han logrado purificar y han sido denominados toxinas hemorrágicas, proteasas hemorrágicas, hemorraginas, principios hemorrágicos, factores hemorrágicos o simplemente proteasas, designándoles con números o letras.

Estas pueden inducir hemorragia localizada en el sitio de inyección de la toxina o bien a distancia, llegando en algunos casos a inducir hemorragia sistémica, lo cual puede llevar a la muerte, dependiendo del tipo de toxina, susceptibilidad del individuo y cantidad de veneno inyectada.

Las proteasas con características de hemorraginas, purificadas de los venenos ofídicos, muestran actividad reducida o inhibida al exponerse a agentes quelantes como EDTA, EGTA, fenantrolina u otros, por lo cual se clasificaron como metaloenzimas o metaloproteasas (Bjarnason y Tu 1978). El ion metálico en el sitio activo de éstas es necesario para la actividad enzimática e importante para mantener la estructura nativa de la proteína. Su actividad hemorrágica es dependiente de la actividad proteolítica de la toxina e *in vitro* muestran actividad proteasa variable. Además, la potencia de éstas ha sido relacionada con su actividad contra las proteínas de la matriz extracelular (MEC) más que a su actividad como proteasas contra los sustratos proteicos en general (Baramova *et al.* 1989).

Según el peso molecular, las hemorraginas se clasifican en tres grupos: metaloproteasas pequeñas, medianas y grandes, con pesos moleculares de 25 kD, 30 a 60 kD y de 60-100 kD respectivamente, siendo estas últimas las que presentan la actividad más potente *in vivo* (Bjarnason y Fox 1988/1989).

En el caso de las hemorraginas el metal requerido para su función es el Zn^{+2} , por lo que se denominan metaloproteasas dependientes de Zn^{+2} . Entre ellas están las

hemorraginas purificadas del veneno de la cascabel *Crotalus atrox* (Bjarnason y Tu 1978, Bjarnason y Fox 1987, Bjarnason *et al.* 1988, Shannon *et al.* 1989), la proteasa Ac-1 aislada del veneno de *Agkistrodon acutus* (Nikai *et al.* 1982), algunas enzimas proteolíticas purificadas de *A. halys blomhoffii* (Nikai *et al.* 1986) y la proteasa H, factor hemorrágico purificado del veneno de *Crotalus adamanteus* (Kurecki y Kress 1985).

De los venenos de serpientes se han purificado un número considerable de metaloenzimas hemorrágicas que, además de Zn^{+2} , contienen otros cationes. Por ejemplo, la toxina purificada del veneno de *Agkistrodon bilineatus* además de un mol de Zn^{+2} contiene dos moles de Ca^{+2} por mol de proteína (Imai *et al.* 1989).

Las metaloproteasas dependientes de Zn^{+2} de diversos orígenes hidrolizan varios componentes de la MEC tales como fibronectina, colágeno (C) I, III, IV y V, gelatinas, laminina y proteoglicanos. Dependiendo del sustrato que degradan las metaloproteasas se clasifican como: colagenasas, gelatinasas o proteoglicanasas. En algunos casos, sin embargo, las proteasas que destruyen sustratos de más de una categoría se consideran miembros de más de un grupo.

Las colagenasas de los vertebrados se clasifican según el tipo de C que degraden: intersticial (tipos I, II, III y V) o el tipo IV de la membrana basal (MB). Las que degradan el C IV no degradan el C I pero hidrolizan gelatina, fibronectina y laminina. Las colagenasas que hidrolizan C I, II y III usualmente no hidrolizan C IV y presentan poca o ninguna actividad contra la gelatina (Shannon *et al.* 1989).

2.2.2. Hemorraginas del género *Bothrops*

Los cuadros 1 y 2 muestran los datos biofísicos y bioquímicos más relevantes de algunas de las proteasas hemorrágicas purificadas de los venenos de varias especies del género *Bothrops* [*B. jararaca* (jararaca), *B. neuwiedi* (jararaca pintada), *B. moojeni* (caissaca), *B. asper*].

La mayoría son hemorraginas de las clasificadas como medianas por su peso molecular (Bjarnason y Fox 1988/1989), encontrándose las purificadas en el ámbito de los 22 a los 64 kD, con puntos isoeléctricos entre 4 y 5. Además de la actividad hemorrágica presentan actividad proteolítica y en pocos casos fibrinogenolítica. Estas son metaloenzimas inhibidas por agentes quelantes tales como el EDTA y la 1,10-fenantrolina (Mandelbaum *et al.* 1976, 1984; Assakura *et al.* 1985, 1986; Mandelbaum y Assakura 1988, Borkow *et al.* 1993, Gutiérrez *et al.* 1995).

2.2.3. Hemorraginas aisladas de *Bothrops asper*

A la fecha se han aislado seis metaloproteasas a partir del veneno de *Bothrops asper*; dos de ellas (proteasas G e I) no muestran actividad hemorrágica (Aragón y Gubensek 1978, 1987), en tanto que las otras si inducen este efecto. Borkow *et al.* (1993) purificaron tres hemorraginas (BaH-1, BH₂ y BH₃) y Gutiérrez *et al.* (1995) la restante (BaP-1). Las características más relevantes de estas cuatro hemorraginas se muestran en el cuadro 2.

Las hemorraginas BaH-1, BH₂ y BH₃ son glicoproteínas ácidas, termolábiles y sensibles a pH extremos. Sus pesos moleculares son 64, 26 y 55 kD, respectivamente. La BaH-1, además de ser la más pesada, es la más potente. Cuando se inyectan individualmente, la BaH-1 induce una hemorragia equivalente al 30% de la provocada por el veneno completo, mientras que las otras dos (BH₂ y BH₃) contribuyen en solo el 0.5-1.25% (Borkow *et al.* 1993). Por otra parte, la mezcla de las tres muestra actividad sinérgica de ellas ya que son responsables del 50% de la hemorragia.

Cuadro I: Propiedades de las toxinas hemorrágicas de venenos de algunas especies del género *Bothrops* *

	<i>Bothrops jararaca</i>	<i>Bothrops neuwiedi</i>	<i>B. moojeni</i>		
Propiedad o característica	HF2	Bothropasina	NHF-a	NHF-b	M proteasa A
Peso molecular (kD)	50	48	46	58	22,5
M.H.D. (ng)	20	1000	4.8	0.2	2X10 ⁴
Punto isoeléctrico	4.3	4.8	4.2	4.2	7.7
Otras actividades	Fibrinogenolítico Mionecrosis y necrosis arterial.	Mionecrosis y necrosis arterial			
Inhibidores		EDTA, EGTA, Oxalato	EDTA & 1,10-fenantrolina	EDTA & 1,10-fenantrolina	Oxalato, EDTA & 1,10-fenantrolina
Observaciones	Hidroliza la cadena β de la insulina en His10-Leu11, Ala14-Leu15, Tyr16-Leu17 & Phe24-Phe25.	Hidroliza la cadena β de la insulina en His5-Leu6, His10-Leu11, Ala14-Leu15, Tyr16-Leu17 & Phe24-Phe25.	20 veces más activa sobre caseína que NHF-b.	23 veces más hemorrágica que NHF-a.	Leu amino terminal Sufre desnaturalización y autólisis en bajas concentraciones de sales. Respuesta hemorrágica débil. Se activa con calcio.
Referencias	Mandelbaum <i>et al.</i> 1976, 1982	Mandelbaum & Assakura 1988, Assakura <i>et al.</i> 1985	Mandelbaum & Assakura 1988 Mandelbaum <i>et al.</i> 1984	Mandelbaum & Assakura 1988 Mandelbaum <i>et al.</i> 1984	Mandelbaum & Assakura 1988 Assakura <i>et al.</i> 1985

Todas presentan actividad hemorrágica y proteolítica
M.H.D. Dosis hemorrágica mínima

* Fuente: Bjarnason & Fox (1988/1989); modificado con datos de Mandelbaum & Assakura (1988).

Cuadro 2: Propiedades de las toxinas hemorrágicas aisladas del veneno de *Bothrops asper*

Propiedad o característica	BaH-1	BH2	BH3	BaP-1*
Peso molecular (kD)	64	26	55	24
M.H.D. (ng)	0.18	2	1.6	20
Punto isoeléctrico	4.5	5.2	5.0	
Hemorrágico	+++	+	++	+
Proteolítico	+	+	+	+
Referencia	Borkowetal, 1993	Borkowetal, 1993	Borkowetal, 1993	Gutiérrez et al, 1995

Las cuatro son inhibidas por EDTA y 1,10- fenantrolina.

* hidroliza caseína, induce edema y miotoxicidad moderada sin efectos coagulantes, desfibrinantes o letales. Presenta actividad fibrinogenolítica sobre las cadenas α y β del fibrinógeno pero no sobre la γ .

M.H.D. Dosis hemorrágica mínima

La BaP-1 es la más liviana (24 kD) y muestra actividad proteolítica, fibrinogenolítica y hemorrágica débil (Gutiérrez *et al.* 1995). Las cuatro hemorraginas son inhibidas en presencia de EDTA y orto-fenantrolina, por lo cual se les encasilla en el grupo de las metaloproteasas (Borkow *et al.* 1993, Gutiérrez *et al.* 1995).

Rucavado *et al.* (1995) al comparar la BaH-1 y la BaP-1 encontraron que estas dos metaloproteasas son inmunológicamente diferentes ya que no muestran reacción cruzada por ninguno de los métodos que probaron en su estudio.

2.3.1. Efectos sobre el endotelio inducidos *in vivo* por el veneno crudo

Las células endoteliales (CE) son células del epitelio plano simple que delimitan las cavidades de los vasos sanguíneos, linfáticos y del corazón, les caracteriza la presencia de gran cantidad de vesículas denominadas plasmalemas (VP). Las CE establecen continuidad a través de las uniones intercelulares (UIs) y se apoyan sobre una membrana basal (MB), la cual les confiere soporte. Además esta membrana interviene en el intercambio de metabolitos y actúa como filtro molecular y andamio para la remodelación o mantenimiento de la estructura tisular (Kefalides 1979, 1980; Simionescu 1983, Simionescu y Simionescu 1983, Abramson 1986).

Ownby *et al.* (1974) y Ownby (1975) investigaron la patogénesis de la hemorragia inducida por el veneno crudo de *Crotalus atrox* encontrando una acción lítica sobre las células endoteliales. Concluyeron que el sangrado mostrado por los ratones inyectados con el veneno de *C. atrox* se debe al mecanismo de hemorragia por rexis, esto es, salida de proteínas del plasma y eritrocitos hacia el espacio intersticial a través de espacios o brechas producidos en las CE pero no a través de las UIs. Posteriormente, Ownby *et al.* (1978) empleando el veneno crudo de *C. atrox* observaron que éste no ejerce un efecto directo sobre la membrana de las CE de los capilares, sino que se produce dilatación del retículo endoplásmico, hinchamiento citoplasmático, desarrollo de "ampollas" ("blebbing") y eventualmente el rompimiento de la membrana plasmática de las CE, permitiendo así la extravasación de los eritrocitos y el plasma. No observaron

extravasación a través de UIs abiertas (diapedesis) después de la inyección del veneno crudo de *C. atrox*.

2.3.2. Efectos sobre el endotelio inducidos *in vivo* por hemorraginas

Ownby *et al.* (1978) posterior a la purificación y caracterización de tres toxinas hemorrágicas (a, b y c) del veneno de *C. atrox*, evaluaron su acción biológica. El examen grosero reveló una hemorragia extensa pocos minutos después de la inyección de las toxinas hemorrágicas a y c; sin embargo, el mismo efecto se logró con la toxina b pasadas 3 horas desde la inyección de la toxina; encontrándose además efecto mionecrótico. Al examinar el músculo inyectado con las toxinas al microscopio de luz (ML) se observaron áreas hemorrágicas extensas con pocos capilares intactos y áreas adyacentes con hemorragia leve, con capilares en varios estadios de degeneración. El microscopio electrónico (ME) reveló que las CE se adelgazan y parecen desprenderse en vesículas o ampollas, antes de completar su rompimiento. Se formaron brechas dentro de las CE, mientras las UIs permanecían intactas; el plasma y los eritrocitos se fugan a través de esas brechas, observándoseles en el endomisio. Muchas brechas ("gaps") en el endotelio estaban taponeadas con agregados de plaquetas. El colágeno y la lámina basal (LB) asociada con los capilares dañados, usualmente, se encontraban desorganizados o ausentes. En el tejido conectivo circundante a los vasos dañados se observó material floculento, plasma, eritrocitos extravasados y elementos desorganizados del tejido conectivo normal. Los autores concluyeron que el mecanismo de escape de los eritrocitos es similar en las tres toxinas purificadas y el veneno crudo; éste es por rexis (Ownby *et al.* 1978).

Resultados similares fueron obtenidos por Ownby y Geren (1987) al estudiar el efecto de la hemorragina HP-IV purificada del veneno de otro crotárido, *Crotalus horridus horridus*, la cual no afecta directamente fibras musculares, nervios o fibroblastos en la zona de inoculación. Además Ownby y Geren (1987) mencionan la posibilidad de que la hemorragina HP-IV dañe el endotelio induciendo la acumulación de plaquetas y el depósito de la fibrina; luego el daño se potencia por la presencia de fibrina o péptidos de ésta.

McKay *et al.* (1970) al realizar estudios con una hemorragina parcialmente purificada y una fosfolipasa aisladas del veneno de *Vipera palestinae* encontraron que los primeros cambios provocados fueron: hinchamiento del citoplasma de las CE, seguido por daño a los capilares y al endotelio, además de extravasación de plasma hacia el tejido conectivo alrededor del capilar, el desarrollo de pseudópodos del citoplasma endotelial y la interrupción de la MB. Los capilares eventualmente se ocluían con plaquetas y antes de los 10 minutos posteriores a la inyección, las organelas citoplasmáticas de muchas CE estaban ausentes y la extravasación de los eritrocitos era máxima, aunque no observaron interrupciones en las UIs. Además, la hemorragina parece causar agregación de las plaquetas en el sitio del daño. Con la fosfolipasa se observó edema intersticial y perturbaciones en la membrana eritrocitaria sin presentarse hemorragia. Los autores concluyeron que la toxina hemorrágica actúa rompiendo la MB y causa lisis de la CE lo que permite la fuga de eritrocitos y plasma de los capilares.

Ohsaka *et al.* (1973), empleando ME y microcinematografía, analizaron los efectos del veneno y de la fracción HR-1 purificada del veneno de *Trimeresurus flavoviridis* (Habu), concluyendo que el efecto hemorrágico de las toxinas se debe a la degradación enzimática de la MB del capilar, que permite la salida de eritrocitos a través de los espacios ensanchados en las UIs, sin que ocurra lisis de las CE. Ownby (1975), menciona los estudios de Tsuchiya y colaboradores (1974) quienes empleando el veneno de esta misma especie, sobre capilares mesentéricos de rata, observaron que la MB desaparece parcialmente, seguida por el escape de los eritrocitos a través de las UIs. Las CE y los pericitos (células ramificadas asociadas al lado externo de los vasos sanguíneos, rodeados por la MB del vaso, cuya función aún no está clara) parecen sufrir algunos cambios funcionales y orgánicos; sin embargo, las células no llegan a lisarse (Tilton *et al.* 1979, Joyce *et al.* 1985).

2.3.3. Efectos de las hemorraginas sobre los componentes de la matriz extracelular

Las evidencias logradas con el ME indican que las toxinas son capaces de interrumpir la MEC que rodea a las CE de los capilares. Consecuentemente, esto hace suponer que la actividad hemorrágica de la toxina se debe a su capacidad para degradar proteolíticamente la MB de los capilares, así como las proteínas en

la MEC que los rodean. La potencia hemorrágica de estas toxinas ha sido relacionada con su actividad como proteasas contra las proteínas de la MEC, más que contra los sustratos proteicos en general (Baramova *et al.* 1989).

Las toxinas se enfrentan a patrones que contienen las proteínas de la MEC o a la LB aisladas para conocer el efecto de la toxina sobre las mismas; en un intento por explicar la forma en que se produce la hemorragia *in vivo* y conocer cuáles son las macromoléculas sobre las que actúan estas proteasas.

Ohsaka y colaboradores (1973) informaron que los componentes hemorrágicos purificados del veneno de *T. flavoviridis* en contacto con MB aisladas provocan la liberación de proteínas y carbohidratos de dichas membranas, sugiriendo que esta acción puede ser la que desencadena el efecto hemorrágico.

Baramova *et al.* (1989) determinaron que cuatro hemorraginas aisladas del veneno de *C. atrox* mostraban actividad sobre las proteínas aisladas de la MEC; siendo capaces de hidrolizar la fibronectina, la laminina, el C IV, el nidogen (entactina) y las gelatinas. Sin embargo, ninguna de las proteasas degradaba los colágenos intersticiales (C I, C III y C V), por lo que sugirieron que no existe analogía entre estas proteasas y las colagenasas intersticiales.

El ámbito de las proteínas de la MEC digeridas por estas proteasas hemorrágicas es casi idéntico al demostrado para la estromelisina (MMP-3, proteasa de la MEC, aislada de fibroblastos humanos que degrada fibronectina, laminina, C IV y proteoglicanos de cartílago). Aunque la estromelisina y algunas hemorraginas muestran similitud por algunos sustratos y un sitio para la unión del Zn^{+2} , el ADN que las codifica no presenta similitud por lo que se supone que las hemorraginas no están relacionadas estrechamente con las colagenasas y gelatinasas de mamíferos.

Las proteínas que forman la MEC al interactuar entre sí confieren la integridad estructural y funcional a la MB y a la matriz. Las enzimas degradadoras de la MEC funcionan *in vivo* en forma conjunta para remodelarla proteolíticamente durante procesos como la reparación de heridas, angiogénesis, desarrollo e involución uterina posparto. Se sabe que si el balance entre las proteasas endógenas y sus inhibidores se altera, puede provocar consecuencias deletéreas. De igual forma

la presencia de proteasas exógenas que degraden la MEC induce condiciones patológicas. Se ha sugerido que la degradación de las proteínas de la MEC puede fácilmente llevar a la pérdida de la integridad del capilar permitiendo la hemorragia (Bjarnason *et al.* 1988, Baramova *et al.* 1989, Mandelbaum 1990).

Sea cual sea el modelo experimental empleado para estudiar la patogénesis de la hemorragia, no se ha definido cuál es la estructura blanco para las hemorraginas: la LB o la CE. Para determinar, entonces, sobre qué actúan las hemorraginas de los venenos de serpientes, o si ellas desencadenan factores secundarios que colaboran en el proceso, deberá acumularse mayor información. Pero en todo caso es necesario el estudio ultraestructural de los efectos causados ya sea por el veneno crudo o sus componentes purificados, ya que de las alteraciones inducidas podría deducirse parte del efecto y los posibles blancos de acción de esas toxinas. Es por ello que se analizaron las alteraciones ultraestructurales en endotelio de la microvasculatura del músculo esquelético de ratones (*Mus musculus*) al inyectarse con veneno crudo y la hemorragina BaH-1 de *Bothrops asper*.

CAPITULO III

MATERIALES Y METODOS

3.1. VENENO CRUDO

Se inyectaron intramuscularmente seis grupos de cuatro ratones (*Mus musculus*) blancos Swiss-Webster, de un peso aproximado a los 20 g. La inyección se realizó en el gastronemio derecho, con una dosis subletal (50 μ g) de veneno crudo (Gutiérrez y Chaves 1980) disuelto en amortiguador de fosfatos de sodio 0.1 M, NaCl 0.12 M, pH 7.2. El veneno fue tomado de individuos de la especie *Bothrops asper*, de la región pacífica de Costa Rica (Lote 7-80, Instituto Clodomiro Picado). Los animales fueron sacrificados por dislocación cervical a los 5, 15, 30 y 60 minutos, 3 y 24 horas después de la inyección del veneno e inmediatamente se disecó el gastronemio inyectado. El músculo fue seccionado en fragmentos de aproximadamente 1 mm³ y fijados en solución de Karnovsky (1963) modificada (glutaraldehído 2.5% y paraformaldehído 2%) en amortiguador de fosfatos de sodio 0.1 M, pH 7.2, durante 2 horas a 4°C. Se posfijaron con tetraóxido de osmio (OsO₄) al 1% en el mismo amortiguador durante 1 hora, se deshidrataron con etanol e infiltraron con resina epóxica, fórmula de Spurr (1969).

De cada bloque se obtuvo secciones semidelgadas para observarlas al microscopio de luz, lo que permitió obtener información sobre el grado de hemorragia y ayudó para la elección de los bloques que fueron seccionados para observarse al microscopio electrónico de transmisión (MET).

Las secciones delgadas (50-70 nm) fueron obtenidas con navajas de vidrio y se contrastaron con acetato de uranilo (4% en etanol al 50%) y citrato de plomo acuoso (1%). La observación de las secciones se realizó en la Unidad de Microscopía Electrónica de la Universidad de Costa Rica; empleando los MET modelos H-7000 y H-7100 (HITACHI), con un voltaje de aceleración entre 75 y 100 Kv.

