

ESTUDIO COMPARATIVO DE LOS EFECTOS MIOTÓXICOS E INFLAMATORIOS POR ACCIÓN DE FOSFOLIPASAS A₂ NATIVAS Y MODIFICADAS QUÍMICAMENTE PROCEDENTES DE VENENO DE *Bothrops andianus*.

Adolfo Román Ramos Paredes¹, Wilmer Julio Paredes Fernández²

(1) Laboratório de Fisiología Animal, Facultad de Ciencias Biológicas, Departamento Académico de Biología, UNSA.

(2) Laboratório de Bioquímica, Facultad de Ciencias Biológicas, Departamento Académico de Biología, UNSA

RESUMEN: En el presente trabajo de investigación se logró purificar en tres pasos cromatográficos por exclusión molecular en Sephadex G-75, intercambio iónico (catiónico) SP 5PW (Waters) e hidrofobicidad en una columna μ -Bondapack C-18 (Waters, CA, USA) en una combinación de cromatografía convencional y de alta eficiencia, una fosfolipasa A₂ con efecto miotóxico, a partir del veneno total de *Bothrops andianus*. La miotóxina PLA₂ tiene una masa molecular en torno a 13 KDa en la electroforesis de poliácridamida en presencia de dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE) y se obtuvo con una alta homogeneidad. La composición de aminoácidos de la miotóxina PLA₂ aislada del veneno de *Bothrops andianus* indica que se trata de una proteína de carácter básico. La miotóxina PLA₂ aislada a partir del veneno de *Bothrops andianus* tiene una actividad miotóxica local. Una dosis de 20 μ g de esta fosfolipasa a nivel intramuscular provocó un aumento drástico de los niveles séricos de creatinina quinasa a las 4 horas después de su administración (1373,11 \pm 55,17 U/L). La actividad mionecrótica revela que la fracción aislada presenta actividad miotóxica, ya que la lesión muscular producida por la fracción fue típicamente mionecrótica, induciendo pérdida de la estructura de las fibras musculares.

Palabras Clave: *Bothrops andianus*, fosfolipasa A₂, miotóxina, inflamación, interleuquinas

ABSTRACT: In the present research work, it was possible to purify in three chromatographic steps by molecular exclusion in Sephadex G-75, ion exchange (cationic) SP 5PW (Waters) and hydrophobicity in a μ -Bondapack C-18 column (Waters, CA USA) In a combination of conventional and high efficiency chromatography, a phospholipase A₂ with a myotoxic effect, from the total venom of *Bothrops andianus*. Myotoxin PLA₂ has a molecular mass around 13 KDa in polyacrylamide electrophoresis in the presence of sodium dodecyl sulfate (SDS-PAGE) and was obtained with high homogeneity. The amino acid composition of the myotoxin PLA₂ isolated from the *Bothrops andianus* venom indicates that it is a basic protein. Myotoxin PLA₂ isolated from the venom of *Bothrops andianus* has local myotoxic activity. A dose of 20 μ g of this phospholipase intramuscularly caused a drastic increase in creatinine kinase levels 4 hours after administration (1373.11 \pm 55.17 U/L). The myonecrotic activity reveals that the isolated fraction presents myotoxic activity, since the muscular injury produced by the fraction was typically myonecrotic, inducing loss of

Keywords: *Bothrops andianus*, phospholipase A₂, myotoxin, inflammation, interleukins

INTRODUCCIÓN

Los envenenamientos por serpientes del género *Bothrops* (Viperidae, Crotalinae) son caracterizados por prominente daño tisular local, con necrosis de tejidos, hemorragia y edema, debido a la acción de varias. Las alteraciones sistémicas tales como hemorragia, coagulopatía, shock, y falla renal aguda pueden ocurrir también en estos pacientes.

El daño tisular local se desarrolla muy rápidamente después de la mordedura y como consecuencia, puede ocurrir importante pérdida de tejido incluso disfunciones secundarias cuando el tratamiento se retrasa, como frecuentemente ocurre en regiones tropicales de África, Asia, y América Latina.

La patogénesis de mionecrosis, hemorragia y edema han sido investigada en detalle en laboratorios, con varios venenos del género *Bothrops*. Además trabajos previos realizados con veneno entero de *Bothrops jararacussu* demostraron necrosis muscular y posterior regeneración.

Entre los múltiples componentes del veneno se hallan las miotoxinas y hemorraginas.

Casi todas las miotoxinas de venenos de serpientes del género *Bothrops* pertenecen al grupo básico de fosfolipasas A₂ (PLA₂) y en su mayoría carecen de actividad enzimática.

Los efectos causados por PLA₂ inducen a desestabilización de la membrana, con pérdida selectiva de la permeabilidad a iones Ca⁺⁺ mediadores importantes en el proceso de necrosis muscular. La mionecrosis es causada directamente, debido a la acción de miotoxinas sobre la membrana plasmática de células musculares, e indirectamente, a través del desarrollo de isquemia secundaria a hemorragia, resultante de alteraciones drásticas inducidas por estos venenos sobre arterias musculares y microvasculatura.

Las PLA₂ aisladas muestran baja actividad miotóxica, tanto in vivo como in vitro. Este efecto no es correlacionado con la alta actividad catalítica. Esta observación favorece la hipótesis que la miotoxicidad es una consecuencia indirecta de la acción de perturbación de PLA₂s, que incrementan la permeabilidad al Ca⁺⁺ y activan proteasas extracelulares.

Las enzimas se distribuyen en forma diferente en los venenos de las diferentes especies de *Bothrops* las que contribuyen a la letalidad y necrosis efectos particularmente importantes al considerar la terapia con antiveneno. Los objetivos del trabajo consistieron en comparar los efectos miotóxicos e inflamatorios por acción de fosfolipasas A₂ nativas y modificadas químicamente procedentes de veneno de *Bothrops andianus*.

Correspondencia:

Wilmer Julio Paredes Fernández
E-mail: wparedes@unsa.edu.pe



Fig. Nro.1. Bothrops andianus. Adulto. Foto tomada por Dave Welling. Images of nature.

MATERIAL Y MÉTODOS

Material y Reactivos

Todos los solventes, productos químicos y reactivos químicos utilizados son de alto grado de pureza, procedentes de Aldrich (Aldrich Chemical Co, Inc. - Wisconsin, U.S.A.), Applied Biosystems (Applied Biosystems - Perkin Elmer Division, U.S.A.), Bio-Rad (Bio Rad Laboratories - California, U.S.A.), Merck (Merck - Darmstadt, Germany), Sigma (Sigma Chemical Co - St. Louis, U.S.A.), Pierce (Pierce Chemical Company - Illinois, U.S.A). Las muestras de la PLA₂ nativa purificada y modificada químicamente, son cedidas por el Laboratorio de Química de Proteínas del Instituto de Biología de la Universidad Estadual de Campinas – SP BRASIL.

La infraestructura, y equipos utilizados en la presente investigación, son compartidos, entre el Instituto de Biología de la Universidad del Estado de Campinas-SP BRASIL y el Laboratorio de Química Biológica del Departamento de Biología de la Universidad Nacional de San Agustín, Arequipa – PERU.

Electroforesis en PAGE-SDS

La electroforesis en gel de poli(acrilamida) fue realizada siguiendo la metodología descrita por Laemmli (1970), en que las placas de poli(acrilamida) (PAGE) son preparadas de modo discontinuo, presentando un gel de concentración de 5 % y un gel de corrida de 12,5 %. Las placas fueron preparadas utilizando una solución de acrilamida stock (30%T, 0,8%C). El gel de concentración a 5 % fue preparado usando un tampón Tris-HCl 0.5M de pH = 6,8 y el gel de corrida fue preparado usando tampón Tris-HCl 1M de pH = 8,8.

A ambos geles se les agregó SDS al 20% en cantidad suficiente para llevar a una concentración final de 0.5% (v/v).

La corrida electroforética es realizada en un sistema doble de miniplacas SE 250 Mighty Small II (Hoeffer scientific instruments). Tanto las muestras y los marcadores de masa molecular fueron disueltos en tampón de muestra (Tris-HCl 0,075M; pH = 6,8; 10% glicerol; 4% de SDS; 0,001% de Bromofenol). La corrida electroforética fue realizada a 30 mA. Los geles fueron coloreados con solución de Comassie Blue 0,05% a 37°C, y el exceso de colorante fue removido con ácido acético al 7%.