3.2. HEMORRAGINA BaH-1

Se inyectaron intramuscularmente cuatro grupos de cinco ratones (*M. musculus*) con iguales características a las mencionadas anteriormente. La inyección se realizó en el gastronemio derecho, con una dosis subletal (10 μ g) de la hemorragina BaH-1, purificada

del veneno de individuos de la especie *Bothrops asper* de la región pacífica de Costa Rica. La purificación fue realizada en el Departamento de Zoología de la Facultad de Ciencias de la Vida "George S. Wise", Universidad de Tel-Aviv, Israel (Borkow *et al.* 1993). Los animales fueron sacrificados por dislocación cervical a 1, 5, 15, y 60 minutos después de la inyección de la toxina e inmediatamente se disecó el gastronemio inyectado. El músculo fue seccionado para el fijado y proceso para MET según se mencionó anteriormente.

3.3. CONTROL

Para la fase de veneno crudo, cuatro ratones (*M. musculus*) blancos (Swiss-Webster) de aproximadamente 20 g de peso se inyectaron en el gastronemio derecho con amortiguador de fosfatos de sodio 0.1 M, NaCl 0.12 M, pH 7.2, para obtener las muestras del músculo control. El sacrificio de los mismos se realizó transcurridas 3 horas después de la inyección. La toma y proceso de la muestra siguió el proceso descrito anteriormente. Por otra parte, el músculo control para la fase con la BaH-1 se obtuvo siguiendo el mismo proceso para el control con veneno crudo excepto que el sacrificio de los animales se realizó 15 minutos después de la inyección.

CAPITULO IV

RESULTADOS

4.1. Observaciones en la microvasculatura de los músculos control

Macroscópicamente los músculos de los ratones inyectados con solución amortiguadora de fosfatos (muestras control) no mostraron signos de edema ni hemorragia. Su aspecto normal también se evidenció al microscopio de luz, encontrándose la arquitectura tisular bien conservada. Esto último pudo confirmarse al microscopio electrónico de transmisión, donde tanto el músculo como su microvasculatura se observaron sin alteraciones (Figs. 1 y 2). El endotelio de la microvasculatura mostró gran cantidad de vesículas plasmalemales. Su superficie es continua y sin proyecciones de ningún tipo. Las uniones intercelulares entre las células endoteliales se observan normales y electrodensas. Las láminas basales en los capilares y poscapilares se encuentran continuas y de aspecto normal, envolviendo tanto a los anillos de células endoteliales como a las porciones de pericitos que lograron observarse. El lumen de los microvasos se mostró libre de signos de trombosis, de desanclaje del endotelio o de acumulación de células. El espacio extracelular estaba limpio, con ausencia de fibrina, de otros precipitados o restos celulares.

4.2. Observaciones en la microvasculatura de los músculos inyectados con veneno crudo

En los animales inyectados con 50 μ g de veneno crudo de *Bothrops asper* adultas, la coloración de los músculos analizados varió a los 5 minutos post-inoculación, pasando del color blanco-amarillento normal con áreas ligeramente rosadas a una tonalidad amoratada que fue abarcando todo el músculo conforme transcurría el período de exposición, siendo mayor la edematización y equimosis a las 24 horas del envenenamiento. Al microscopio de luz se detectaron signos de hemorragia desde los 5 minutos post-inoculación del veneno.

A nivel ultraestructural se encontraron algunas características comunes en las muestras obtenidas a los diferentes intervalos de tiempo posteriores a la inoculación del veneno. Las células endoteliales de la microvasculatura de las

zonas con hemorragia mostraron signos característicos de alteración, resumidos en el Cuadro 3.

Se encontraron patrones desde disminución del número de vesículas plasmalemales (Fig. 3) hasta su ausencia en las células endoteliales de los microvasos, principalmente a los 30 y 60 minutos posteriores a la inoculación del veneno.

En algunos microvasos las células endoteliales mostraban proyecciones con contenido citoplasmático en aparente "gemación" hacia el lumen de los microvasos (Fig. 4). Este evento se presentó tanto en microvasos donde no había disminución aparente del número de vesículas plasmalemales (Fig. 5) como en microvasos con endotelio con pocas vesículas plasmalemales (Fig 6). En ocasiones se observó la inclusión de organelas dentro de estas proyecciones del endotelio (Figs. 7A y 7B). Además, acompañando al adelgazamiento del endotelio siempre se presenta aumento de la electrodensidad (Figs. 8A y 8B) de los restos del endotelio.

El patrón celular observado en algunas células endoteliales de los microvasos que no generaban proyecciones citoplasmáticas o se adelgazaban fue la dilatación del retículo endoplásmico y del citosol, dando a estas células en forma general, una apariencia difusa (Figs. 9 y 10) donde fue difícil localizar las membranas celulares. También se observó la reducción en el número de vesículas plasmalemales pero fue difícil establecer los cambios degenerativos en las mitocondrias y el núcleo celular debido al aspecto "edematizado". En muy pocos casos las células endoteliales que mostraban edema también presentaban proyecciones (Fig. 12).

En términos generales, no se observaron separaciones de las uniones intercelulares entre las células endoteliales, sin embargo, en ocasiones había disminución de la electrodensidad relativa de las uniones (Fig. 3).

Los núcleos de las células endoteliales se encontraron alterados en grado variable y con diferentes estadios de degeneración, algunos con apariencia normal, pero con el espacio perinuclear distendido; mientras otros mostraban picnosis con una

Cuadro 3: Efectos observados en el endotelio de la microvasculatura del músculo gastronemio murino, posterior a la inyección de 50 μ g de veneno crudo de terciopelo (*Bothrops asper*). *

Hallazgo	tiempo post-inyección del veneno			
	5min	15min	30min	60 min
Endotelio				
disminución # VP	+	+	++	+++
ausencia de VP	+	+	++	+++
adelgazamiento	+	+	++	+++
edema celular	+	+	++	+++
> electrodensidad	+	+	++	+++
< electrodensidad	+	+	++	+++
gemación del endotelio	+	+	++	++
anillos	-	-	-	-
Ruptura de CE	+	+	++	++
uniones menos densas	+	+	+	+
uniones separadas	-	-	-	-
LB ausente	+	+	+	+
LB discontinua	+	+	+	+
LB separada	+	+	+	+
LB difusa	+	+	+	+
núcleos picnóticos	+	+	+	+
heterocromatina				
distribuida homogénea	+	-	-	-
condensada en periferia	+	+	++	++
EPN dilatado	+	+	++	++
RE dilatado	+	+	++	++
Mitocondrias dilatadas	+	+	+	+

- * Las muestras control presentaron aspecto normal.
 En las muestras de 3 y 24 Hrs posteriores a la inyección no se logró observar el endotelio de la microvasculatura.
- ausencia de la situación indicada,
 + presencia de la situación indicada, el aumento en el número de signos + indica mayor grado de severidad,
 > mayor que, < menor que, #VP número de vesículas plasmalemales
 LB lámina basal, CE célula endotelial, EPN espacio perinuclear,
 RE retículo endoplásmico

Cuadro 4: Hallazgos en el lumen de la microvasculatura y en el espacio extravascular en músculo gastronemio murino, inyectado con 50 μ g de veneno crudo de *Bothrops asper* *.

Hallazgo	tiempo de exposición al veneno crudo					
	5min	15min	30min	1Hr	3Hr	24Hr
Lumen vascular						
Congestión	+	+	++	+++	++	++
Fantasma eritrocíticos	+	+	+	+	+	++
Crenocitos	+	+	+	+	+	++
Restos celulares	+	+	+	+	+	+
Fibrina	-	+	+	+	+	+
Leucocitos	-	-	+	+	+	+
Plaquetas formando:						
trombos mixtos	-	+	+	+	+	+
trombos plaquetarios	-	+	++	++	++	++
Plaquetas:						
unidas al endotelio	+	+	+	+	i?	i?
taponeando brechas	-	+	+	+	i?	i?
con pseudópodos	+	+	+	+	+	+
Espacio extravascular						
Fibrina	+	-	++	+++	++++	+++
Restos celulares	+	+	++	+++	++++	+++
Eritrocitos	+	+	++	+++	++++	++++
Fantasma eritrocíticos	-	+	+	+	+	+
Leucocitos	-	-	+	+	++	++
Exudado plasmático	+	+	++	+++	++++	++++

- * Las muestras control presentaron aspecto normal.
 - ausencia de la situación indicada
 + presencia de la situación indicada, el aumento en el número de + indica mayor grado de severidad.
 i? no se pudo discernir debido al alto grado de aglomeración y fusión de los elementos.

gama intermedia de diferentes grados de condensación de la heterocromatina (Fig. 8),

La lámina basal en algunos de los microvasos se encontró alterada (Fig. 4), discontinua (Figs. 9 y 10), difusa (Fig. 10) o ausente (Figs. 7, 8, 11, 12, 18 y 19); por regla general si la lámina basal se encontraba alterada o ausente, la célula endotelial igualmente se mostraba alterada, por lo general con aspecto difuso.

Respecto a las mitocondrias del endotelio; se encontraron hinchadas pero sin precipitados en la matriz (Figs. 3 y 7) o con algunas floculaciones pero sin cristales (Figs. 8 y 11).

Las alteraciones encontradas en el lumen de la microvasculatura y en el espacio extravascular respecto al tiempo, se indican en el cuadro 4. Se detectó fibrina en el lumen de los vasos dañados (Fig. 13) a partir de los 15 minutos de inoculación del veneno, sin embargo, en el espacio extravascular (Fig. 14) se detectó a los 5 minutos pero no a los 15 minutos, probablemente por efecto de la toma de las muestras. En el lumen de los microvasos podía observarse la presencia de material granular amorfo (Fig. 15), este evento fue más frecuente conforme transcurría el tiempo de exposición al veneno crudo. En las muestras tomadas a los 15, 30 y 60 minutos después de la inyección del veneno fueron evidentes los trombos de plaquetas en el lumen de los microvasos (Fig. 16) así como taponeando brechas en el endotelio.

De las muestras obtenidas en cada uno de los tiempos considerados en el estudio se encontraron eritrocitos extravasados con formas atípicas, así como restos celulares (Figs. 17 y 19).

A las 3 y 24 horas posteriores a la inyección del veneno, la microvasculatura de las áreas afectadas había desaparecido y el espacio intersticial presentaba un aspecto caótico donde se apreciaba una granulación excesiva, producto probable de la salida de plasma, restos de células endoteliales, tapones de plaquetas, eritrocitos, fibrina e infiltrado inflamatorio, lo que hacía imposible identificar los restos de las paredes de la microvasculatura (Fig. 20).

4.3. Observaciones en la microvasculatura de los músculos inyectados con BaH-1

Los músculos de los ratones inyectados con 10 μg de la BaH-1 (Borkow *et al.* 1993) mostraron hemorragia al minuto post-inoculación; su intensidad y extensión aumentó conforme transcurrió el tiempo post-inoculación, lo cual fue evidente macroscópicamente y al microscopio de luz. Ultraestructuralmente se observaron una serie de alteraciones comunes a las muestras de los tiempos post-inoculación en estudio (Cuadros 5 y 6).

Las células endoteliales presentaron proyecciones citoplasmáticas con formas anulares (Figs. 21 a 28), además de las frecuentemente presentadas del tipo "gemación" (Fig. 23).

También en algunos microvasos las células endoteliales presentaban un adelgazamiento exagerado que les daba apariencia fenestrada (Fig. 24).

En muchos de los microvasos alterados no se encontró la lámina basal, mientras que en otros estaba difusa, discontinua (Fig. 21) o separada en algunas porciones del endotelio debido a edema subendotelial (Fig. 25 a 27). En términos generales, en la microvasculatura de las áreas alteradas, cuando las células presentaban apariencia normal sus láminas basales se mostraban continuas.

En las células endoteliales de los microvasos alterados fue notable la disminución en el número de vesículas plasmalemales, desde un minuto después de la aplicación de la toxina (Figs. 28 y 32), incluso en algunas hubo ausencia total de esas vesículas (Fig. 28). Algunos microvasos presentaban células endoteliales. Las células endoteliales con bajo número de vesículas plasmalemales podían encontrarse mostrando un patrón edematizado y su consecuente baja electrodensidad (Figs. 28 a 31) o bien con el patrón de pérdida de grosor y aumento en la electrodensidad (Fig. 32), observado también en las pruebas de la exposición de músculo a veneno crudo de *B. asper*. Con frecuencia se encontraron microvasos con patrones mixtos, algunas células estaban edematizadas mientras otras se observaban adelgazadas (Figs. 32 y 33).

Cuadro 5: Efectos observados en el endotelio de la microvasculatura del músculo gastronemio de ratón, posterior a la inyección de 10 μ g de la hemorragina BaH-1.*

Hallazgo	tiempo post-inyección de la BaH-1			
	1min	5min	15min	60min
Endotelio				
disminución # VP	+	++	+++	+
ausencia de VP	+	++	+++	+
adelgazamiento	+	++	+++	+
edema celular	+	++	+++	+
> electrodensidad	+	++	+++	-
< electrodensidad	+	++	+++	+
gemación del endotelio	+	++	++	-
anillos doble membrana	+	++	++	+
uniones menos densas	+	+	+	+
uniones separadas	-	-	-	i?
Ruptura de CE	+	++	++	+
LB ausente	+	+	+	+
LB discontinua	+	+	+	i?
LB separada	+	+	+	i?
LB difusa	+	+	+	i?
núcleos picnóticos	+	+	+	i?
heterocromatina condensada	+	++	++	i?
EPN dilatado	+	++	++	i?
RE dilatado	+	++	++	i?
Mitocondrias dilatadas	+	+	+	i?

- * Las muestras control presentaron aspecto normal.
- ausencia de la situación indicada
- + presencia de la situación indicada, a mayor número de + indica mayor severidad.
- < menor que, > mayor que, #VP número de vesículas plasmalemales, LB lámina basal, CE célula endotelial, EPN espacio perinuclear, RE retículo endoplásmico,
- i? indica incapacidad para discernir la situación mencionada, debido a alto grado de aglomeración y fusión de los elementos

Cuadro 6: Hallazgos en el lumen de la microvasculatura y espacio extravascular del músculo gastronemio de ratón, post-inyección de 10 μ g de la hemorragina BaH-1.*

Hallazgo	tiempo post-inyección de la BaH-1			
	1min	5min	15min	60min
Lumen vascular				
Congestión	+	++	+++	++
Fantasmas eritrocíticos	+	+	+	+
Crenocitos	+	+	+	+
Restos celulares	+	+	+	+
Fibrina	+	+	+	+
Leucocitos	-	+	+	+
Plaquetas formando:				
trombos mixtos	+	+	+	+
trombos plaquetarios	+	+	+	+
Plaquetas				
unidas al endotelio	+	+	+	i ?
taponeando brechas	+	+	+	i ?
conseudópodos	+	+	+	+
Espacio extravascular				
Fibrina	+	++	+++	++++
Restos celulares	+	++	+++	++++
Eritrocitos	+	++	+++	++++
Fantasmas eritrocíticos	+	+	+	+
Leucocitos	-	+	+	++
Exudado plasmático	+	++	+++	++++

- * Las muestras control presentaron aspecto normal.
 - ausencia de la situación indicada
 + presencia de la situación indicada, a mayor número de + indica mayor severidad.
 i ? indica incapacidad para discernir en la situación mencionada, debido a alto grado de aglomeración y fusión de los elementos

Las uniones intercelulares se conservaron bien, aún en microvasos con más de una célula alterada (Figs. 31 a 33); con frecuencia se encontraron uniones entre células endoteliales muy alteradas que mostraban puntos potenciales de ruptura cercanos a éstas (Figs. 34 a 36). No se encontraron separaciones de las uniones intercelulares en el caso de capilares, lo que sí se observó en algunos poscapilares en tiempos posteriores a los 5 minutos de exposición a la toxina. Además, se encontraron microvasos en los cuales una célula endotelial se mostraba muy edematizada, la cual al "estallar" o "disolverse" puede convertirse en puntos de salida, creando, además, la falsa impresión de uniones intercelulares separadas (Figs. 28 a 30 y 36), dado que los bordes de la brecha resultante serán las uniones de las células endoteliales adyacentes.

Los núcleos de las células endoteliales alteradas mostraban la cromatina condensada y dilatación del espacio perinuclear. En períodos de exposición mayores se encontraron picnóticos y con aparente disminución de tamaño, además se evidenciaba una clara dilatación del espacio perinuclear (Figs. 37 y 38). No se observaron alteraciones en la forma del núcleo que pudieran asociarse con los cambios característicos de la muerte celular apoptótica, como son segmentaciones o gemaciones. Tampoco se observó envolturas nucleares rotas o núcleos vacíos.

La dilatación de organelas como mitocondrias (Fig. 37) y el retículo endoplásmico (Figs. 38 y 39) estuvieron presentes desde el primer minuto de exposición a la hemorragina. Las mitocondrias en ocasiones mostraban restos de las crestas y no se observaron floculaciones o algún precipitado que indicara la presencia de cristales.

Los tapones de eritrocitos (Figs. 40 a 43) o de plaquetas (Figs. 44 a 47), así como mixtos fueron evidentes haciéndose más frecuentes conforme avanzaba el tiempo de exposición a la toxina. Las plaquetas se encontraron formando trombos y taponeando brechas en la pared de los microvasos (Figs. 44 y 47). También se encontraron agregados de fibrina en capilares y en poscapilares (Fig. 48), así como en el espacio perivascular (Fig. 49), siendo evidentes ya al minuto de exposición a la hemorragina BaH-1.

Se observaron eritrocitos fugándose a través de brechas en el endotelio o empujando restos de células endoteliales, pero no a través de uniones separadas (Fig. 50). En muy pocos casos se observaron algunos eritrocitos migrando a través de las células endoteliales de la pared de vasos de mayor calibre (Fig. 51).

No se observaron alteraciones importantes en la arquitectura de las células musculares, aunque se presentó dilatación del espacio perinuclear y del retículo sarcoplásmico en algunas de las fibras.

Las alteraciones mencionadas fueron igualmente observadas a los 5 y 15 minutos de exposición a la toxina. Sin embargo los daños encontrados a la hora de exposición a la toxina hicieron imposible identificar capilares y poscapilares en las áreas afectadas, en algunas zonas se encontraban solamente restos de las paredes de la microvascultura. En pocas ocasiones se lograron identificar microvasos, éstos mostraron las mismas alteraciones mencionadas para los otros tiempos de exposición a la BaH-1. Aun cuando el aspecto generalizado a los 60 minutos de exposición a la toxina era un aspecto caótico, se encontraban paquetes de eritrocitos o de eritrocitos y plaquetas o solamente de éstas últimas dentro del espacio de lo que, se supone, debieron ser microvasos.

Figura 1

Porción de músculo esquelético (M) murino inyectado con solución amortiguadora de fosfatos y cloruro de sodio, se observa que tanto los microvasos como el músculo mantienen arquitectura normal. PC poscapilar, C capilar. barra= 0.2 μm

Figura 2

Capilar muscular murino expuesto a solución amortiguadora de fosfatos y cloruro de sodio. L lumen, lb lámina basal, vp vesículas plasmalemales, ui unión intercelular, p porción de pericito. barra= 0.5 μm

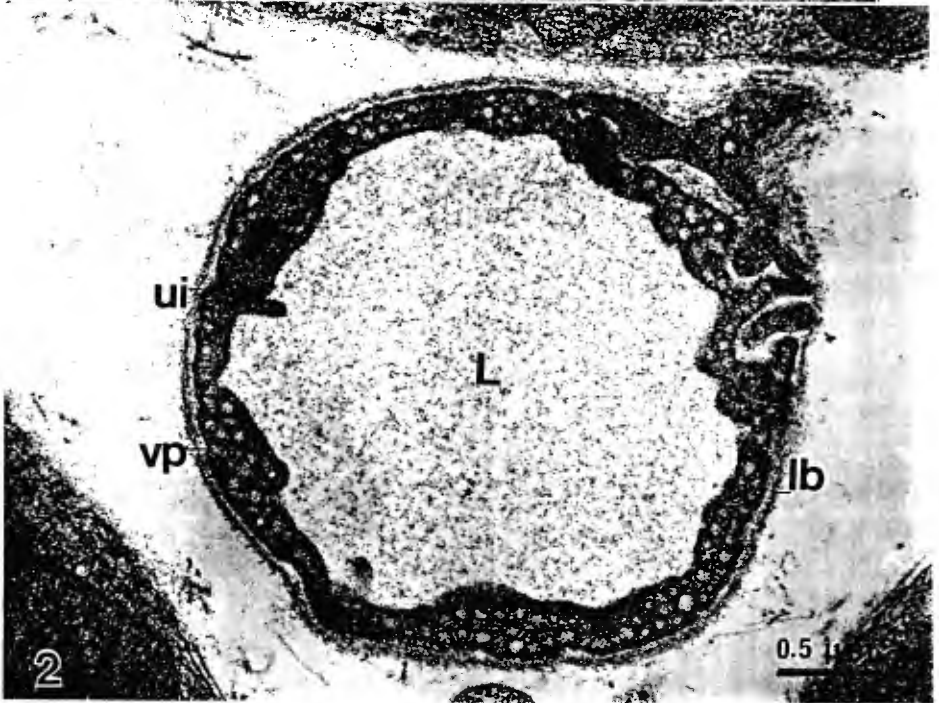
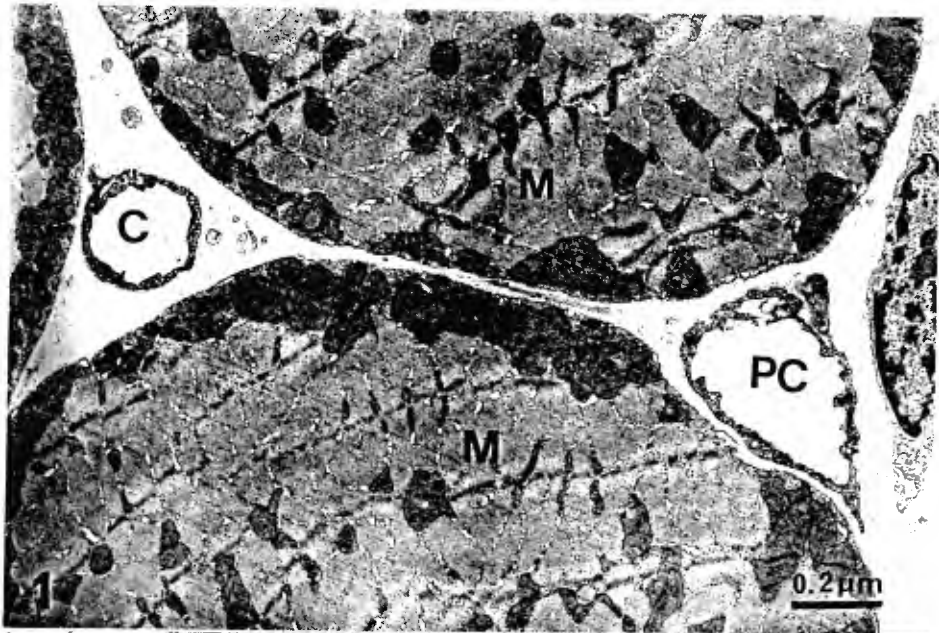


Figura 3

Microvaso mostrando dilatación del retículo endoplásmico (re) y de mitocondrias (m), disminución del número de vesículas plasmalemales y porciones adelgazadas del endotelio (cabeza de flecha), 5 minutos posteriores a la inyección de veneno de *B. asper*, lb lámina basal. barra= $1\mu\text{m}$

Figura 4

Capilar de músculo murino 5 minutos después de la inyección de veneno de *B. asper*, es común la presencia de proyecciones ("gemaciones" o "blebs") hacia el lumen capilar (cabezas de flecha). Se observan porciones alternas en el endotelio con pocas vesículas plasmalemales. lb lámina basal. barra= $1\mu\text{m}$

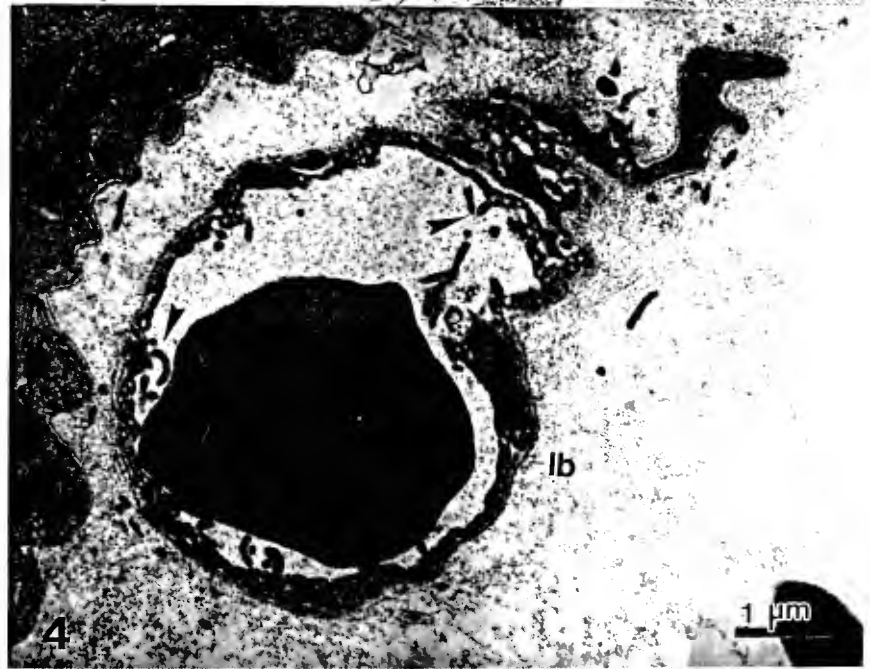
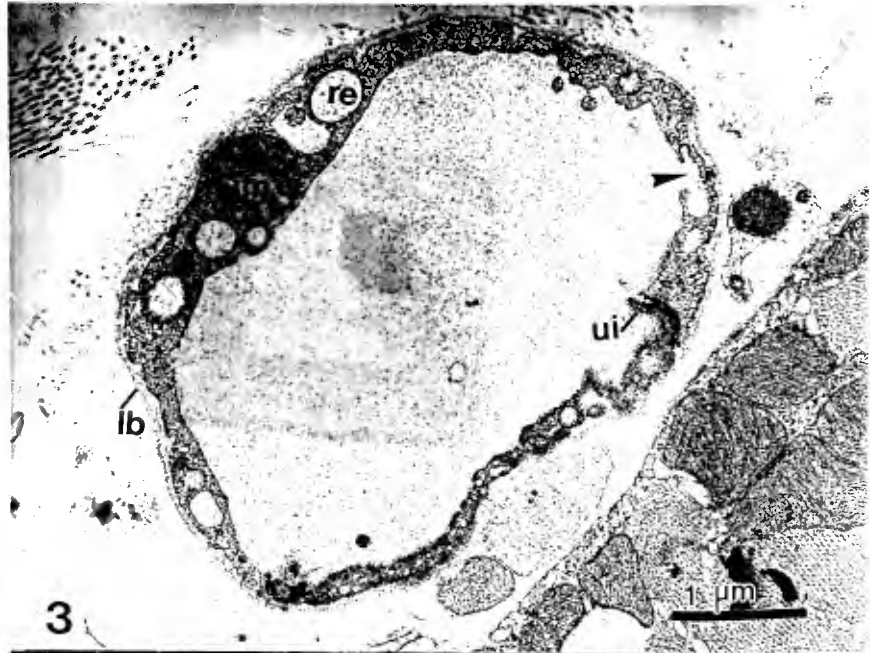


Figura 5

Porción de microvaso expuesto al veneno crudo de *B. asper* (5 minutos), mostrando uno de los primeros síntomas: formación de proyecciones ("gemaciones", cabezas de flecha) y porción difusa (*) de la lámina basal (lb). barra= 0.5 μm

Figura 6

Porción de microvaso muscular inyectado con veneno crudo de *B. asper* (5 minutos), mostrando el evento de la "gemación" más avanzado (cabezas de flecha) y la disminución de vesículas plasmalemales, se aprecia mitocondria alterada (m). La unión intercelular (ui) se observa íntegra, adyacente a ésta una aparente brecha en el endotelio (flecha). La lámina basal (lb) asociada a la región de la brecha aparece difusa (*). barra= 0.2 μm



Figura 7

Músculo de ratón expuesto a veneno crudo de *B. asper*. En A se observa una porción de una fibra muscular (M) de apariencia conservada y un capilar (corte longitudinal), con gran cantidad de proyecciones endoteliales (pe) y el arrastre evidente de contenido del citoplasma hacia el lumen. Es notable la disminución del número de vesículas plasmalemales y la ausencia de la lámina basal. Los eventos descritos son comunes desde los 5 minutos de exposición al veneno de terciopelo. En B se muestra en detalle una de las proyecciones que incluye una mitocondria (m) con aspecto alterado y un punto potencial de ruptura del endotelio debido a adelgazamiento (flecha), se logran observar algunas pocas vesículas plasmalemales (vp), vesículas productos de fusión de las vp (complejos vesiculares; cv) y restos del citoesqueleto (c). barra A= 1 μm , B= 0.5 μm .

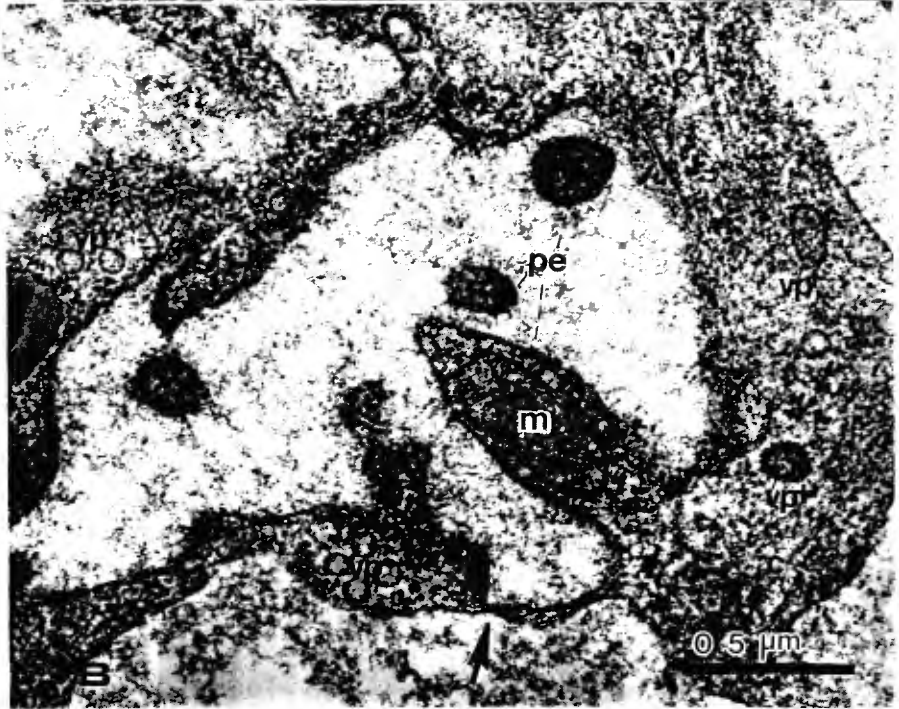


Figura 8

En A se muestra una región de músculo expuesto 15 minutos al veneno crudo de *B. asper*, donde se observa alteración en el endotelio de la microvasculatura, sin que se detecten alteraciones en las fibras musculares (M) aún. En B se muestra a mayor aumento el capilar con adelgazamiento pronunciado de su endotelio, mostrando alteración de mitocondrias (m) y núcleo (n). Es notable la ausencia de vesículas plasmalemales y de la lámina basal, así como el aumento en la electrodensidad de los residuos del endotelio. En el espacio intersticial (EI) se observa la alta granulación, correspondiente a la salida de plasma. Las porciones de fibras musculares (M) se muestran normales. Pueden apreciar, además, brechas abiertas en los residuos del citoplasma del endotelio (cabezas de flecha). barra A y B = 1 μ m

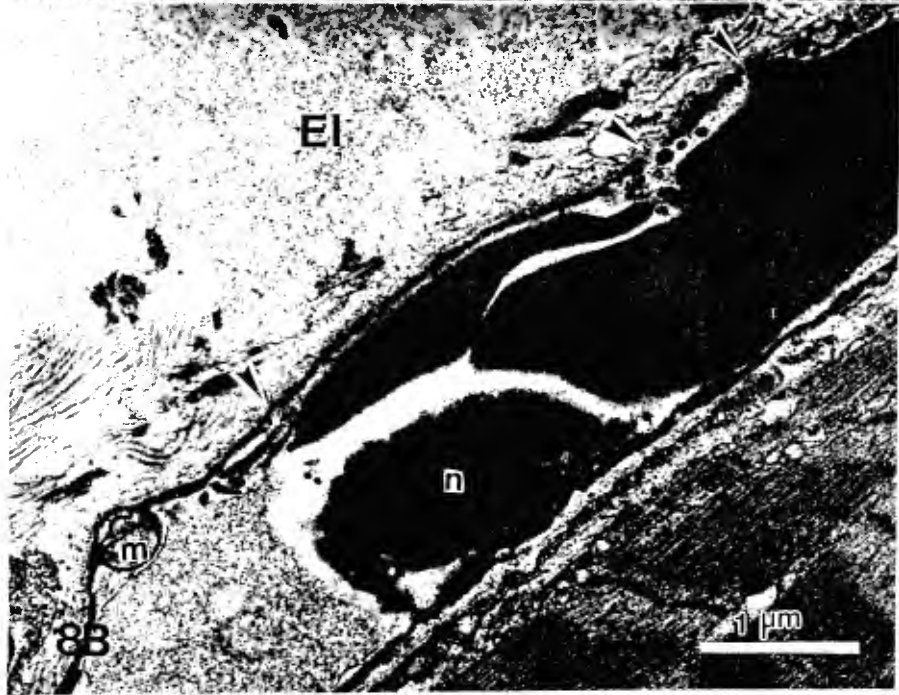
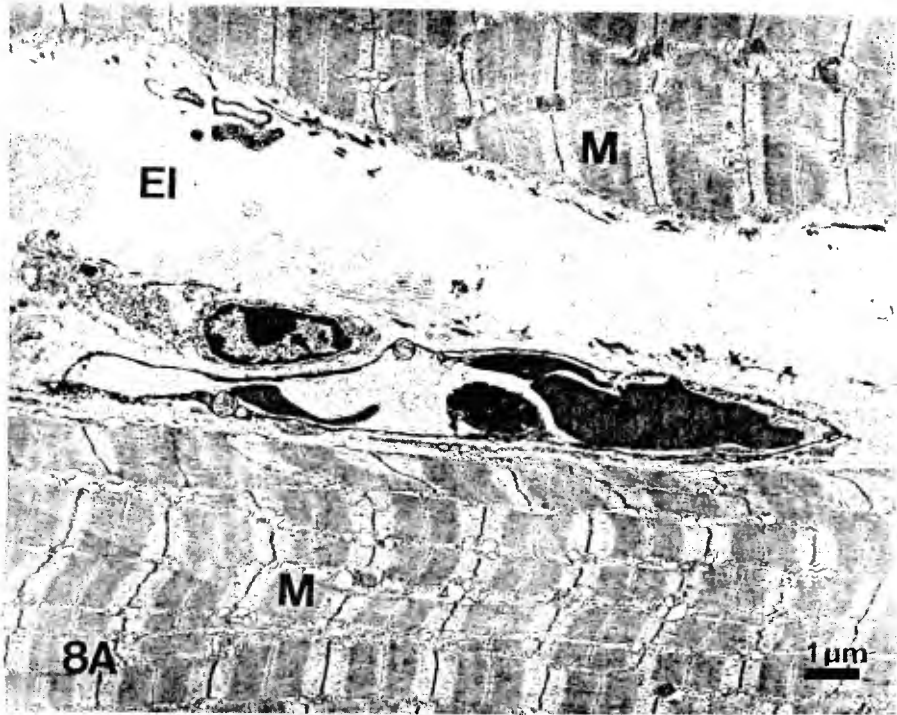


Figura 9

Patrón de degeneración de los microvasos observado con frecuencia en el músculo inyectado con veneno crudo de *B. asper*, desde los primeros minutos de exposición. Una de las células endoteliales se muestra difusa (cabeza de flecha) mientras otras no aparentan gran alteración y retienen la lámina basal (lb). Es notable la conservación de una de las uniones intercelulares (ui) entre células alteradas. La cabeza de flecha señala, además, la ausencia de la membrana celular del endotelio. En el lumen del microvaso se aprecia un fantasma de eritrocito (ef). barra= $1\mu\text{m}$

Figura 10

El patrón de degeneración más avanzado de los microvasos mostrado en la figura anterior, algunas de las células endoteliales se muestran difusas y aquí apenas visibles. Una porción del endotelio conserva la lámina basal (lb) mientras en la porción restante ha desaparecido y las células que conforman el microvaso parecen haberse desintegrado, dejando sólo una zona difusa (cabeza de flecha). En el espacio intersticial se observan mitocondrias alteradas (m), probablemente de los restos de músculo alterado. Este patrón se observa desde los 5 minutos de exposición al veneno, encontrándose con más frecuencia a partir de los 15 minutos. barra= $1\mu\text{m}$

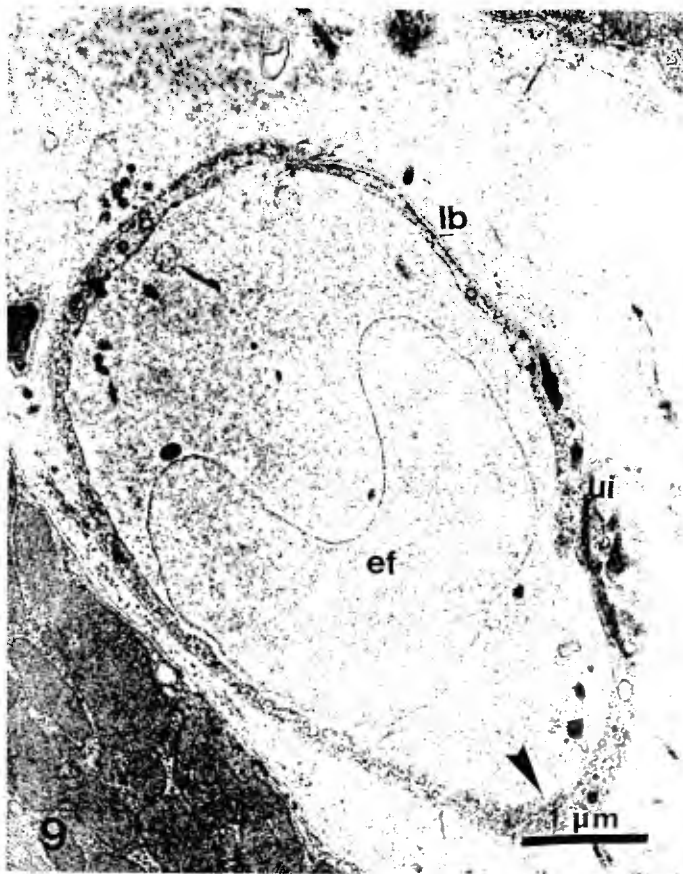


Figura 11

Patrón de patrón difuso homogéneo de degeneración de los microvasos observado frecuentemente en todos los tiempos de exposición al veneno crudo de *B. asper*. Los bordes internos de la microvasculatura apenas se encuentran definidos (cabezas de flecha), se observa además restos de mitocondria (m). barra= 0.5 μm

Figura 12

Otro de los patrones de degeneración frecuentemente observado en la microvasculatura expuesta al veneno de *B. asper*. En este patrón es difícil establecer los límites externos debido a que los elementos del intersticio se encuentran alterados y adosados a los restos del endotelio. Sin embargo, en el lumen es posible observar restos de las membranas endoteliales (proyecciones, pe). Se señala un posible resto de unión intercelular (ui). barra= 1 μm

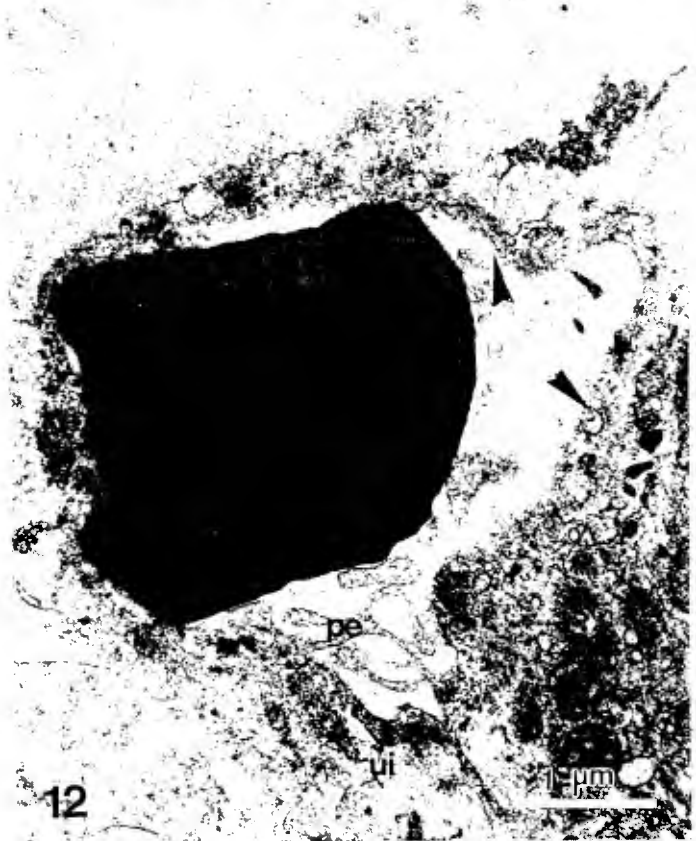
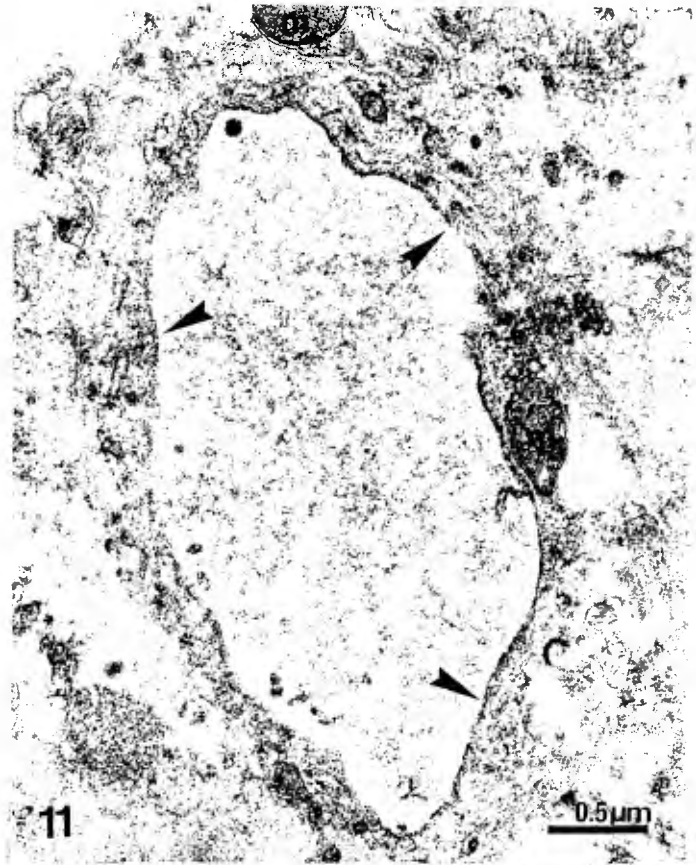