Determinación de los niveles de CK plasmáticos en ratones inoculados por vía intramuscular (miotoxicidad local) y intravenosa (miotoxicidad sistémica).

Se utiliza una solución stock de 100µg/100µl de la PLA₂ de *Bothrops andianus* a partir de la cual se preparó soluciones de 1,5, 10 y 20µg/100µl de concentración de la PLA₂ miotóxica, estas dosis fueron diluidos en 100µl de PBS, enseguida se inyectó los 200 µl de la mezcla final, a nivel intramuscular y intravenoso a grupos de cuatro ratones.

A las 0, 2, 4, 6, 12 y 24 horas después del tratamiento a cada ratón se le extrajo sangre del extremo caudal que fue colectado en capilares heparinizados, el plasma fue separado por centrifugación por 5 min a 10,000 rpm, para posteriormente determinar los niveles de creatina kinasa (CK), utilizando el kit CK-NAC (Creatine Kinase Diagnostick Germany), adicionando a 1 ml de sustrato 15 µl de plasma posteriormente se incubaron por 2 min a 37 °C y se leyó a 340 nm.

La aplicación de la PLA₂ se realizó a nivel intravenoso e intramuscular a fin de establecer el mecanismo mionecrotico local y sistémico. (Ponce-Soto, *et al.*, 2007).

Determinación de la actividad inflamatoria (Edema de pata)

La determinación de la actividad inflamatoria ocasionado por La PLA₂ de *Bothrops andianus* fue realizado siguiendo la metodología descrita por Levy (1969), en grupos de 4 ratones (18-20g).

Se realizó utilizando una solución stock inicial de 400 mg/ml de PBS (20 g/50l).

Después se hicieron diluciones, tomándose 500 l de la primera y mezclándose con 500l de PBS (10g/50l) y finalmente se realizó la última dilución Luego se toma 500ul de esa preparación y se mezcla con otros 500 l de PBS (5 g/l) con el mismo procedimiento para alcanzar una concentración de 2,5 g/50l.

El edema de pata fue inducido inyectando 50µl de las diferentes soluciones de PLA₂ dentro del tejido subplantar de la pata trasera derecha y la pata izquierda recibió 50µL de PBS, como control.

Después de la inoculación de PLA₂ miotóxica, fueron hechas lecturas en intervalos de tiempo de 0 minuto, 30 minutos, 1 hora, 3 horas, 6 horas y 24 horas.

El edema producido fue medido usando un micrometro con reloj analógico para medidas externas (tipo compasso ODI-20).

RESULTADOS Y DISCUSION

Electroforesis en SDS-PAGE de la PLA₂ nativa y modificada.

La figura 3 muestra los perfiles de masa molecular en SDS PAGE de la PLA₂ nativa (pista 2) y de las proteínas modificadas con AA, NPSC, NBSF e BPB, en los residuos Lys, Tyr, Trp e His (pistas 3, 4, 5 y 6, respectivamente).

Todas las muestras fueron reducidas con DTT, mostrando para cada muestra la presencia de una única banda electroforética con masa molecular relativa en torno de 15 kDa, en relación a los marcadores de masa molecular (pista 1).

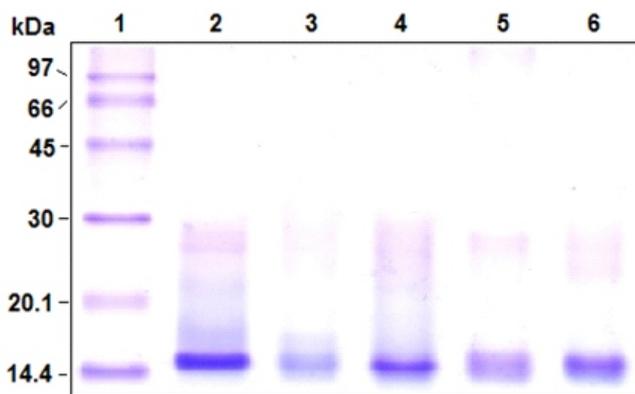


Fig. Nro.2. Electroforesis en gel de poliacrilamida (12,5 %). SDS-PAGE, coloreado con Comassie blue. Pista 1: marcadores de masa molecular (Mm), Pista 2: PLA2-I nativa; Pista 3: PLA2 + AA, Pista 4: PLA2 + NPSC, Pista 5: PLA2 + NBSF, Pista 6: PLA2 + BPB. Todas las muestras fueron reducidas con DTT.