Figura 13

La presencia de fibrina (f) en el lumen de la microvasculatura es frecuente desde los primeros minutos de exposición al veneno crudo de *B. asper*. La cabeza de flecha señala la porción del endotelio con aspecto edematizado y sin lámina basal pronto a desaparecer, adyacente a una unión intercelular (ui). barra= $1\mu\text{m}$

Figura 14

La fibrina (f) en el espacio intersticial muscular se detectó transcurridos tan sólo 5 minutos de exposición al veneno de *B. asper*, aún en zonas que no mostraban alteraciones en las fibras musculares (M) o hemorragia. e eritrocito. barra= $1\mu\text{m}$

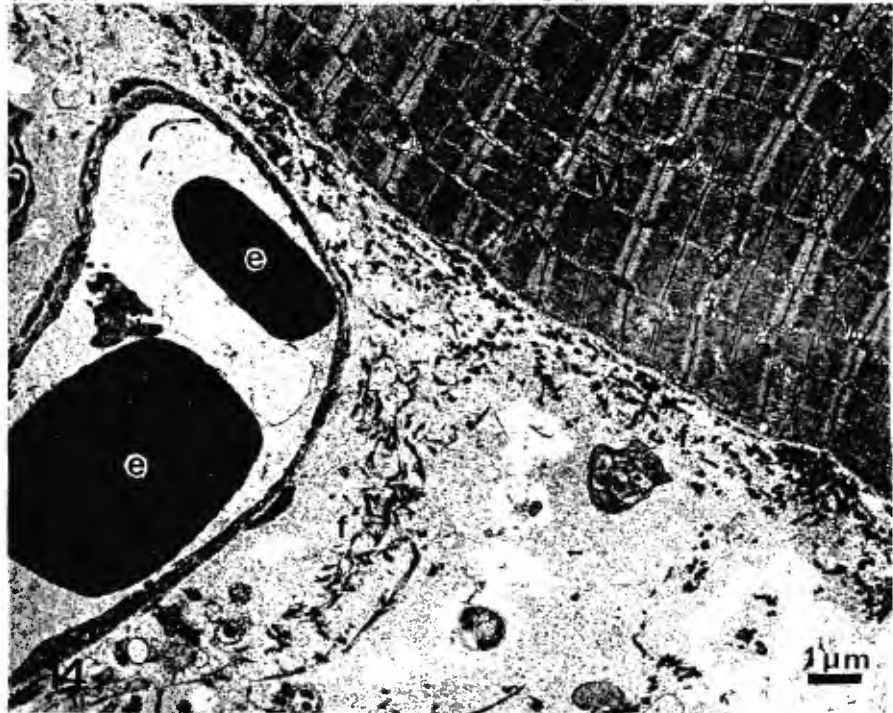
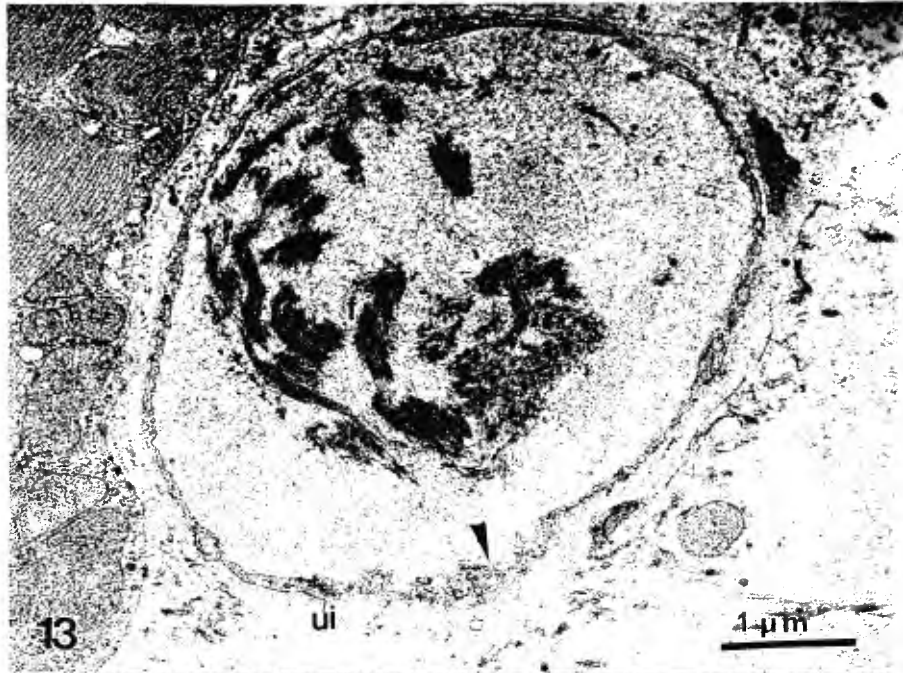
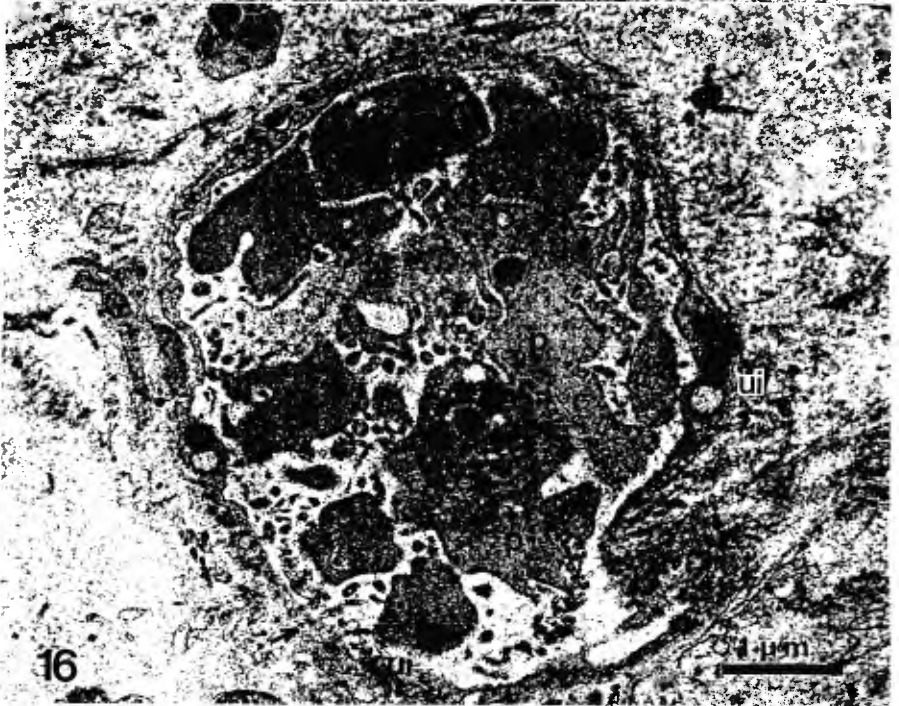
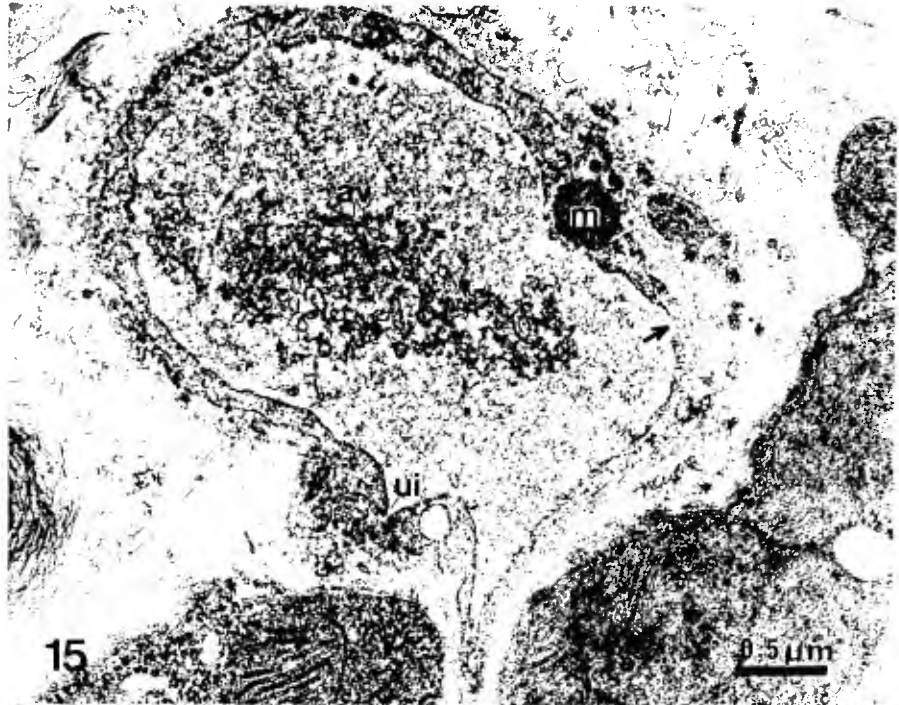


Figura 15

En la microvasculatura murina expuesta al veneno crudo de *B. asper*, es frecuente además la presencia de agregados de "pequeñas vesículas" (av). Note además en este microvaso que las células endoteliales se encuentran en estado degenerado, sin embargo, la unión intercelular no ha cedido (ui), otros puntos se han adelgazado lo suficiente como para permitir la salida de plasma (flecha). m mitocondria alterada. barra= 0.5 μm .

Figura 16

Los agregados de plaquetas (p) en los microvasos se detectan desde los 5 minutos de exposición al veneno crudo de *B. asper*. La flecha señala una porción muy difusa de la célula endotelial que conforma una unión intercelular (ui). barra= 1 μm



Figuras 17 y 18

La presencia de eritrocitos extravasados fue evidente desde los 5 minutos de exposición al veneno de *B. asper*, aún cuando se observaba edema pero sin alteración del músculo (M). Fue frecuente observar porciones de restos de endotelio en el intersticio (rce) tal como se observa en la fig. 17. barra 17 y 18= 2 μ m.

Figura 19

El veneno crudo de *B. asper* induce además del edema y la hemorragia, desorganización tisular con alteraciones de las fibras musculares (M). barra= 2 μ m.

Figura 20

En tiempos posteriores, además de la hemorragia generalizada y la desorganización tisular, en algunos intersticios podía observarse la presencia de leucocitos (L). La aglomeración celular y de eritrocitos acompañada de alta granulación hace difícil delimitar la extensión de la microvasculatura. barra= 2 μ m.



Figuras 21, 22 y 23

Microvasos de músculo murino expuestos a la hemorragina BaH-1 de *B. asper*. Las células endoteliales muestran proyecciones que forman estructuras en forma de anillo y de aparente doble membrana (*) que se proyectan hacia el lumen de los microvasos. En la fig. 21 es importante destacar, además, la presencia de una porción de célula endotelial con mayor electrodensidad que las que componen el resto del microvaso (flecha). En la fig. 22 se observa que estas proyecciones (*) se originan de prolongaciones generadas en el endotelio. En la fig. 23 éstas estructuras libres (*) aparecen libres en el lumen. Las estructuras anulares son encontradas a partir del minuto de exposición a la BaH-1, siendo más fácilmente observadas a los 5 y 15 minutos posteriores a la inyección. p pericito, e eritrocito, lb lámina basal, ui unión intercelular, m mitocondria. barras 21= 1 μm , 22= 0.5 μm , 23= 1 μm .

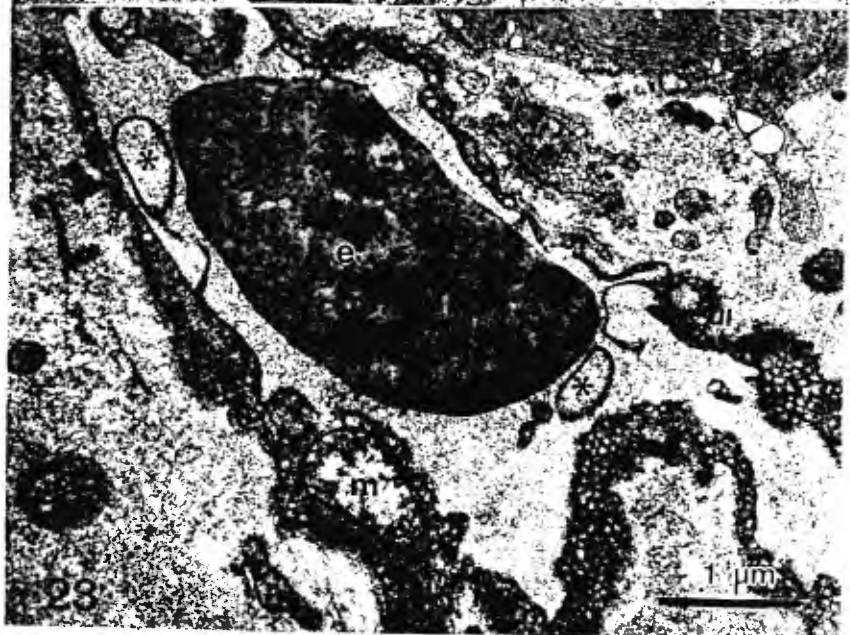
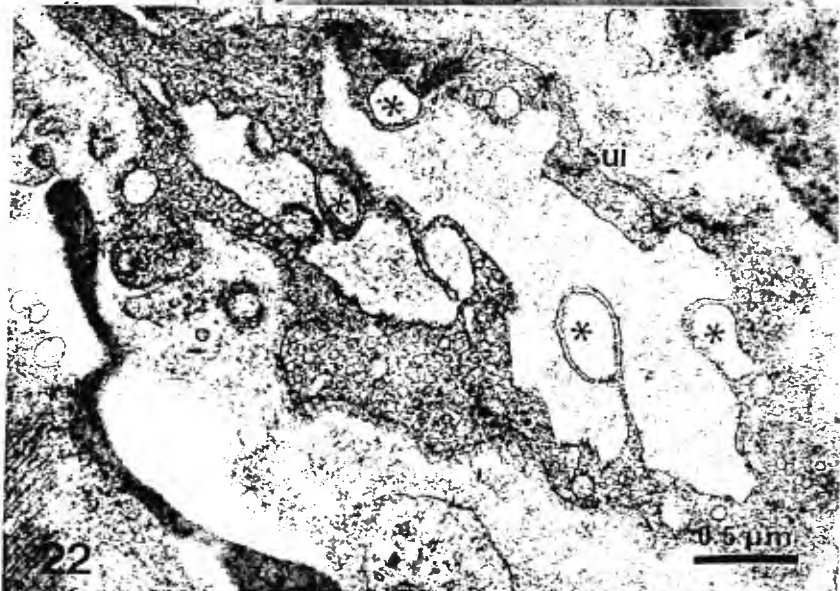
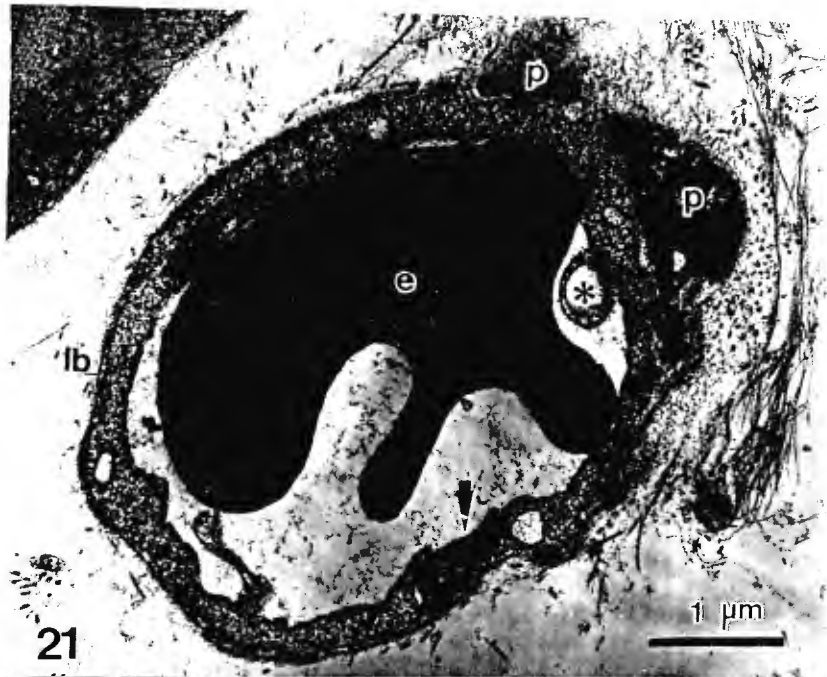
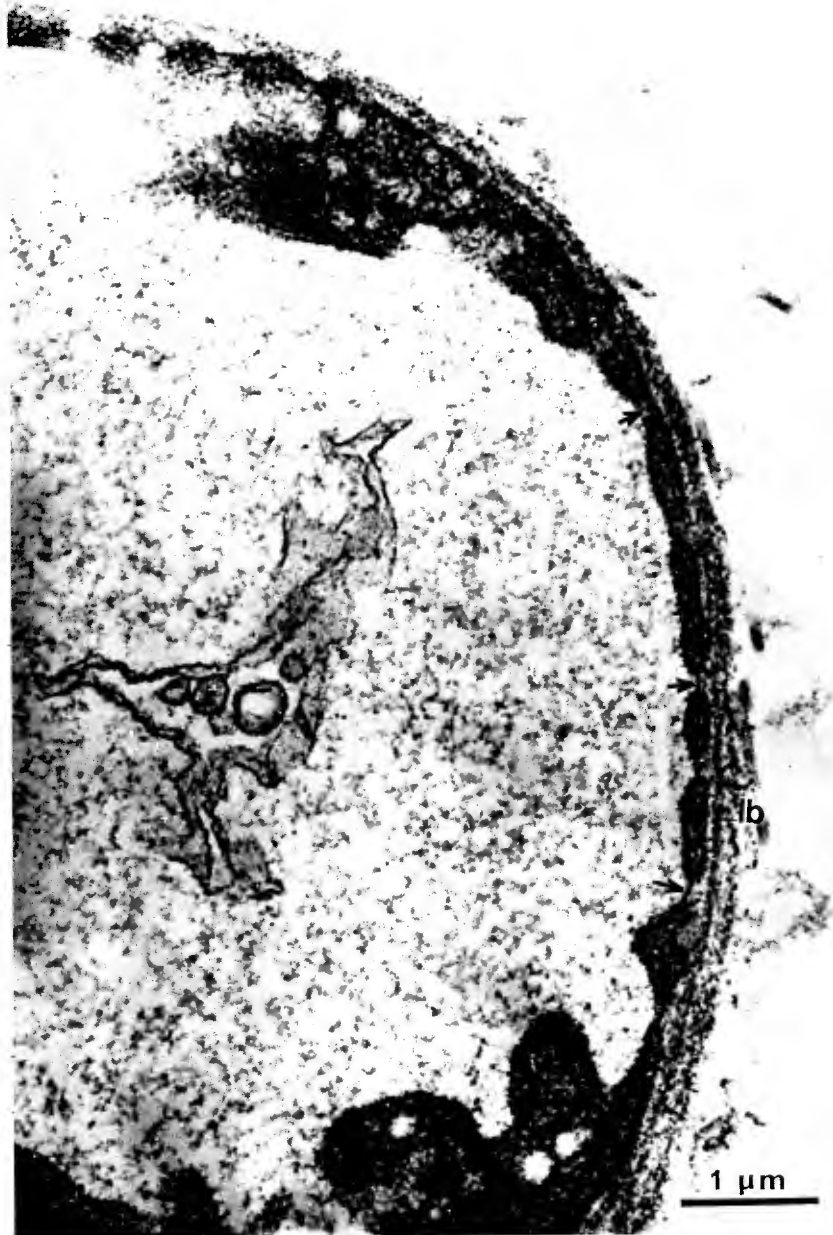


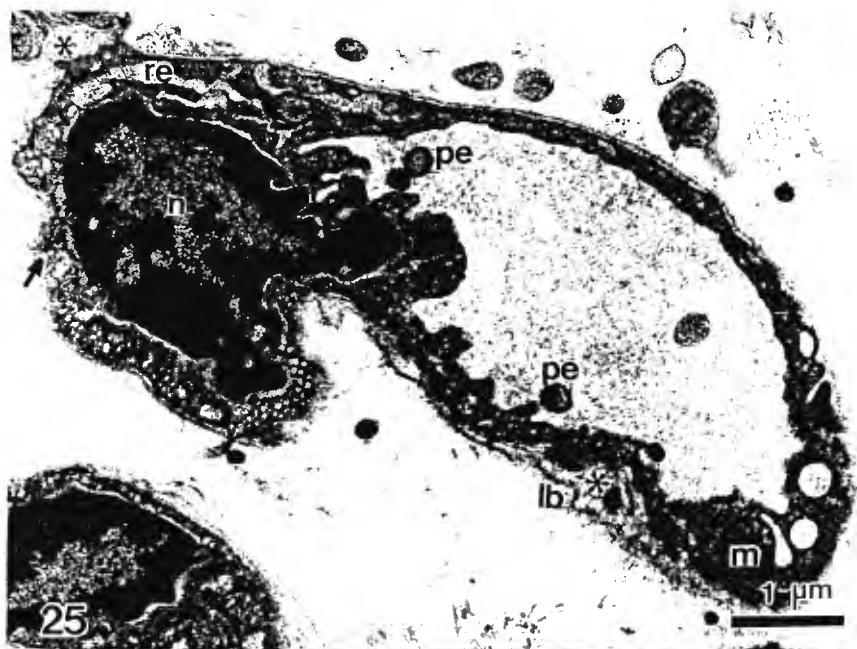
Figura 24

Microvaso de músculo murino inyectado con la toxina BaH-1 de *B. asper* mostrando un patrón de adelgazamiento encontrado con poca frecuencia, en las exposiciones de 15 y 30 minutos. En algunas de las porciones del endotelio, éste se adelgaza a grados considerables creando el efecto de ser fenestrado (flechas). Puede observarse la presencia de la lámina basal (lb) continua y sin alteración aparente. barra= 1 μ m.



Figuras 25, 26 y 27

En los microvasos de los músculos expuestos a la hemorragina BaH-1 de *B. asper*, es frecuente observar edema subendotelial que lleva al desanclaje (*) de la célula endotelial de su lámina basal (1b). Se muestran grados variables del edema subendotelial y del desanclaje. En la fig. 25 la flecha muestra una porción de célula endotelial con aspecto difuso. El edema subendotelial se observa desde el primer minuto de exposición a la BaH-1. m mitocondria, n núcleo, re retículo endoplásmico, p plaqueta, e eritrocito, pe proyecciones endoteliales o "gemaciones". barras 25 y 26= 1 μ m, 27= 0.5 μ m.



Figuras 28, 29 y 30

Microvasos expuestos a la hemorragina BaH-1 de *B. asper* en los cuales se observa dilatación (*) en grado variable de una de las células endoteliales que conforman el microvaso. El evento es detectable desde el primer minuto de exposición a la hemorragina. Además, se observa heterogeneidad respecto a la presencia de restos de la lámina basal (lb). La heterogeneidad también se muestra en la cantidad de vesículas plasmalemales (vp) y de vesículas fusionadas (vp⁺) presentes en las porciones dilatadas. Es signo común, además de la dilatación, el retener las uniones intercelulares (flechas). p plaquetas, e eritrocito. barras 28= 1μm, 29 y 30= 0.5 μm.



Figuras 31 y 32

Microvasos en los que se observa que no todas las células que conforman el microvaso responden de igual manera a la toxina BaH-1. Las diferentes respuestas de las células endoteliales son frecuentes a todos los tiempos de exposición a la toxina. En la fig 31 mientras una célula presenta edema, disminución de electrodensidad y de vesículas plasmalemales, el resto del microvaso no muestra estas características, aun cuando la lámina basal se encuentra ausente. En la fig. 32 algunas células endoteliales se observan con aumento de la electrodensidad y aparente disminución del grosor (cabeza de flecha), mientras que otras se observan con edema y disminución de la electrodensidad (*). barra 31= 0.5 μm , 32= 1 μm

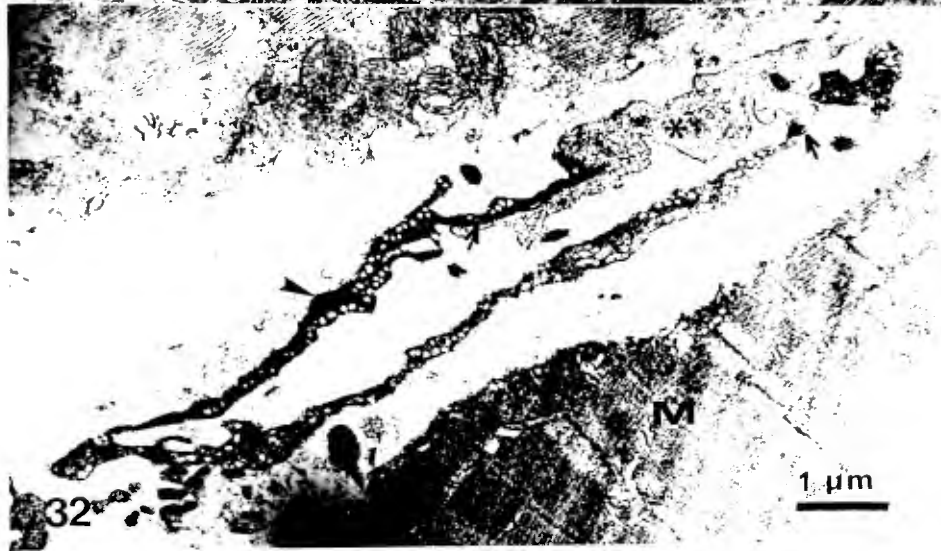
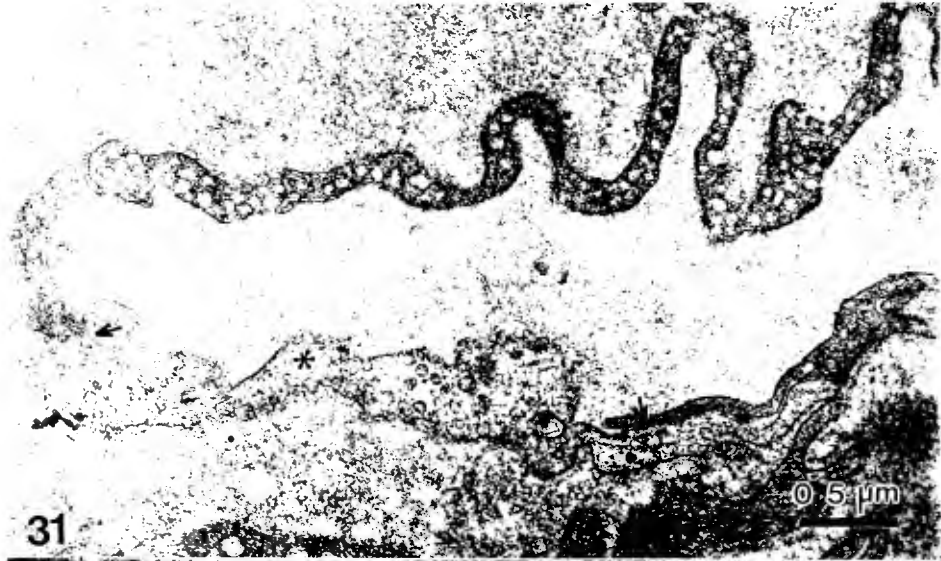


Figura 33

En A se observa una porción de un microvaso de músculo (M) inyectado con la hemorragina BaH-1, es notable la heterogeneidad de respuesta de las células endoteliales a la toxina, aspecto frecuente en todos los tiempos evaluados. Mientras algunas células presentan un aumento en la electrodensidad y aparente disminución del grosor (flechas), otras se observan edematizadas y con disminución de la electrodensidad (cabeza de flecha). En el espacio intersticial se encuentra exudado plasmático (ep) en abundancia. En el lumen del microvaso un leucocito (L) y porciones de plaquetas (p). En B, se puede observar con mayor detalle la ausencia de la lámina basal, la persistencia de las uniones intercelulares (ui) a pesar de la alteración en las células. Se observa además un "complejo vesicular" (vp⁺) producto de la fusión de vesículas plasmalemales. barras A y B= 1 μ m.



Figuras 34, 35 y 36

Las uniones intercelulares (cabeza de flecha) de los microvasos de músculo inyectado con la hemorragina BaH-1, por lo general se observan electrodensas y con cierto grado de conservación aunque las células endoteliales que las conforman muestran grado variable de degeneración. En las figuras 34 a 36 es evidente que existe mayor probabilidad de desintegración de la continuidad del endotelio por la dilatación de las estructuras adyacentes a las uniones intercelulares [34= mitocondria (m), 35= retículo endoplásmico (re), 36= porción de célula endotelial (*)] que por la ruptura o desintegración de las uniones celulares. En la fig. 34 la flecha señala una porción del endotelio casi desintegrada. e eritrocito. barras 34, 35 y 36= 0.5 μ m.

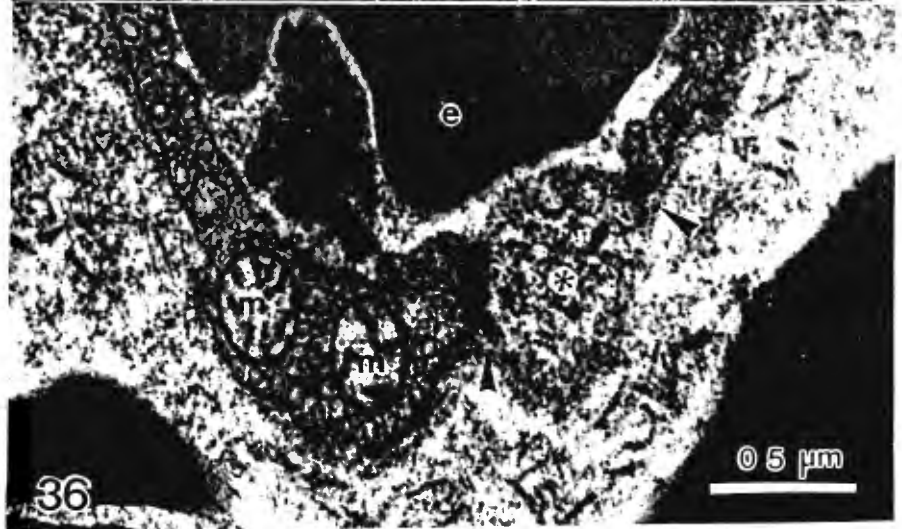
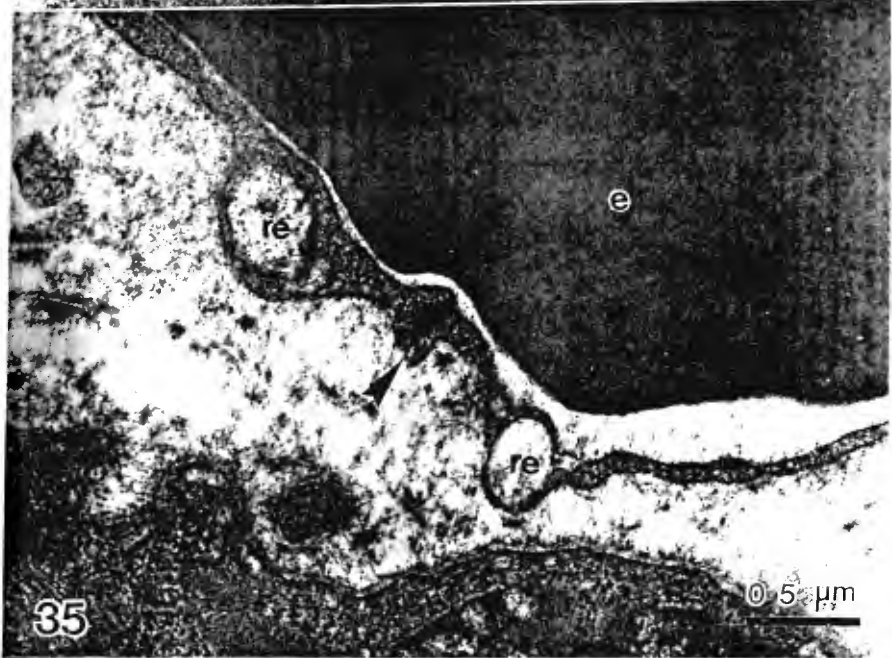
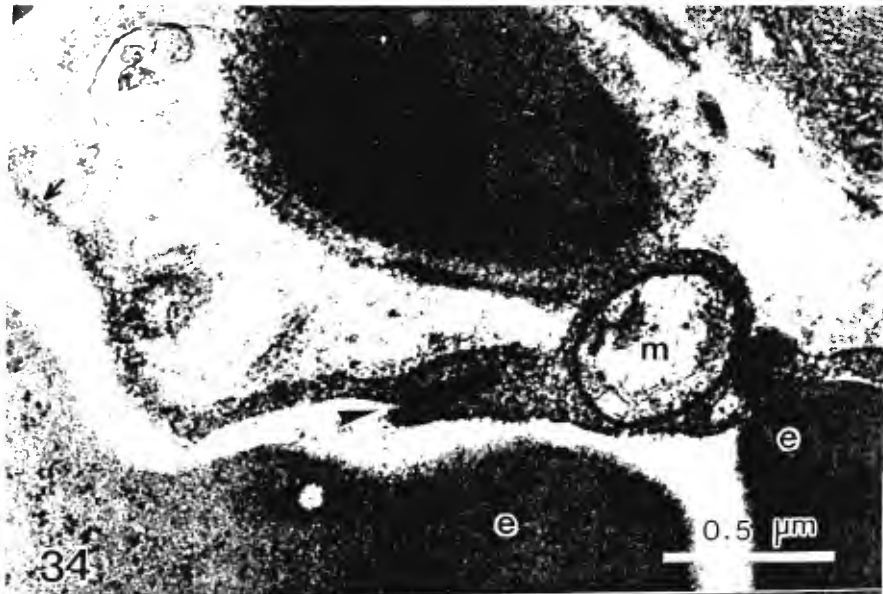


Figura 37

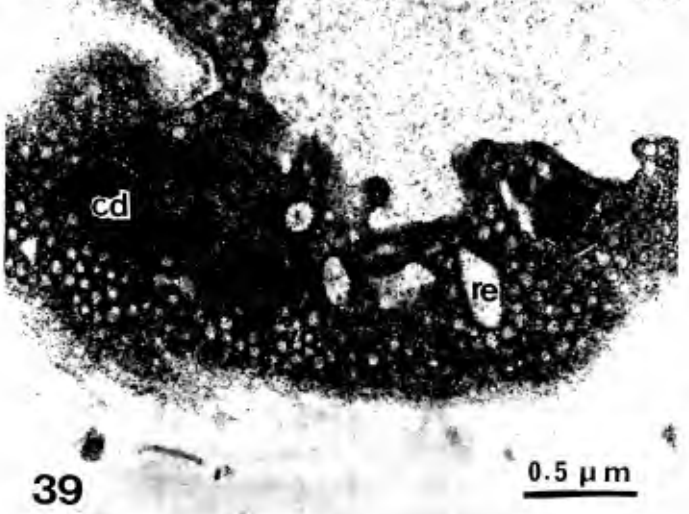
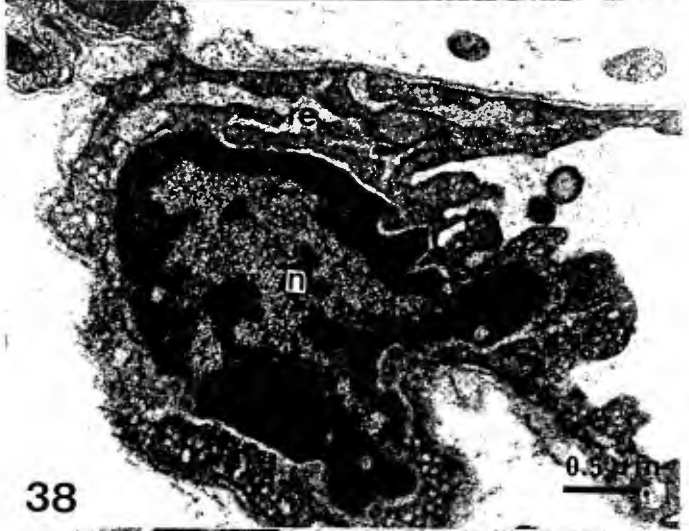
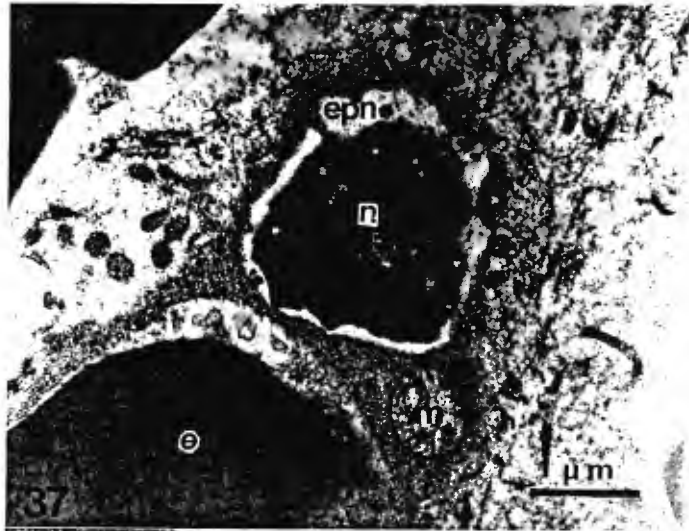
Núcleo (n) de una de las células endoteliales de un microvaso de músculo expuesto por un minuto a la toxina BaH-1, es característica la picnosis y el espacio perinuclear (epn) dilatado. Se observa además una mitocondria (m) alterada y la ausencia de la lámina basal. La membrana del endotelio, hacia el intersticio, se muestra difusa. e eritrocito (e). barra= 1 μ m.

Figura 38

Algunos núcleos (n) de microvasos expuestos a la BaH-1, en los primeros minutos, se observan con la heterocromatina agregada en la periferia y pequeñas indentaciones, es común la dilatación del espacio perinuclear y del retículo endoplásmico (re). barra= 0.5 μ m.

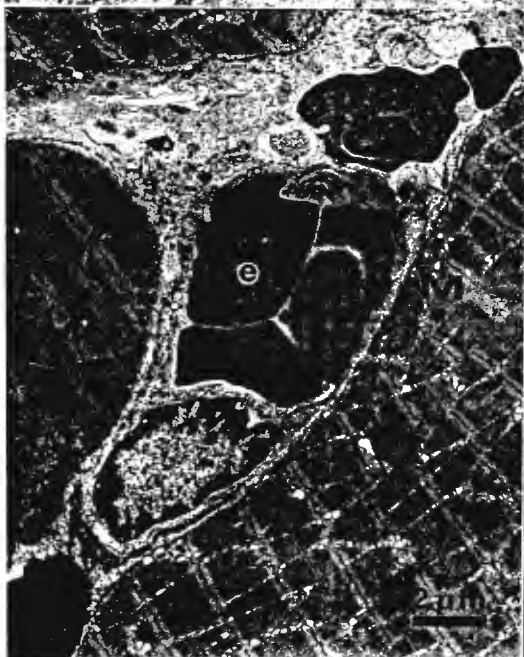
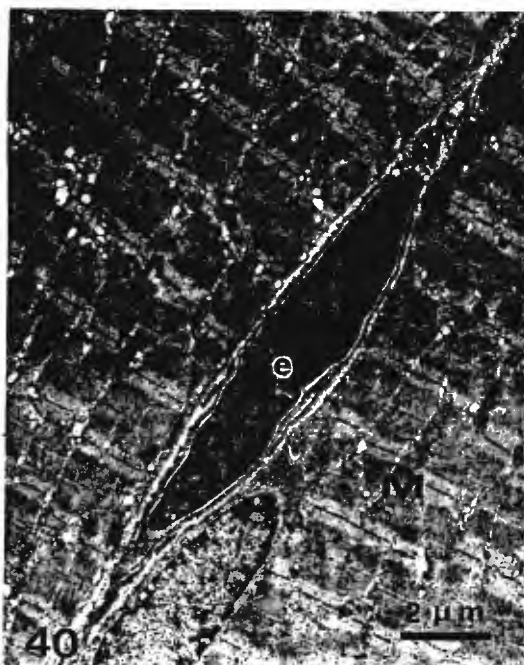
Figura 39

El retículo endoplásmico de las células endoteliales bajo el efecto de la hemorragina BaH-1 se observa generalmente dilatado desde el primer minuto de exposición. Es frecuente, además, encontrar cuerpos electrodensos (cd), poca definición de las membranas celulares así como ausencia de la lámina basal. En esta figura se observan gran número de vesículas plasmalemales (vp) a pesar de la poca definición de las membranas celulares, evento poco frecuente. barra= 0.5 μ m.



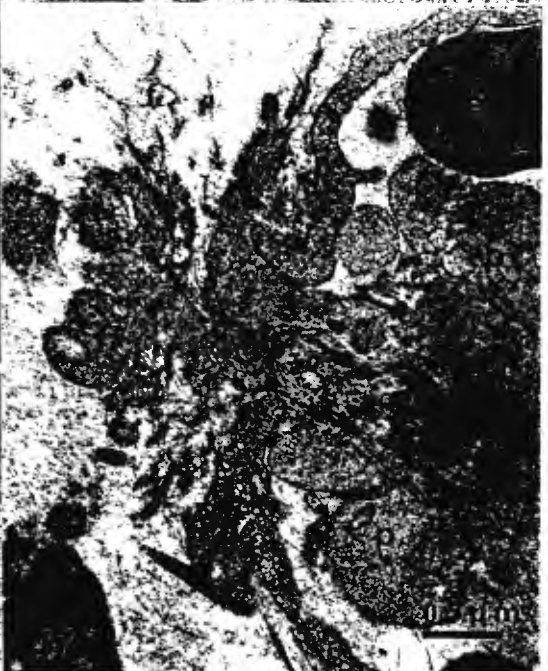
Figuras 40, 41, 42 y 43

Es signo común a todos los tiempos de exposición de los músculos a la hemorragina BaH-1: la concentración de eritrocitos (e) en los microvasos aparentando, en ocasiones, fusión de sus membranas, además de su presencia en el espacio intersticial. En el espacio intersticial es frecuente la granulación alta producto del exudado de plasma. Las porciones de fibras musculares (M) adyacentes se observan conservadas. barras 40, 41, 42 y 43= 2 μ m.