Actividad miotóxica local *in vivo*.

Los estudios realizados para determinar el efecto miotóxico local de las formas modificadas de la PLA2 *in vivo* fueron realizados en ratones, inoculando las proteínas por vía intramuscular. Resultados previos, (datos no mostrados) mostraron que 20 µg de la PLA2 nativa incrementaron los niveles de CK plasmáticos drásticamente en las primeras 3 a 6 horas del tratamiento, alcanzando hasta los niveles de 1373.11 55.17 U/L de CK, para posteriormente volver a los niveles normales después de 9 horas. La figura 4 muestra el efecto miotóxico inducido por la PLA2 nativa y las formas modificadas. Comparando los niveles de CK 3 horas después de iniciado el tratamiento, la miotoxicidad local inducida por la PLA2 fue reducida en 85 % por tratamiento con anidro acético (acetilación de Lys), 80 % por alquilación con BPB, 72 % después de la modificación de Tyr (NBSF) y 20 % después modificación de Trp (NPSC).

Fue investigado también el efecto de inhibidores sobre la actividad miotóxica de la PLA2. Los resultados evidencian que la heparina inhibe el efecto miotóxico de la PLA2 en 47%, ya que el máximo nivel de CK liberado es de 725.94 ± 137.25 U/L a las 3 horas de exposición a la toxina en comparación a la PLA2 nativa. El EDTA tiene mayor efecto inhibitorio de la actividad miotóxica de la PLA2, reduciendo en 74% esta actividad 3 horas después de la aplicación de la toxina.

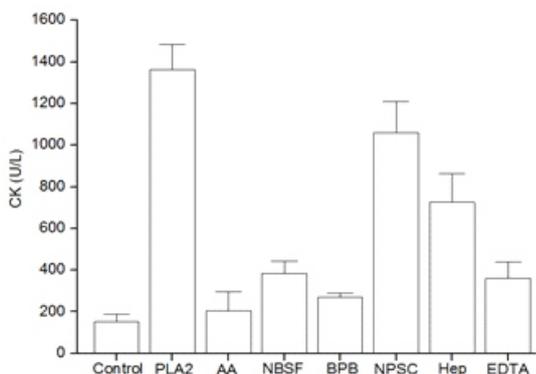


Fig. Nro.3. Representación gráfica de la actividad miotóxica local de la PLA2 nativa y de sus formas modificadas (AA, NBSF, BPB y NPSC) e incubadas con Heparina (Hep) y EDTA. Muestra los niveles de creatino quinasa (CK), incrementados después de 3 horas de la administración intramuscular de las proteínas (20 µg), (n=5). Comparación de los tratamientos en relación a la PLA2 nativa *(p<0.05).

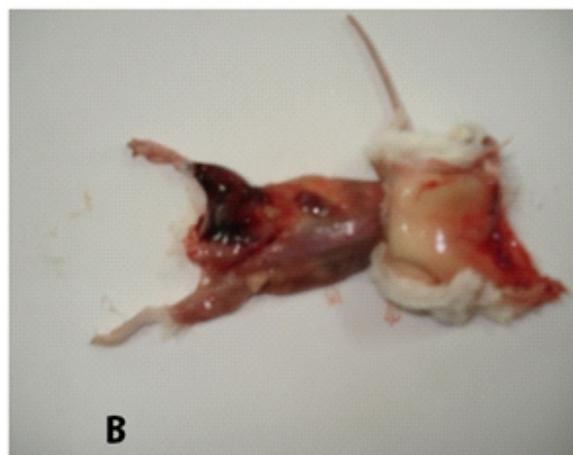
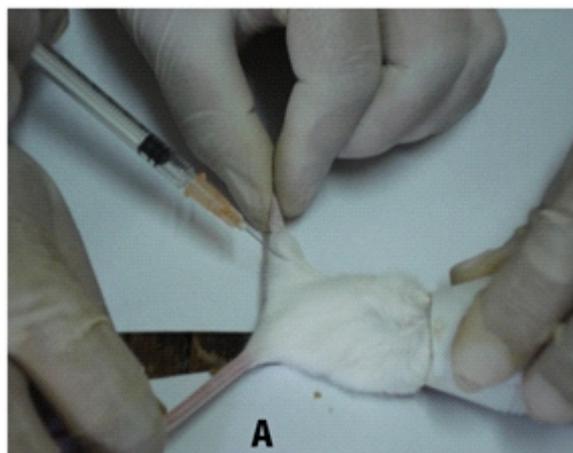


Fig. Nro.4. A.Ratones inoculados por vía intramuscular (miotoxicidad local). B.Determinación del efecto miotóxico local en las formas modificadas de la PLA2 *in vivo* en ratones.

Determinación de la actividad edematogénica.

Para el estudio del efecto de las modificaciones químicas de la PLA2 sobre la actividad inflamatoria, se verificó uno de los eventos que ocurre en este proceso, la formación de edema. Para eso la PLA2 y sus formas modificadas con NPSC, NBSF, AA y BPB, todas en la dosis de 1 µg fueron disueltas en 50 µl de PBS, y aplicadas sobre la región intraplantar de la pata derecha de los ratones (18 – 20 g). La pata izquierda recibió 50 µl de PBS como control. Las medidas fueron realizadas después de una 1 hora de aplicación de las toxinas.

El edema es expresado como el porcentaje de aumento en volumen de la pata derecha con relación a la pata izquierda. El efecto edematogénico inducido por la PLA2 fue marcadamente reducido después de alquilada la His con BPB y la acetilación de Lys con anhídrido acético (edema inhibido en 70 % y 55 %, respectivamente). Este efecto fue parcialmente reducido por la modificación de residuos de Tyr por el NBSF (40 %). La modificación de los residuos de Trp no mostro reducción significativo en el efecto edematogénico (6 %). Las comparaciones son realizadas una hora después del inicio del tratamiento.

Fue evaluado también el efecto de inhibidores sobre la actividad inflamatoria de la PLA2. Los resultados evidencian que la heparina inhibe el efecto edematogénico de la PLA2 en 32 %, después de una hora de exposición a la toxina, ya el EDTA tuvo un mayor efecto inhibitorio, disminuido en 43 % del efecto edematogénico inducido por la PLA2 nativa.

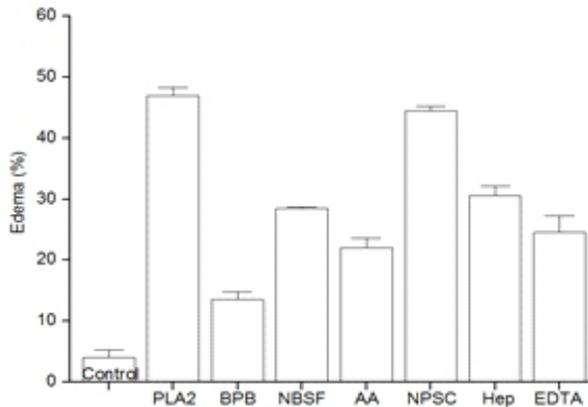


Fig. Nro.5. Actividad edematogénica de la PLA₂, de las formas modificadas con NPSC, NBSF, AA BPB y de la inhibición con Heparina (Hep) y EDTA en ratones (18-20 g). La medida fue realizada 1 hora después de la aplicación de las toxinas. Cada punto representa la media ± el desvío-padrón de un grupo de 5 animales. Comparación de los tratamientos en relación a la PLA₂ nativa *($p < 0.05$).

DISCUSIÓN

En el presente trabajo se ha empleado tres pasos cromatográficos, el primero de exclusión molecular en Sephadex G-75, el segundo, de intercambio iónico (catiónico) a través de una columna SP 5PW (Waters) acoplado a un sistema de HPLC y el tercero a través de una cromatografía de carácter hidrofóbico en fase reversa acoplado a un sistema de HPLC. Teniendo en cuenta los severos efectos locales del veneno de *Bothrops andianus* y considerando que estos dependen de diversos componentes del veneno que actúan sinérgicamente, nos propusimos aislar una miotóxina básica PLA₂ así como también caracterizarla bioquímica y mionecroticamente.