Figuras 44, 45, 46 y 47

En todos los tiempos evaluados, las plaquetas se encuentran formando trombos en los microvasos expuestos a la BaH-1 de *B. asper*, taponeando brechas creadas en el endotelio por ruptura o disolución de la célula. M fibra muscular, f fibrina, ui unión intercelular, e eritrocito. barras 44= 1 μm , 45, 46 y 47= 0.5 μm .



Figuras 48 y 49

La presencia de fibrina (f) dentro del lumen de la microvasculatura (fig. 48) así como en el espacio intersticial (fig. 49) es frecuente desde el primer minuto de exposición a la toxina BaH-1 de *B. asper*. En la fig. 49 también puede observarse plaquetas (p) aglomeradas dentro de un microvaso. barras 48 y 49= 1 μm .

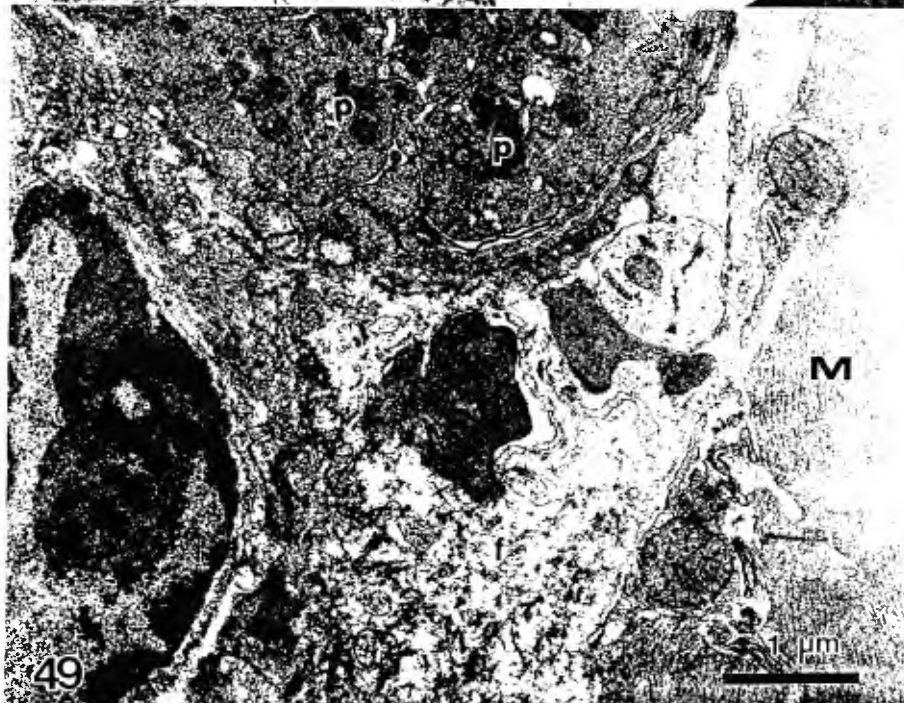
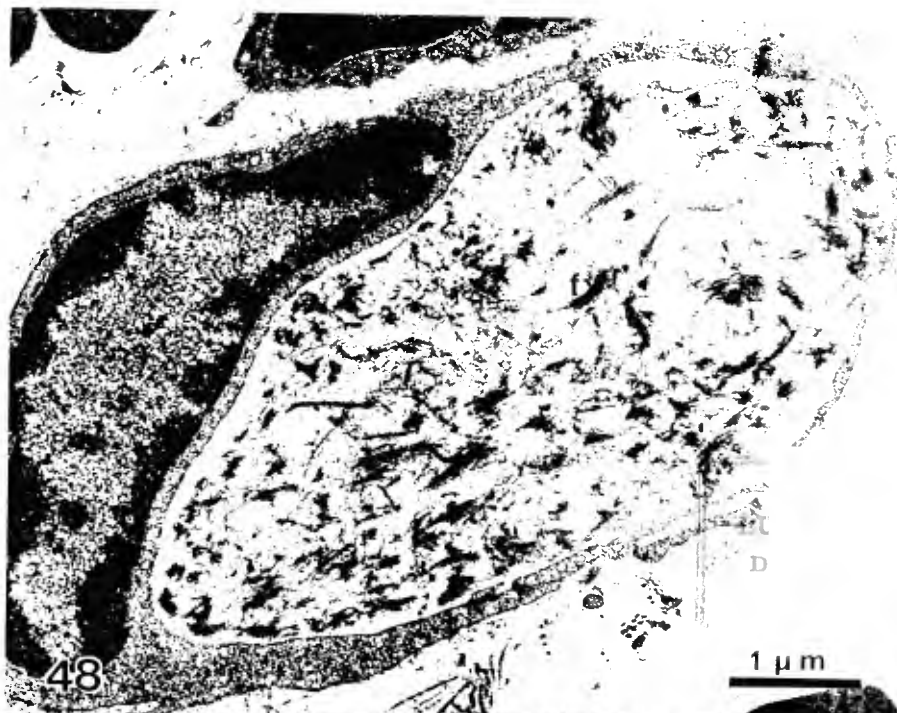


Figura 50

En A: los microvasos con alta concentración de eritrocitos se lograron observar eritrocitos (e) empujando porciones de restos celulares (cabezas de flecha) y saliendo a través de las brechas creadas en el endotelio por la disolución de la célula. En B puede observarse con mayor detalle lo mencionado. El evento se encuentra esporádicamente desde el primer minuto de exposición a la BaH-1, haciéndose más frecuente conforme transcurre el tiempo de exposición. barra A= 1 μm , B= 0.5 μm .

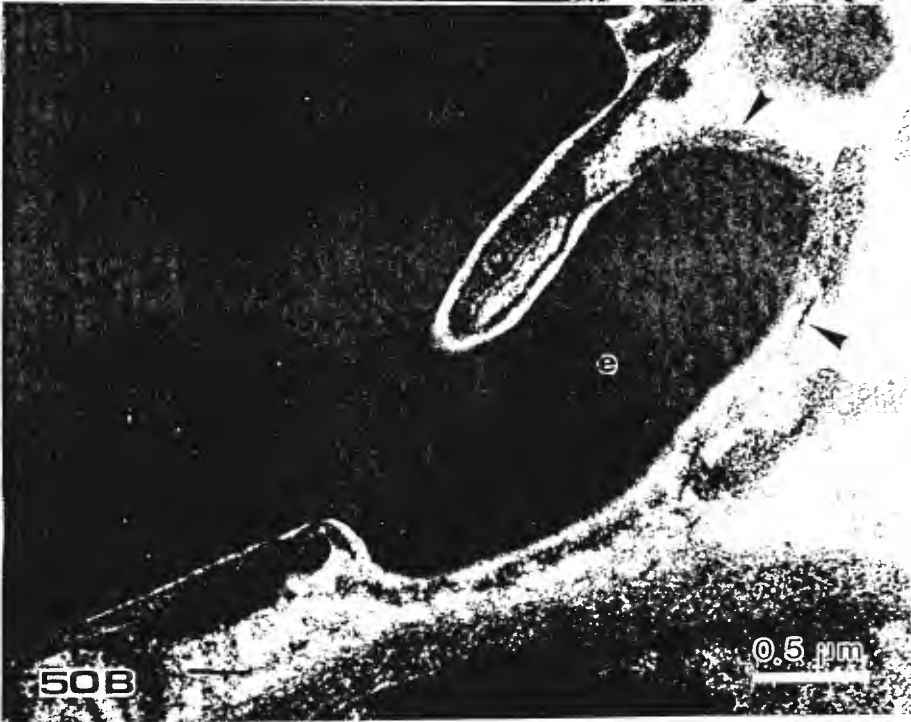
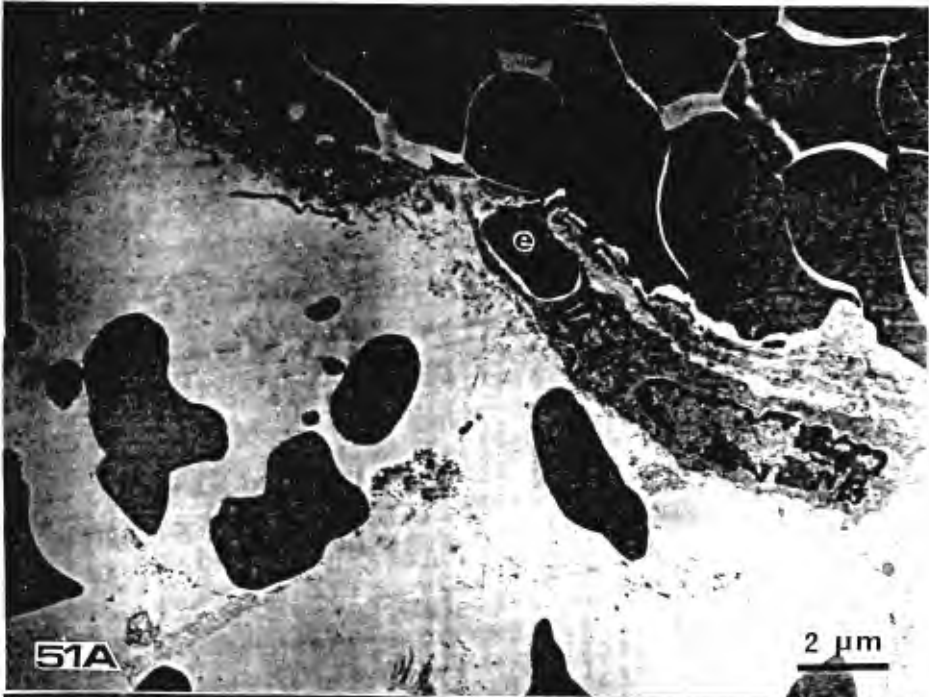


Figura 51

En los vasos de mayor calibre se lograron observar, en algunas ocasiones a los 5 y 15 minutos de exposición a la BaII-1, eritrocitos migrando entre las células endoteliales que componen la pared del vaso. Parece que la salida se produce a través de brechas en el endotelio, la cabeza de flecha señala una unión intercelular (ui) adyacente al punto que emplea el eritrocito (e) para "fugarse" del vaso. barras A= $2\mu\text{m}$, B= $1\mu\text{m}$.



CAPITULO V

DISCUSION

Independientemente del modelo experimental empleado para estudiar la patogénesis de la hemorragia, no se ha definido si el blanco de las hemorraginas es la lámina basal o las células endoteliales; aunque se han desarrollado estudios con veneno crudo (McKay *et al.* 1970, Ownby *et al.* 1978, 1990; Ownby y Geren 1987, Rahmy *et al.* 1992, Lomonte *et al.* 1994b, Borkow *et al.* 1995) y con componentes purificados con efecto hemorrágico (Bjarnason *et al.* 1988, Baramova *et al.* 1989).

Como se mencionó anteriormente, de las metaloproteasas aisladas del veneno de la especie *Bothrops asper*, cuatro son toxinas hemorrágicas: BaH-1, BH-2, BH-3 y la BaP-1 (Borkow *et al.* 1993, Gutiérrez *et al.* 1995). Todas ellas son metaloproteasas dependientes del zinc y degradan *in vitro* los componentes de la membrana basal (Borkow *et al.* 1993, Gutiérrez *et al.* 1995). La BaH-1 posee un peso molecular de 64 kD y es la hemorragina más activa del veneno de *B. asper* (Borkow *et al.* 1993), razón por la cual se empleó para el desarrollo de este estudio.

Tanto el veneno crudo de *B. asper* como su hemorragina BaH-1, inducen signos notables en las células endoteliales de las zonas afectadas por la hemorragia, como son: la disminución del número de vesículas plasmalemas (Figs. 3, 6 y 28 a 32) y la discontinuidad o ausencia de la lámina basal (Figs. 9 a 11 y 44 a 48). Fue frecuente, además, encontrar proyecciones citoplasmáticas con apariencia de gemas que se extendían hacia el lumen de los microvasos, aparentemente arrastrando parte del citoplasma (Figs. 7 y 25), lo que se traduce en un adelgazamiento de las células endoteliales (Figs. 8 y 34) que podrían originar las fracturas en su continuidad y con ello pequeñas brechas a través de las cuales pueden escapar el plasma y eritrocitos hacia el espacio intersticial. Un hallazgo similar fue descrito por Ownby *et al.* (1974) y Ownby (1975) al investigar la patogénesis de la hemorragia inducida por el veneno crudo de *Crotalus atrox*. Por tanto, la extravasación de los eritrocitos se produce por rexis, tal como lo han indicado anteriormente varios investigadores para otros venenos y toxinas (McKay 1970, Ownby *et al.* 1974, 1990; Ownby 1975, Ownby y Geren 1976).

En un intento de armonizar con los resultados que han encontrado en el pasado otras personas que trabajaron con modelos similares, debe anotarse que se observaron innumerables microvasos en los músculos inyectados con la BaH-1 en los cuales alguna de las células endoteliales presentaba edematización a tal grado que al "explotar" podrían generar las brechas (Figs. 28 a 36 y 42). En muchos de los microvasos estas células endoteliales edematizadas corresponden a pequeñas interdigitaciones de otras células endoteliales que conforman el microvaso. Estas al "estallar" y desaparecer bien podrían generar la impresión de separaciones de las uniones intercelulares, ya que los bordes de las brechas resultantes serán las uniones de las células endoteliales adyacentes. Sin argumentar que éste sea el fenómeno que haya sugerido la fuga de eritrocitos por diapedesis, está claro que se trata de venenos diferentes aún cuando provocan reacciones similares.

Por otra parte, debe considerarse que el tránsito celular no está permitido a través de cualquier tipo de microvaso, sino sólo a través de vénulas poscapilares especializadas, denominadas vénulas poscapilares de endotelio alto (Cavender 1989, Risau 1995). Bien podría ocurrir que los autores que han mencionado que la hemorragia ocurre por salida a través de las uniones intercelulares (Ohsaka *et al.* 1973, Tsuchiya *et al.* 1974), hayan trabajado con venenos o componentes de los mismos con la capacidad de inducir retracción del endotelio y separación de las uniones entre las células endoteliales de las vénulas poscapilares de endotelio alto o con un alto potencial generador de quininas que pudieran inducir la separación.

Como se mencionó los resultados obtenidos permitieron observar que la hemorragia inducida por el veneno crudo o la hemorragina BaH-1 de *B. asper* se desarrolla por rexis tal como lo plantearon Ownby *et al.* (1974, 1990) para el veneno de *C. atrox* y para una de sus hemorraginas purificada. Dado que las uniones intercelulares se observan conservadas y no parecen ser los puntos de fuga masiva para los eritrocitos, aún cuando las células endoteliales estén muy alteradas (Figs. 34 a 36). Sin embargo, es posible que en los vasos de calibre mayor, vénulas por ejemplo, la fuga o escurrimiento de algunos eritrocitos se produzca como resultado de la separación de las uniones intercelulares endoteliales, tal como se observa en la figura 51, donde aparecen eritrocitos en aparente migración entre las células endoteliales de la pared de un vaso. Por la

poca frecuencia del evento es poco probable que la hemorragia se desarrolle de esta forma; además, como han informado Lomonte *et al.* (1994b) en el proceso hemorrágico inducido por el veneno de *B. asper*, los microvasos son el blanco principal y pierden la integridad rápidamente (4 a 6 minutos) después de la exposición al veneno. Este aspecto se observa claramente para las muestras expuestas al veneno crudo de *B. asper* así como a la hemorragina BaH-1 del mismo, donde la integridad de la microvasculatura desaparece después de pocos minutos de exposición al veneno crudo y un minuto después de la exposición a la BaH-1.

Con los datos obtenidos parece que al menos la BaH-1 posee acción lítica sobre las células endoteliales de vasos de pequeño calibre y por encontrarse esta hemorragina en el veneno crudo podría suponerse que sea en parte responsable de esta acción. En forma parecida Ownby *et al.* (1974) y Ownby (1975) investigando la patogénesis de la hemorragia inducida por el veneno crudo de *C. atrox*, concluyeron que se debía a acción lítica sobre las células endoteliales. Sin embargo, para la BaH-1 no debe concluirse tan enfáticamente lo expuesto, dado que Lomonte *et al.* (1994a) y Borkow *et al.* (1995) encontraron que las células endoteliales (murinas transformadas y bovinas, respectivamente) cultivadas *in vitro* no muestran efecto citotóxico significativo al ser expuestas a esta hemorragina. El principal efecto detectado por Lomonte *et al.* (1994a) y Borkow *et al.* (1995) en las células endoteliales expuestas a la BaH-1, fue un desanclaje moderado y relativamente lento, además de cambio de forma, tornándose éstas redondas. El efecto en ambos casos es dosis-dependiente, por lo que los autores lo interpretaron como una consecuencia de la digestión proteolítica de los componentes de la matriz extracelular. En nuestro estudio el desanclaje fue observado más fácilmente en las muestras expuestas a la BaH-1 (Figs. 25 a 27), fue claro en muchas ocasiones que el espacio entre la célula endotelial y la lámina basal se encontraba dilatado. Sin embargo, en ambos tipos de exposiciones se observaron restos de células endoteliales dentro del lumen de los microvasos o formando parte de tapones con plaquetas, fibrina y eritrocitos. Lo que puede interpretarse como la descamación de las células endoteliales dañadas, mencionada por varios autores (Mason *et al.* 1980, Reidi y Schwartz 1984)

Además, los datos suministrados por Lomonte *et al.* (1994a) y Borkow *et al.* (1995) alteran en buena medida las conclusiones que pudieran hacerse sobre la

acción de las hemorraginas, basándose sólo en su efecto sobre las células blanco, tal es el caso de la miotoxina II de *B. asper* que *in vitro* es citotóxica para las células endoteliales cultivadas y sin embargo al inyectarse en ratones, induce alteraciones musculares importantes sin inducir hemorragia (Lomonte y Gutiérrez 1989).

Por otra parte, el lipopolisacárido (LPS) de *Salmonella typhimurium* (cepa C5) induce lesiones en el endotelio de vénulas poscapilares intestinales (Koshi *et al.* 1993) similares a nuestras observaciones, donde los primeros cambios degenerativos asociados fueron la formación de ampollas en la membrana luminal, cuando el daño se consideraba mayor la electrodensidad del citoplasma disminuía y algunas organelas, como mitocondrias, retículo endoplásmico rugoso y aparato de Golgi aparecían dilatadas; además los núcleos degeneraban a picnóticos. Las células endoteliales de la pared de las vénulas se desanclaban, producto del edema subendotelial, observándose células endoteliales o fragmentos de éstas, con proyecciones citoplasmáticas, libres en el lumen de los vasos. Grupos de plaquetas envuelven a la membrana basal expuesta por las células endoteliales desancladas.

Araki y colaboradores (1993) expusieron cultivos de células endoteliales de venas umbilicales humanas a venenos de *C. atrox*, *Vipera ammodytes*, *Agkistrodon halys-blomhottii*, *Bitis arietans* y *Trimeresurus flavoviridis* (especies de serpientes que inducen hemorragia) y encontraron en las células cambios morfológicos característicos del proceso de muerte celular por apoptosis. Sin embargo, al probar con venenos neurotóxicos de serpientes, como la cobra, el patrón de muerte celular correspondió a necrosis.

Revisando el patrón de cambios morfológicos que Arends *et al.* (1990) mencionan como los eventos que caracterizan la muerte celular por apoptosis, se encuentra que en ésta se da la condensación de la cromatina en la periferia nuclear, la desintegración nucleolar y reducción del núcleo; además se produce disminución del volumen celular total, aumento de la densidad celular, compactación de las organelas citoplasmáticas y dilatación del retículo endoplásmico pero sin alteraciones en las mitocondrias. Posteriormente, se desprenden del núcleo y citoplasma pequeños cuerpos rodeados de membrana, denominados cuerpos

apoptóticos. Finalmente se produce degeneración progresiva de las estructuras residuales del núcleo y citoplasma.

Sin embargo, Trump y Berezsky (1995) mencionan que aunque el término apoptosis en el pasado se igualó a muerte celular programada, ahora está claro que el término se debe emplear para referirse a un conspicuo patrón de cambio preletal, el cual ocurre tanto fisiológica como patológicamente. Según estos autores los cambios tempranos reversibles después de un daño letal involucran el ampollamiento o "blebbing" del citoplasma, la aglomeración de la cromatina, dilatación moderada del retículo endoplásmico y del Aparato de Golgi, con mitocondrias normales o condensadas. Estos cambios son comunes a todos los tipos de progresión de muerte celular. En el caso de la apoptosis la aglomeración de la cromatina con frecuencia es más pronunciada, el citoplasma se condensa o adelgaza en lugar de edematizarse, la condensación del citoplasma involucra a la vez aumento en la densidad, además las ampollas con frecuencia contienen organelas como mitocondrias, peroxisomas o porciones de retículo endoplásmico.