Las fosfolipasas A₂ miotóxicas aisladas, son moléculas compactas extremadamente estables a variaciones de temperatura, pH, concentración salina alta y la presencia de solventes orgánicos; lo cual está relacionado con sus características estructurales. De manera que, las fosfolipasas A₂ miotóxicas no sufren violentos procesos de desnaturalización en las condiciones usuales de trabajo, durante los procesos de purificación y durante los ensayos biológicos (Gutiérrez y Ownby 2003).

Al pasar el veneno crudo de *B. bilineata* por la columna de Sephadex G-75, se obtuvieron cinco picos de proteína denominados del I al V, el pico III reveló una actividad fosfolipásica A₂ (Fig.1), la fracción con actividad fosfolipásica A₂ denominada como pico III fue sometida a un nuevo proceso de repurificación de intercambio iónico (catiónico), en una columna de cromatografía SP 5PW (Waters) acoplado a un sistema de HPLC (Fig. 2) en donde se obtuvo tres picos proteicos, denominados como: III-1, III-2 y III-3.

La actividad fosfolipásica A₂ se observó en el pico III-2, Seguidamente esta fracción III-2 proveniente del segundo proceso cromatográfico, fue sometida a un nuevo proceso de repurificación en un sistema de HPLC de fase reversa ó de hidrofobicidad donde se obtuvo la presencia de dos picos denominados como: III-2_A y III-2_B, de los cuales el pico III-2_A fue el responsable de presentar una actividad fosfolipásica A₂ e inducir una acción miotóxica local. La electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE), revela el alto de grado de pureza de la fracción III-2_A, con actividad fosfolipásica A₂, y capaz de inducir un efecto

miotóxico local, pues aparece como una sola banda de proteína, lo cual confirma la idoneidad del método de purificación.

El peso molecular estimado de la fracción III-2_A, con actividad fosfolipásica A₂, y capaz de inducir un efecto miotóxico local es de 13 kDa (Fig. 4). Lo que concordaría con lo reportado por Gutiérrez y Ownby 2003, Kini, 2003 que establecen que las miotóxicas purificadas han sido caracterizadas como proteínas básicas de masa molecular entorno de 13 a 15 KDa. Se determinó la masa molecular relativa de la fracción III-2_A calculada a través del programa Origin 5.0, muestra que la fracción posee una masa molecular alrededor de 13 KDa similar a la obtenida en la muestra.

En nuestros resultados de caracterización bioquímica relacionada al análisis de composición de aminoácidos, las fracción III-2_A con actividad fosfolipásica A₂ y efecto miotóxico, purificada a partir del veneno total de *Bothriopsis bilineata*, se encontró que la miotóxina contiene un mayor porcentaje de aminoácidos básicos (15% de Lys y 11% de Arg) con respecto al porcentaje de aminoácidos ácidos (4% de Asp y 4 % de Glu) (Tabla 1). Es decir, la miotóxina posee 36% de Lys+ Arg, lo que en comparación al 8% de Asp+Glu, confirma su naturaleza básica y un acentuado carácter hidrofóbico (Ala 3%, Ile 2 %, Leu 9 %, Trp %6, Val 5%) lo cual estaría relacionado con su alta estabilidad y que confirmaría que se trata de una fosfolipasa A₂ ya que estas miotóxicas se encuentran formadas de 110 a 135 residuos de aminoácidos, y presentan una naturaleza básica que es una característica común de todas las miotóxicas botrópicas aisladas (Ward y Arny 1996). Así por ejemplo podemos mencionar las miotóxicas aisladas de los venenos de *B. asper*, *B. nummifer* y *B. moojeni*, (Gutiérrez *et al.*, 1984; Gutiérrez *et al.*, 1986; Lomonte *et al.*, 1989; Soares *et al.*, 2000). De otro lado el registro de 121 aminoácidos para la fracción III-2_A y la presencia de 14 cisteínas nos sugiere la posible formación de siete puentes disulfuro que confirman que se trataría de una fosfolipasa A₂ correspondientes a la clase II en la clasificación establecida por Dennis, (1994). El punto isoelectrónico (pI) de la fracción III-2_A se estimó con el programa DNASTAR y fue de 9.55 lo que corroboraría la naturaleza básica de la miotóxina purificada.

Los estudios de los efectos miotóxicos "in vivo" son importantes para el diagnóstico del daño muscular. Los resultados indican que la miotóxina produce una liberación máxima de Creatin Kinasa (CK) 4 horas después de la administración, lo cual representa un tiempo similar al encontrado con la miotóxina I de *Bothrops asper* y miotóxina II de *Bothrops moojeni*, las cuales provocan liberación máxima de Creatin-Kinasa a las tres horas (Gutiérrez, *et al.*, 1991), y presenta un tiempo menor al de *Bothrops atrox* que presenta una liberación máxima de Creatin-Kinasa a las seis horas después de la inoculación. Sin embargo, los niveles de creatin kinasa prácticamente se normalizan 24 horas después de la administración intramuscular. Cuando el veneno es administrado a nivel intravenoso no se observan marcadas variaciones de los niveles CK plasmáticos, por lo que la fracción III-2_A con actividad fosfolipásica A₂ y exhibe un efecto miotóxico local.

Los cortes histológicos del musculo gastrocnemius de ratones tratados con la miotóxina evidencia una severa necrosis del tejido, observándose no sólo una desorganización de las fibras musculares, sino además la desaparición de los núcleos periféricos. Así mismo la miotóxina fue capaz de provocar rápidamente la fuga de creatin kinasa lo cual indicaría que la proteína actúa probablemente a nivel del sarcolema provocando desorganización.

Las miotóxicas o toxinas mionecróticas constituyen un grupo de proteínas del veneno con acción específica en el músculo esquelético, afectando las fibras musculares, sin causar lesión importante en otros tejidos como conjuntivo, nervios y vasos (Lira Leite *et al.*, (1993). Los diferentes estudios realizados con otras miotóxicas de venenos de serpientes también sugieren

que la acción primaria de estas proteínas sería a nivel del sarcolema. Sin embargo el lugar de unión a la membrana muscular, no es todavía conocido, aunque se supone que deben estar involucrados componentes que permitirían la unión específica al sarcolema (Huatuco, *et al*, 2004).

Finalmente, los resultados obtenidos en la presente investigación son estimulantes por el alto grado de pureza observado en las purificaciones y caracterizaciones bioquímicas que justifican un estudio más detallado de su actividad biológica y de su aplicación en el campo de la farmacología y otras ramas de la biología.