Si se considera la descripción de eventos de Arends *et al.* (1990) los cambios encontrados en las células endoteliales de los músculos expuestos al veneno crudo y la hemorragina BaH-1 de *B. asper* son más compatibles con un patrón de necrosis que con el de apoptosis, ya que la degeneración nuclear prevalente en las células endoteliales es de tipo picnótico (Figs. 8 y 37). Además, las mitocondrias se encontraron edematosas y con las crestas rotas (Figs. 3, 8, 37 y 50). Sin embargo, aunque no se presentaron los cuerpos apoptóticos desprendiéndose del núcleo, se observaron las ampollas o gemaciones del endotelio (Figs. 4 a 7, 24 y 25) mencionadas por Trump y Berezsky (1995) como signos comunes a todos los tipos de cambios celulares en la progresión de la muerte celular. Además, en la gemación inducida por el veneno crudo se observaron tanto células endoteliales con ampollas que no incluían organelas (Fig. 4) mientras que en otras contenían mitocondrias (Fig. 7). Como añaden Trump y Berezsky (1995) tanto en la muerte celular accidental como en la programada las ampollas o "blebs" se desprenden de la membrana (la plasmalema se sella sin provocar muerte celular) luego éstos son fagocitados por células adyacentes o en el caso de las células que tapizan cavidades se desprenden hacia los espacios extracelulares, lúmenes de los canalículos biliares o nefrones, etc. En nuestros

experimentos observamos claramente la formación de las ampollas hacia el lumen de la microvasculatura (Figs. 4 a 7, 24 y 25).

La formación de "blebs" parece deberse a la ruptura de las interacciones entre el citoesqueleto y la membrana. Se ha especulado que esta ruptura se debe a la degradación de las proteínas del citoesqueleto asociadas a la membrana por proteasas neutras activadas por Ca^{+2} o a la activación de las fosfolipasas por el Ca^{+2} v la subsecuente liberación de ácidos grasos. además de cambios conformacionales en las proteínas del citoesqueleto (tubulina, actina) y las proteínas de anclaje de la actina (vinculina, talina y fodrina). Algunas de las alteraciones como la despolimerización de los microtúbulos resulta del aumento de la concentración intracelular del calcio iónico. $[\text{Ca}^{+2}]_i$. mientras otras alteraciones son inducidas por la activación de proteasas por el Ca^{+2} que degradan las proteínas de anclaje de la actina (Trump y Berezsky 1995).

En los microvasos expuestos a veneno crudo de terciopelo o a la BaH-1 también se observó reducción del grosor de las células endoteliales y aumento de la electrodensidad celular (Figs. 8 y 33), lo que se atribuyó a la pérdida del material citoplasmático por la gemación (Figs. 4 a 7, 24 y 25). Sin embargo, Trump y Berezsky (1995) mencionan que aunque no se ha determinado qué produce la condensación citoplasmática, consideran que ésta puede resultar de la pérdida de algún ion, tal como el Cl^- , acompañado por agua. Esto podría generarse al aumentar la concentración intracelular ($[\text{Ca}^{+2}]_i$) lo que activaría canales de Cl^- dependientes de Ca^{+2} , los cuales se encuentran involucrados en la regulación del volumen celular.

En nuestro caso también se observaron células endoteliales con edema celular (Figs. 11, 12 y 28 a 30) que caracterizan algunas lesiones calificadas como necróticas (Cotran y Robins 1990). No fue posible observar el nucleolo en las células endoteliales de vasos en músculos sin inyectar con veneno o la BaH-1 (controles), por lo tanto no puede afirmarse que su ausencia en los músculos inyectados se debiera a desintegración. El retículo endoplásmico se observó dilatado en ambos tipos de tratamientos: veneno crudo y BaH-1 (Figs. 3 y 35, respectivamente).

Dado que se encontraron células endoteliales con patrones de condensación y de edematización, es de sospechar que se originen dos tipos de patrones de muerte celular inducidas y las cuales son difíciles de encasillar como evento desencadenado por la BaH-1 o el veneno crudo o bien que éstos induzcan a otros agentes, produciéndose la lesión celular en el endotelio de manera indirecta.

Las plaquetas presentan forma discoide en estado de "reposo o patrullaje"; por lo tanto, su forma es un índice del estado fisiológico del endotelio o bien de la presencia de agentes que las activan. Al percibir algún estímulo, además de cambiar su forma, se vuelven adherentes (Kini y Evans 1990). En el caso del músculo inyectado con veneno crudo y con la BaH-1 se observaron plaquetas, morfológicamente activas, formando agregados en el lumen de la microvasculatura y taponeando brechas en el endotelio de capilares y poscapilares (Figs. 16 y 47). Además, de la formación del trombo, las plaquetas activadas facilitan la activación de los factores de coagulación (Kini y Evans 1990). Entre ellos la fibrina, que se evidenció en el espacio extravascular desde los 5 minutos de exposición al veneno crudo de *B. asper* (Fig. 14) y al minuto de la inoculación de la hemorragina BaH-1 (Figs. 48 y 49).

Wong y Gotlieb (1990) informaron los efectos sobre la forma celular y los filamentos de actina de las células endoteliales de aorta torácica cultivadas en monocapas confluentes, al ser expuestas a trombina, plasmina y tripsina. Las células endoteliales alteraron su forma en todos los casos, con la trombina cambiaron su forma poligonal típica en cultivos confluentes a una forma alargada, mientras que en los cultivos expuestos a plasmina, tripsina y quimotripsina las células se separaron unas de otras formando brechas entre ellas, se tornaron redondas y al continuar la exposición a estas enzimas se producía desanclaje, el cual progresó hasta completarse. La velocidad de las respuestas siempre fue dependiente de la dosis. Según estos autores, las células expuestas a trombina sufren reorganización rápida de los microfilamentos de actina, éstos se vuelven más cortos, la vinculina desaparece de la interfase célula-célula y la miosina lo hace de la periferia celular. Por otra parte, Rowland *et al.* (1984) habían informado que algunos péptidos liberados durante la formación de la fibrina generan retracción de las células endoteliales. Además, según Maruyama *et al.* (1992) la plasmina es una enzima que *in vivo* puede potenciar la degradación de la lámina basal y la matriz del tejido conectivo.

Es probable, entonces, que los efectos que inicialmente puedan ser inducidos por las hemorraginas sobre la lámina basal de la microvasculatura, sean potenciados a su vez por los factores que se desencadenan para intentar restablecer la homeostasis.

El endotelio también produce sustancias que pueden aumentar el tono vascular o liberar vasoconstrictores y que además son pro-trombogénicos. Estas sustancias proinflamatorias tienden a promover la isquemia y con ello el daño celular. Entre ellas se encuentran las endotelinas, el factor activante de las plaquetas y el radical superóxido. El factor activante de las plaquetas (PAF) es un fosfolípido ubicuo el cual una vez liberado induce vasodilatación, mediante un mecanismo no comprendido aún y puede involucrar la liberación de eicosanoides (como PGI₂) u otros vasodilatadores. El PAF es un potente inductor de la agregación plaquetaria, activa polimorfonucleares y aumenta la permeabilidad vascular, por tanto promueve otras acciones proinflamatorias (Lefer y Lefer 1993). Si se considera que el daño inicial a las células endoteliales genera la liberación de PAF, este a su vez potenciará la acumulación de plaquetas en el endotelio.

El efecto de la hemorragina BaH-1 se diferencia del efecto del veneno crudo en el tiempo de aparición de la fibrina (1 minuto y 5 minutos, respectivamente) y en que además de inducir la aparición de proyecciones citoplasmáticas con apariencia de gemaciones, se presentaron figuras anulares de doble membrana (Figs. 21 a 23). Unas estructuras similares a éstas fueron descritas en el epitelio pulmonar de hamsters expuestos a elastasa pancreática porcina (Morris *et al.* 1981, 1986), y en el endotelio y lumen de la microvasculatura pulmonar murina al suministrar intravascularmente la proteasa hemorrágica BaP-1 (Toledo 1994, datos sin publicar) aislada del veneno de la terciopelo (Gutiérrez *et al.* 1995). También se han encontrado en la microvasculatura muscular al inyectar ratones intravascularmente con esta última proteasa (Herdoiza 1994, datos sin publicar).

La inoculación de la BaH-1 también provocó fenestración en algunas células endoteliales de la microvasculatura muscular murina (Fig. 24); este evento no ha sido informado en ninguna de las experiencias semejantes a ésta empleando ya sea veneno crudo o hemorraginas de crotálicos o vipéridos. Sin embargo, un hallazgo similar e inesperado fue informado por Roberts y Palade (1995) al

estudiar el efecto del factor de crecimiento de endotelio vascular (VEGF) sobre la permeabilidad de los microvasos en músculo y piel de ratas y ratones desnudos. La fenestración atípica en microvasos se ha informado asociado con la cicatrización de músculo esquelético (McKinney *et al.* 1977) y en las lesiones de la psoriasis (Bravermann y Yen 1977). Roberts y Palade (1995) mencionan que la fenestración puede originarse al fusionarse los agregados de vesículas plasmalemales dilatadas con la membrana plasmática. Estos agregados de vesículas dilatadas fueron designadas por Kohn *et al.* (1992) como "organelas vesículo-vacuolares", al encontrarlas asociadas a la microvasculatura de tumores. Este tipo de agregados los encontramos en los microvasos expuestos tanto al veneno crudo (Fig. 6) como a la hemorragina BaH-1 de terciopelo (Figs. 33 y 39).

La integridad del endotelio es requisito absoluto para mantener el estado no trombogénico de los vasos sanguíneos (Zweifach 1980) y esta integridad, tanto estructural como funcional, depende de la firmeza del anclaje de las células endoteliales a la matriz extracelular, lograda por el establecimiento de interacciones célula-célula y célula-matriz a través de receptores tipo integrinas (Sugrue y Hay 1981, Young y Herman 1985, Albelda y Buck 1990, Chen y Hawigen 1991, Lampugnani *et al.* 1991, Denis *et al.* 1993, Shiramarao *et al.* 1993). Es de suponer que el desprendimiento de las células endoteliales provocado en los músculos inyectados con el veneno crudo y la hemorragina de *B. asper* (Fig. 19) y que también ha sido informado en otras patologías (Reidi y Schwartz 1984, Ross 1986, Koshi *et al.* 1993) sea producto de la degradación o alteración de algunas de las integrinas o bien del sustrato al cual se anclan. Esto último es muy posible, dado que la lámina basal frecuentemente se observa alterada, discontinua o desaparece en los microvasos de músculos inyectados y que presentaban hemorragia (Ownby *et al.* 1974, 1976, Ownby y Geren 1987, Rahmy *et al.* 1992, Rosenberg *et al.* 1993).

Baramova *et al.* (1989) consideran que siendo las proteínas de la matriz extracelular tan importantes para mantener la integridad estructural o funcional tanto de la matriz extracelular como de la microvasculatura, puede suponerse que la degradación de los componentes por las proteasas hemorrágicas podría ser el mecanismo principal de la hemorragia asociada con el envenenamiento por crotálicos. Sin embargo, Maruyama *et al.* (1992) han mencionado que aunque se asuma que la degradación de la lámina basal vascular sea la principal causa de la

hemorragia luego del envenenamiento por crotálicos o vipéridos, no se encuentra claro si esta degradación sea el efecto proteolítico directo de los factores hemorrágicos del veneno de las serpientes o por proteasas activadas secundariamente por la víctima, luego del envenenamiento, o bien que la degradación de la membrana basal se produzca por una combinación de ambos mecanismos. Debe recordarse que todos los organismos poseemos en la matriz extracelular proteasas encargadas de los procesos de remodelación. Cuando la matriz extracelular es expuesta a proteasas exógenas es probable que las proteasas endógenas colaboren y potencien la digestión o alteración de las proteínas, ayudando a la desintegración de la membrana basal y permitiendo así el colapso de la pared de la microvasculatura, lo que lleva al escape de eritrocitos y plasma hacia el tejido circulante (Bjarnason *et al.* 1988). De hecho Ohsaka *et al.* (1973) y Tsuchiya *et al.* (1974) mencionan que la hemorragia por diapedesis se da luego de la separación de las uniones y la degradación total o parcial de la lámina basal.

Tal como mencionan Bjarnason y Fox (1988/1989) algunas toxinas podrían inducir hemorragia por un mecanismo proteolítico directo, además de activar la acción lítica de las enzimas presentes en el sistema. Se ha propuesto que los mecanismos que llevan a la alteración de la lámina basal pueden activarse por la liberación de metaloproteasas por parte de la célula endotelial estimuladas por una gran variedad de agentes, tales como radicales libres, el C5a de la vía del complemento y la fibrina o la plasmina, entre otros. Las alteraciones pueden estimular la liberación de las metaloproteasas o bien actuar sobre los inhibidores tisulares de las metaloproteasas (TIMPs) (Murphy *et al.* 1992).

En el caso de la hemorragia inducida por la BaH-1, que además es capaz *in vitro* de degradar algunos de los componentes de la lámina basal (Borkow *et al.* 1993), es fácil pensar que el daño a la lámina basal sea potenciado *in vivo* por el desencadenamiento de otros factores (C5a, radicales libres, etc.) en vista de la rapidez con que ocurren los eventos, como indican estos datos, ya que la hemorragia se detecta tan sólo 1 minuto después de la exposición del músculo a la toxina.

Rosenberg y colaboradores (1993) al estudiar la hemorragia inducida por una colagenasa bacteriana en cerebro de rata, encontraron que el tejido en la periferia

de la lesión mostraba características propias de la destrucción de la matriz extracelular, como dilatación de la lámina basal capilar y de los espacios perivasculares; mientras que en otros capilares parecía haber un severo daño de la matriz con discontinuidad de la lámina basal y adelgazamiento de las células endoteliales. Con frecuencia los autores observaron eritrocitos en los espacios perivasculares, pero el sitio de tránsito no estuvo claro. Por el rápido desencadenamiento del daño sugirieron que la enzima actuaba directamente sobre el tejido cerebral más que inducir a otras enzimas, o que el daño se debía a las enzimas proteolíticas de los leucocitos que se infiltraban en la zona. Sin embargo, no descartaron que toxinas endógenas liberadas tempranamente en el sitio de daño, como glutamato, óxido nítrico o radicales libres, también participan en el daño (Rosenberg *et al.* 1993).

Por otra parte, Lafrenie *et al.* (1992) informaron que células endoteliales cultivadas *in vitro* y expuestas a peróxido de hidrógeno o sistemas generadores de éste, se retraen y presentan degradación de la matriz subendotelial. Sin embargo, cuando se ha removido la monocapa celular con Triton X-100 y EDTA antes de la exposición al peróxido de hidrógeno, la matriz subendotelial no se observa alterada. Se hace, por lo tanto, probable que algunos eventos que puedan desencadenarse por los componentes del veneno, incluyendo en estos a la hemorragina BaH-1, disparen una serie de eventos en el endotelio de los microvasos que lleven a la alteración posterior de la membrana basal sin ser el veneno de serpiente o sus componentes los únicos responsables directos de las alteraciones.

CAPITULO VI

CONCLUSIONES

En los tejidos de los animales control (inyectados con amortiguador de fosfatos salino) no se encontró ninguna de las alteraciones que se observaron en los animales inyectados con el veneno completo o la BaH-1, como se resume a continuación.

Tanto el veneno crudo de *Bothrops asper* como su hemorragina BaH-1, inducen en el endotelio de los microvasos musculares murinos la desaparición, parcial o total, de las vesículas plasmalemas. En ambos casos el fenómeno es evidente desde los primeros minutos posinoculación y se acentúa conforme conforme avanza el tiempo de exposición.

El endotelio de los microvasos puede encontrarse edematizado o adelgazado, en grados variables, acompañando a cada uno de estos patrones de degeneración el aumento o la disminución de la electrodensidad, respectivamente. Los microvasos pueden mostrar patrones homogéneos de uno de estos tipos de alteración, o bien patrones mixtos en los cuales se pueden observar diferentes relaciones de células endoteliales con uno u otro patrón.

La "gemación" del endotelio es uno de los primeros signos observados con mucha frecuencia en los microvasos del músculo expuesto al veneno crudo o a la hemorragina BaH-1. Las vesículas siempre parecen arrastrar contenido citoplasmático y nunca se asocian a patrones de endotelio edematizado. Se observó la presencia de mitocondrias en algunas de las gemaciones, el fenómeno es considerado parte del proceso de muerte celular.

Los "anillos" encontrados solamente en el endotelio de los microvasos expuestos a la BaH-1, son proyecciones similares a digitaciones que por su longitud y probablemente la influencia de los fluidos dentro de la microvasculatura parece que tienden a formar estructuras con forma de lazo. Estos, lo mismo que las proyecciones o "gemaciones", ayudan a la pérdida de citoplasma en el endotelio.

Las uniones intercelulares en el endotelio expuesto tanto a veneno crudo como a la hemorragina BaH-1 de *B. asper* son retenidas aún cuando las células que la conformen se encuentren muy alteradas. No se observaron uniones intercelulares separadas dando paso a plasma o eritrocitos a través de ellas en ninguno de los dos envenenamientos inducidos.

La ruptura de células endoteliales es común a todos los tiempos en ambos tipos de pruebas considerándose estos puntos como los medios de salida de eritrocitos y plasma. Los puntos de ruptura parecen originarse de dos maneras: adelgazamientos pronunciados en el endotelio o células endoteliales completas que se edematizan a alto grado y al "estallar" originan la brecha. Otros puntos potenciales de ruptura pueden ser el retículo endoplásmico y las mitocondrias dilatadas, presentes en los endotelios con alto grado de adelgazamiento o condensación.

Las células endoteliales se observan alteradas siempre que su lámina basal se encuentre alterada (difusa o discontinua) o ausente. Pueden encontrarse células alteradas con lámina basal de apariencia normal pero nunca se observa lo contrario.

Las organelas de las células endoteliales en ambos casos de envenenamientos se encontraron alteradas desde los primeros tiempos de exposición a las toxinas. En el caso de los núcleos la heterocromatina con distribución homogénea se observó solo en el caso de los 5 minutos de exposición al veneno crudo. La heterocromatina condensada es común a partir del primer minuto con BaH-1, mientras que con el veneno crudo se observa con mayor frecuencia a partir de los 15 minutos. La dilatación variable del espacio perinuclear se observó en todos los tiempos evaluados. Los núcleos picnóticos se encontraron a partir del primer tiempo de exposición al agente evaluado. Aumentando su frecuencia con el tiempo de exposición. Su presencia hace sospechar que el tipo de muerte celular observado para los microvasos que lo presentan es la necrosis.

Tanto el retículo endoplásmico como las mitocondrias se observaron con grados variables de dilatación. Las mitocondrias se encontraron con las crestas rotas pero sin la presencia de cristales.

En el lumen de los microvasos expuestos a BaH-1, se pudo encontrar en todos los tiempos observados la congestión por eritrocitos, restos celulares, fibrina y tapones de plaquetas. En el espacio intersticial además se encontraba el exudado plasmático. Los eritrocitos mostraron alteración en la forma y se encontraron algunos pocos fantasmas de eritrocitos en todos los tiempos evaluados. Los leucocitos en el lumen e intersticio se observan a partir de los 5 minutos, aumentando la frecuencia de observación con el tiempo de exposición. En el caso del veneno crudo su presencia se hace evidente a partir de los 30 minutos de exposición al veneno. Hay diferencia en la observación de la fibrina en ambos tipos de tratamientos, para el veneno crudo se apreció en el lumen del microvaso más tarde que para BaH-1 (15 min vs 1 min), en el espacio intersticial mientras que para BaH-1 se encuentra desde el primer minuto con el veneno crudo se encontró a los 5 minutos posinoculación y luego se le encuentra de nuevo a partir de los 30 minutos.

Las plaquetas nunca se observaron con la forma lenticelar, la presencia de pseudopodos fue lo típico en todos los tiempos y para los dos tratamientos. Se les observó asociadas a brechas o segmentos del endotelio alterados, además de formando trombos con eritrocitos y fibrina. Se les observó en el intersticio sólo si la brecha en el endotelio era relativamente grande o si no podía encontrarse ya la zona delimitada por el endotelio.

De las observaciones logradas se concluye que ambos tipos de tratamiento inducen alteraciones similares en el endotelio.

No se puede asegurar, para ninguno de los dos tratamientos, que se produzca solo un tipo de muerte celular, parece que al menos se presentan dos patrones de muerte que inducen, independientemente, edema y condensación del citoplasma. El tipo de progresión de los eventos de muerte de cada célula endotelial es independiente de los de sus compañeras en el microvaso. Esto es, el que una célula sufra el patrón de edema no significa que todas las que conforman el microvaso desarrollen edema, aunque puede ocurrir y viceversa. Es por ello que los microvasos muestran patrones mixtos de degeneración.

Lo anterior hace difícil establecer de qué forma directa alteran los componentes del veneno crudo de *B. asper*, así como la hemorragina BaH-1. Parece más

probable que la alteración de las células endoteliales se desarrolle como producto de otros mecanismos. Entre ellos la alteración de la membrana basal, ya sea directamente por los componentes de los venenos o la inducción de otros medios, como la activación de metaloproteasas endógenas. En el caso de que los componentes de membrana basal sean el blanco para estos venenos y que a partir de su alteración se desarrollen los eventos que desencadenan tan rápidamente la hemorragia, queda por dilucidar si son solamente las metaloproteasas de los venenos de crotálidos y vipéridos son las que responsables del desarrollo de los eventos, o si ellas inducen a otros para las alteraciones. Para lograr entender el mecanismo de acción se hace necesario conocer cuáles y de qué tipo son las desintegraciones o alteraciones en la membrana basal inducidas propiamente por las metaloproteasas hemorrágicas.

BIBLIOGRAFIA

- Abrahamson DR. 1986. Recent studies on the structure and pathology of basement membranes. *J. Pathol.* 149: 257-278.
- Albelda SM & Buck CA. 1990. Integrins and other cell adhesion molecules. *FASEB J.* 4: 2868-2880.
- Aragón F & Gubensek F. 1978. Characterization of thrombin-like proteinase from *Bothrops asper* venom. In Rosenberg P (Eds.). *Toxins: Animal, Plant and Microbial*. Pergamon Press, Oxford. pp107-111.
- Aragón F & Gubensek F. 1987. Characterization of a metalloproteinase from *Bothrops asper* (terciopelo) snake venom. *Toxicon* 25: 759-766.
- Araki S, Ishida T, Yamamoto T, Kaji K & Hayashi H. 1993. Induction of apoptosis by hemorrhagic snake venom in vascular endothelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 190: 148-153.
- Arce V, Brenes F & Gutiérrez JM. 1991. Degenerative and regenerative changes in murine skeletal muscle after injection of venom from the snake *Bothrops asper*: A histochemical and immunocytochemical study. *Int. J. Exp. Pathol.* 72: 211-226.
- Arends MJ, Morris GR & Willie AH. 1990. Apoptosis. *Am. J. Pathol.* 136: 593-608.
- Arroyo O & Cerdas L. 1984. Estudio ultraestructural de las alteraciones locales inducidas en ratón blanco por el veneno de *Bothrops picadoi* de Costa Rica. *Toxicon* 22: 301-305.
- Arroyo O & Gutiérrez JM. 1981. Estudio ultraestructural de la mionecrosis inducidas en ratón por el veneno de terciopelo (*Bothrops asper*) de Costa Rica. *Toxicon* 19: 773-782.
- Assakura MT, Reichl AP & Mandelbaum FR. 1986. Comparison of immunological, biochemical and biophysical properties of three hemorrhagic factors isolated from the venom of the snake *Bothrops jararaca* (jararaca). *Toxicon* 24: 943-946.
- Assakura MT, Reichl AP, Asperti MC & Mandelbaum FR. 1985. Isolation of the major proteolytic enzyme from the venom of the snake *Bothrops moojeni* (caissaca). *Toxicon* 23: 691-706.
- Baramova EN, Shannon JD, Bjarnason JB & Fox JW. 1989. Degradation of extracellular matrix proteins by hemorrhagic metalloproteinases. *Arch. Biochem. Biophys.* 275: 63-71.
- Bjarnason JB & Fox JW. 1987. Characterization of two hemorrhagic zinc proteinases, toxin c and toxin d, from western diamondback rattlesnake (*Crotalus atrox*) venom. *Biochim. Biophys. Acta* 911: 356-363.

- Bjarnason JB & Fox JW. 1988/1989. Hemorrhagic toxins from snake venoms. *J. Toxicol-Toxin Rev.* 7: 121-209.
- Bjarnason JB & Tu AT. 1978. Hemorrhagic toxins from western diamondback rattlesnake (*Crotalus atrox*) venom: isolation and characterization of five toxins and the role of zinc in hemorrhagic toxin e. *Biochem.* 17: 3395-3404.
- Bjarnason JB, Hamilton D & Fox JW. 1988. Studies on the mechanism of hemorrhage production by five proteolytic hemorrhagic toxins from *Crotalus atrox* venom. *Biol. Chem.* 369: 121-129.
- Bolaños R. 1982. Las serpientes venenosas de Centroamérica y el problema del ofidismo. I: Aspectos zoológicos, epidemio-lógicos y biomédicos. *Rev. Cost. Cienc. Méd.* 3: 165-184.
- Bolaños R. 1984. Serpientes, venenos y ofidismo en Centroamérica. Editorial Universidad de Costa Rica. San José, Costa Rica. 136 p.
- Borkow G, Gutiérrez JM & Ovadia M. 1993. Isolation and characterization of synergist hemorrhagine from the venom of the snake *Bothrops asper*. *Toxicon* 31: 1137-1150.
- Borkow G, Gutiérrez JM & Ovadia M. 1995. *In vitro* activity of BaH-1, the main hemorrhagic toxin of the *Bothrops asper* snake venom on bovine endothelial cells. *Toxicon* 33: 1387-1391.
- Braverman IM & Yen A. 1977. Ultrastructure of the capillary loops in the dermal papillae of psoriasis. *J. Invest. Derm.* 68: 53-60.
- Bundgaard M. 1991. The three-dimensional organization of smooth endoplasmic reticulum in capillary endothelia: its possible role in regulation of free cytosolic calcium. *J. Struct. Biol.* 107: 76-85.
- Cavender DE. 1989. Lymphocyte adhesion to endothelial cells *in vitro*: models for the study of normal lymphocyte recirculation and lymphocyte migration into chronic inflammatory lesions. *J. Invest. Dermatol.* 93: 885-955.
- Chavés F, Barboza M & Gutiérrez JM. 1995. Pharmacological study of edema induced by venom of the snake *Bothrops asper* (terciopelo) in mice. *Toxicon* 33: 31-39.
- Chen CS & Hawigen J. 1991. Reactivity of synthetic peptide analogs of adhesive proteins in regard to the interaction of human endothelial cells with extracellular matrix. *Blood* 77: 2200-2206.
- Cotran RS, Kumar V & Robbins SL. 1990. Patología estructural y funcional. Trad. de: *Pathologic Basis of Disease*. IV Ed. McGraw-Hill, España.
- Denis C, Williams JA, Lu X, Meyer D & Baruch D. 1993. Solid-phase von Willebrand Factor contains a conformationally active RGD motif that mediates endothelial cell adhesion through the α v β 3 receptor. *Blood* 82: 3622-3620.

- Fabiano RJ & Tu AT. 1981. Purification and biochemical study of viriditoxin, tissue damaging toxin, from Prairie Rattlesnake venom. *Biochemistry* 20: 21-27.
- Fletcher JE & Jiang MS. 1995. Presynaptically acting snake venom phospholipase A₂ enzymes attack unique substrates. *Toxicon* 33: 1565-1576.
- Francis B & Kaiser I. 1993. Inhibition of metalloproteinases in *Bothrops asper* venom by endogenous peptides. *Toxicon* 31: 889-899.
- Francis B, Seebart C & Kaiser I. 1992. Citrate is an endogenous inhibitor of snake venom enzymes by metal-ion chelation. *Toxicon* 30: 1239-1246.
- Freitas MA, Geno PW, Summer LW, Cooke ME, Hudiburg S, Ownby, CL, Kaiser I & Odell GV. 1992. Citrate is a major component of snake venom. *Toxicon* 30: 461-464.
- Friederick C & Tu AT. 1971. Role of metals in snake venoms for hemorrhagic, esterase and proteolytic activities. *Biochem. Pharmacol.* 20: 1549-1556.
- Gleason ML, Odell GV & Ownby CL. 1983. Isolation and biological activity of viriditoxin and a viriditoxin variant from *Crotalus viridis viridis* venoms. *J. Toxicol-Toxin Rev.* 2: 235-265.
- Goldstein GW. 1979. Pathogenesis of Brain Edema and hemorrhage: role of the brain capillary. *Pediatrics* 64: 357-360.
- Gutiérrez JM & Chaves F. 1980. Efectos proteolítico, hemorrágico y mionecrótico de los venenos de serpientes costarricenses de los géneros *Bothrops*, *Crotalus* y *Lachesis*. *Toxicon* 18: 315-321.
- Gutiérrez JM & Lomonte B. 1989. Local tissue damage induced by *Bothrops* snake venoms. *Mem. Inst. Butantan.* 51: 211-223.
- Gutiérrez JM & Lomonte B. 1995. Phospholipase A₂ myotoxins from *Bothrops* snake venoms. *Toxicon* 33: 1405-1424.
- Gutiérrez JM, Arroyo O & Bolaños R. 1980. Mionecrosis, hemorragia y edema inducidos por el veneno de *Bothrops asper* en ratón blanco. *Toxicon* 18: 603-610.
- Gutiérrez JM, Chaves F, Bolaños R, Cerdas L, Rojas E, Arroyo O & Portilla E. 1981. Neutralización de los efectos locales del veneno de *Bothrops asper* por un antiveneno polivalente. *Toxicon* 19: 493-497.
- Gutiérrez JM, Nuñez J, Díaz C, Cintra ACO, Homsí-Brandeburgo MI & Giglio JR. 1991. Skeletal muscle regeneration after injection of Bothropstoxin I, a Phospholipase A₂ isolated from the venom of the snake *Bothrops jararacussu*. *Exp. Mol. Pathol.* 55: 217-229.
- Gutiérrez JM, Ownby CL & Odell GV. 1984. Isolation of a myotoxin from *Bothrops asper* venom: Partial characterization and action on skeletal muscle. *Toxicon* 22: 115-128.

- Gutiérrez JM, Romero M, Díaz C, Borkow G & Ovadia M. 1995. Isolation and characterization of a metalloproteinase with weak hemorrhagic activity from the venom of the snake *Bothrops asper* (terciopelo). *Toxicon* 33: 19-29.
- Gutiérrez JM & Lomonte B. 1995. Phospholipase A₂ myotoxins from *Bothrops* snake venoms. *Toxicon* 33: 1405-1424.
- Hite LA, Fox JW & Bjarnason JB. 1992. A new family of proteinases is defined by several snake venom metalloproteinases. *Biol. Chem.* 373: 381-385.
- Imai K, Nikai T, Sugihara H & Ownby CL. 1989. Hemorrhagic toxin from the venom of *Agkistrodon bilineatus* (common cantil). *Int. J. Biochem.* 21: 667-673.
- Joyce NC, Haire MF & Palade GE. 1985. Contractile proteins in pericytes. I. Immunoperoxidase localization of tropomyosin. *J. Cell Biol.* 100: 1379-1386
- Kefalides NA, Alper R & Clark C. 1979. Biochemistry and metabolism of basement membranes. *Int. Rev. Cytol.* 61: 167-228.
- Kefalides NA. 1980. Chemistry of basement membranes: structure and biosynthesis. *Adv. Microcirc.* 9: 295-322.
- Kini RM. 1995. Do we know the complete sequence of metalloproteinase and non-enzymatic platelet aggregation inhibitor (Disintegrin) precursor proteins? *Toxicon* 33: 1151-1160.
- Kini RM & Evans HJ. 1990. Effects of snake venom proteins on blood platelets. *Toxicon* 28: 1387-1422.
- Kini RM & Evans HJ. 1992. Structural domains in venom proteins: evidence that metalloproteinases and non-enzymatic platelet aggregation inhibitors (disintegrins) from snake venoms are derived by proteolysis from a common precursor. *Toxicon* 30: 265-268.
- Kohn S, Nagy JA & Dvorak AM. 1992. Pathways of macromolecular tracer transport across venules and small veins. *Lab. Invest.* 67: 596-607.
- Koshi R, Mathan VI, David S & Mathan MM. 1993. Enteric vascular endothelial response to bacterial endotoxin. *Int. J. Exp. Path.* 74: 593-601.
- Kurecki T & Kress LF. 1985. Purification and partial characterization of the hemorrhagic factor from the venom of *Crotalus adamanteus* (eastern diamondback rattlesnake). *Toxicon* 23: 657-668.
- Lafrenie R, Shaughnessy SG & Orr FW. 1992. Cancer cell interaction with injured or activated endothelium. *Cancer Metast. Rev.* 11: 377-388.
- Lampugnani MG, Resnati M, Dejana E & Marchisio PC. 1991. The role of integrins in the maintenance of endothelial monolayer integrity. *J. Cell Biol.* 112: 479-490.
- Lefer AM & Lefer DJ. 1993. Pharmacology of the endothelium in ischemia-reperfusion and circulatory shock. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 33: 71-90.

- Lomonte B & Gutiérrez JM. 1989. A new muscle-damaging toxin, myotoxin II, from the venom of the snake *Bothrops asper* (terciopelo). *Toxicon* 27: 725-733
- Lomonte B, Gutiérrez JM, Borkow G, Ovadia M, Tarkowski A & Hanson LA. 1994a. Activity of hemorrhagic metalloproteinase BaH-1 and myotoxin II from *Bothrops asper* snake venom on capillary endothelial cells *in vitro*. *Toxicon* 32: 505-510.
- Lomonte B, Lundgren J, Johansson B & Bagge U. 1994b. The dynamics of local tissue damage induced by *Bothrops asper* snake venom and myotoxin II on mouse cremaster muscle: an intravital and electron microscopic study. *Toxicon* 32: 41-55.
- Mandelbaum FR & Assakura MT. 1988. Antigenic relationships of hemorrhagic factors and proteases isolated from the venoms of three species of *Bothrops* snakes. *Toxicon* 26: 379-385.
- Mandelbaum FR, Assakura MT & Reichl AP. 1984. Characterization of hemorrhagic factors isolated from the venom of *Bothrops neuwiedi* (jararaca pintada). *Toxicon* 22: 193-206.
- Mandelbaum FR, Reichl AP & Assakura MT. 1976. Some physical and biochemical characteristics of HF2, one of the hemorrhagic factors in the venom of *Bothrops jararaca*. In: Ohsaka A, Hayashi K & Sawai Y. (eds.). *Animal, Plant and Microbial toxins*. Plenum Press. London. I: 111-121.
- Mandelbaum FR, Reichl AP & Assakura MT. 1982. Isolation and characterization of a proteolytic enzyme from the venom of the snake *Bothrops jararaca* (jararaca). *Toxicon* 20: 955-972.
- Mandelbaum FR, Serrano SM, Sakurada JK, Rangel HA & Assakura MT. 1989. Immunological comparison of hemorrhagic principles present in venoms of the Crotalinae and Viperinae subfamilies. *Toxicon* 27: 169-177.
- Mandelbaum FR. 1990. Snake venom hemorrhagins. *Mem. Inst. Butantan* 52: 355-365.
- Maruyama M, Sugiki M, Yoshida E, Shimaya K & Mihara H. 1992. Broad substrate specificity of snake venom fibrinolytic enzymes: possible role in haemorrhage. *Toxicon* 30: 1387-1397.
- Mason R Gy Balis JV. 1980. Pathology of the endothelium. In: Trump BF & Arstila AV (Eds). *Pathobiology of Cell Membranes II*. Academic Press Inc. New York. 481p.
- McKay DG, Moroz C, de Vries A, Csavossy I & Cruse V. 1970. The action of hemorrhagin and phospholipase derived from *Vipera palestinae* venom on the microcirculation. *Lab. Invest.* 22: 387-399.
- McKinney RV, Singh BB & Brewer PD. 1977. Fenestrations in regenerating skeletal muscle capillaries. *Am. J. Anat.* 150: 213-218.

- Mori N, Nikai T, Sugihara H & Tu AT. 1987. Biochemical characterization of hemorrhagic toxins with fibronectinase activity isolated from *Crotalus ruber ruber* venom. Arch. Biochem. Biophys. 253: 108-121.
- Morris SM, Kagan HM, Stone FJ, Snider GL & Albright JT. 1986. Ultrastructural changes in hamster lung 15 min to 3 Hr after exposure to pancreatic elastase. Anat. Rec. 215: 134-143.
- Morris SM, Stone FJ, Snider GL, Albright JT & Franzblau C. 1981. Ultrastructural changes in hamster lung four hours to twenty-four days after exposure to elastase. Anat. Rec. 201: 523-535.
- Murphy G, Atkinson S, Ward R, Gavrilovic J & Reynolds JJ. 1992. The role of plasminogen activators in the regulation of connective tissue metalloproteinase. Ann. N.Y. Acad. Sci. 667: 1-12.
- Nikai T, Ishizaki H, Tu AT & Sugihara H. 1982. Presence of zinc in proteolytic hemorrhagic toxin isolated from *Agkistrodon acutus* venom. Comp. Biochem. Physiol. 72C: 103-106.
- Nikai T, Oguri E, Kishida M, Sugihara H, Mori N & Tu AT. 1986. Reevaluation of hemorrhagic toxin, HR-1, from *Agkistrodon halys blomhoffii* venom: proof of proteolytic enzyme. Int. J. Biochem. 18: 103-108.
- Ogawa T, Onoue H, Nakagawa K, Nomura S, Sueishi K, Hattori S, Kihara H & Ohno M. 1995. Localization and expression of phospholipase A₂ in *Trimeresurus flavoviridis* (Habu snake) venom gland. Toxicon 33: 1645-1652.
- Ohsaka A, Just M & Habermann E. 1973. Action of snake venom hemorrhagic principles on isolated glomerular basement membrane. Biochim. Biophys. Acta 323: 415-428.
- Oshima G, Omori-Satoh T, Iwanaga S & Suzuki T. 1972. Studies on snake venom hemorrhagic factor (HR-1) in the venom of *Agkistrodon halys blomhoffii*. Its purification and biological properties. J. Biochem. 72: 1483-1494.
- Ouyang Ch, Teng ChM & Huang TE. 1992. Characterization of snake venom components acting on blood coagulation and platelet function. Toxicon 30: 945-966.
- Ownby CL & Geren CR. 1987. Pathogenesis of hemorrhage induced by hemorrhagic proteinase IV from timber rattlesnake (*Crotalus horridus horridus*) venom. Toxicon 25: 517-526.
- Ownby CL, Bjarnason J & Tu AT. 1978. Hemorrhagic toxins from rattlesnake (*Crotalus atrox*) venom. Pathogenesis of hemorrhage induced by three purified toxins. Am. J. Pathol. 93: 201-218.
- Ownby CL, Kainer RA & Tu AT. 1974. Pathogenesis of hemorrhage induced by rattlesnake venom. Am. J. Pathol. 76: 401-414.
- Ownby CL, Nikai T, Imai K & Sugihara H. 1990. Pathogenesis of hemorrhage induced by bilitoxin, a hemorrhagic toxin isolated from the venom of the common cantil (*Agkistrodon bilineatus bilineatus*). Toxicon 28: 837-846.

- Ownby CL. 1975. Pathogenesis and chemical treatment of hemorrhage induced by rattlesnake venom. Thesis to obtain Ph.D degree. Colorado State University. Fort Collins-Colorado, USA.
- Paine MJ, Desmond HP, Theakston RD & Crampton JM. 1992. Purification, cloning, and molecular characterization of a high molecular weight hemorrhagic metalloprotease, jarrahagin, from *Bothrops jararaca* venom. J. Biol. Chem. 267: 22869-22876.
- Queiroz LS, Santo H, Assakura MT, Reichl AP & Mandelbaum FR. 1985. Muscular lesions induced by a hemorrhagic factor from *Bothrops neuwiedi* snake venom. Brazil. J. Med. Biol. Res. 18: 337-340.
- Rahmy T, Tu AT, El-Banhawey MA, El-Asmar MF & Hassan FM. 1992. Cytopathologic effect of *Cerastes cerastes* (Egyptian sand viper) venom and isolated hemorrhagic toxin on liver and kidney: an electron microscopic study. J. Natural Toxins 1: 45-58.
- Reichl AP, Assakura MT & Mandelbaum FR. 1983. Biophysical properties and amino acid composition of *Bothrops* Protease A, a proteolytic enzyme isolated from the venom of the snake *Bothrops jararaca*. Toxicon 21: 421-427.
- Reidi MA & Schwartz SM. 1984. Arterial endothelium assessment of *in vivo* injury. Exp. Molec. Pathol. 41: 419-434.
- Rhodin JAG. 1968. Ultrastructure of mammalian venous capillaries, venules and small collecting veins. J. Ultrastruct. Res. 25: 452-500.
- Risau W. 1995. Differentiation of endothelium. FASEB J. 9: 926-933.
- Roberts WG & Palade GE. 1995. Increased microvascular permeability and endothelial fenestration induced by endothelial growth factor. J. Cell Science 108: 2369-2379.
- Rosenberg GA, Estrada E, Kelly RO & Kornfeld M. 1993. Bacterial collagenase disrupts extracellular matrix and opens blood-brain barrier in rat. Neurosc. Letters 160: 117-119.
- Ross R. 1986. The pathogenesis of atherosclerosis-an update. N. Engl. J. Med. 314: 488-500.
- Rowland FN, Donovan MJ, Lindsay M, Weiss WI, O'Rourke J & Kreutzer DL. 1983. Demonstration of inflammatory mediator-induced inflammation and endothelial cell damage in the anterior segment of the eye. Am. J. Pathol. 110: 1-12.
- Rowland FN, Donovan MJ, Picciano PT, Wilner GD & Kreutzer DL. 1984. Fibrin-mediated vascular injury. Identification of fibrin peptides that mediate endothelial cell retraction. Am. J. Pathol. 117: 418-428.
- Rucavado A, Borkow G, Ovadia M & Gutiérrez JM. 1995. Immunological studies on BaII1 and BaP1, two hemorrhagic metalloproteinases from the venom of the snake *Bothrops asper*. Toxicon 33: 1103-1106.