BIBLIOGRAFIA

- [1] Amaral, C. F. S., Resende, N. A., Da Silva, O. A., Ribeiro, M. M. F., Magalhães, R.A., Reis, R. J., Carneiro, J. G. and Castro, J. R. S. (1986) Insuficiencia renal aguda secundaria a accidentes ofídicos botrópico e crotálico. Análise de 63 casos. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo* 28, 220-227.
- [2] Azevedo-Marques, M. M., Cupo, P., Coimbra, T. M., Hering, S. E., Rossi, M. A. and Laure, C. J. (1985) Myonecrosis, myoglobinuria and acute renal failure induced by South-American rattlesnake (*Crotalus durissus terrificus*) envenomation in Brazil. *Toxicon* 23, 631-636.
- [3] Bancher, W., Rosa, R. R. and Furlamento, R. S. (1973) Estudo sobre a fixação eletiva e quantitativa do veneno de *Crotalus durissus terrificus* nos tecidos nervoso, renal, hepático e muscular de *Mus musculus lineaus*. *Mem. Inst. Butantan* 37, 139-142.
- [4] Barraviera, B. (1990) Curso sobre accidentes por animais peçonhentos: Acidentes por serpentes do gênero *Crotalus*. *Arq. Bras. Med.* 64, 14-20.
- [5] Barraviera, B., Bonjorno Júnior, J. C., Araraki, D., Domingues, M. A. C., Pereira, P. C. M., Mendes, M. P., Machado, J. M. and Meira, D. A. A. (1989) Retrospective study of 40 victims of *Crotalus* snake bites. Analysis of the hepatic necrosis observed in one patient. *Ver. Soc. Bras. Med. Trop.* 22, 5-12.
- [6] Barraviera, B., Lomonte, B., Tarkowiki, A., Hanson, L. A. and Meira, D. A. (1995) Acute phase reactions, including cytokines, in patients bitten by *Bothrops* spp. And *Crotalus durissus terrificus* in Brazil. *J. Venom. Anim. Toxins* 1, 11-22.
- a. crotoxin and of its isolated subunits. *Eur. J. Biochem.* 99(3), 471-481.
- [7] Carrillo, de E. Y Icochea, J., (1995) Lista taxonómica preliminar de los reptiles vivientes del Perú. Publicaciones del Museo de Historia Natural. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. (A) Nro. 49: 1-27.
- [8] Carvalho, D. D.; Marangoni, S.; Oliveira, B.; Novello, J. C. (1998). Isolation and Characterization of a new lectin from the venom of the snake *Bothrops jararacussu*. *Biochem. Molecular Biology International*, 44: 933–938.
- [9] Cho, W. and Kezdy, F.J. (1991) Chromogenic substrates and assay of phospholipases A₂. *Methods Enzymol.* 197, 75-79.
- [10] Davie, E. W. (1995). Biochemical and molecular aspects of the coagulation cascade. *Thromb. Haemost.*, 74: 1–6.
- [11] Davie, E. W. Fujikawa, K.; Kisiel, W. (1991). The coagulation cascade: initiation, maintenance and regulation. *Biochemistry*, 30: 10365–10370.
- [12] Declerck, Y.A. and Imren, S. (1994) Protease inhibitors: role and potential therapeutic use in human cancer. *Eur.J.Cancer*, 30A: 2170-2180.
- [13] Dufton, M.J. (1990) Could domain movements be involved in the mechanism of trypsin like serine proteases *FEBS Lett.*, 271: 9-13.
- [14] Glenn, J. L. and Straight, R. C. (1982). The Rattlesnake and Their Venom Yield and Lethal Toxicity. In: *Rattlesnake Venoms: Their Actions and Treatment*, ed by A. T. Tu, pp. 3-119, Copyright MARCEL DEKKER, INC, New York, NY.
- [15] Gopalakrishnakone, P., Dempster, D. W., Hawgood, B. J. and Elder, H. Y. (1984) Cellular and mitochondrial changes induced in the structure of murine skeletal muscle by crotoxin, a neurotoxin phospholipase A₂ complex. *Toxicon*, 22, 85-98.
- [16] Gutiérrez, J. M., Santos M. C., Furtado, M. F., Rojas, G., (1991), *Toxicon*, 29:10, 1273 – 1277 Harvey, A.L.; Bradley, K.N.; Cochran, S.A.; Rowan, E.G.; Pratt, J.A.; Quillfeldt, J.A.; Jerusalinsky, D.A. (1998) What can toxins tell us for drug discovery? *Toxicon* 36(11):1635-1640
- [18] Hati, R.; Mitra, P.; Sarker, S.; Bhattacharya, K. K. (1999). Snake Venom Hemorrhagins. *Critical Reviews in Toxicology*, 29: 1–19.
- [19] Hawgood, B. J. and Santana de Sá, S. (1979) Changes in spontaneous and evoked release of transmitter induced by crotoxin complex and its component phospholipase A₂ at the frog neuromuscular junction. *Neuroscience* 4(2), 293-303.
- [20] Hawgood, B. J., (1982). Physiological and Pharmacological Effects of Rattlesnake Venoms. In: *Rattlesnake Venoms: Their Actions and Treatment*, ed by A. T. Tu, pp. 121-162, Copyright MARCEL DEKKER, INC, New York, NY.
- [21] Hawiger, J. (1992). Introduction to platelet structural and function organization. *Meth. Enzymol.*, 215: 3-20. 00
- [22] Herwald, H.; Renné, T.; Meijers, J. C. M.; Chung, D. W.; Page, J. D.; Colman, R. W.; Müller-Esterl, W. (1996). Mapping of the discontinuous kininogen binding site of prekallikrein. *J. Biol. Chem.*, 271: 13061–13067.
- [23] Hoge, R. A., (1965). Preliminary account on neotropical Crotalinae (Serpentes Viperidae). *Mem. Inst. Butantan* 32, 109-184.
- [24] Iwanaga, S. and Suzuki, T. (1979) Enzymes in Snake Venom. In: *Snake Venoms. Handbook of Experimental Pharmacology*. Lee, C.Y. vol. 52, cap. 4, pp 105. Springer-Verlag Berlin-Heidelberg-New York.
- [25] Jennifer, C.D., Gnanajothy, P., Chai Koh Sgin, Nget-Hong Tang, Roger S. Thorpe and Wolfgang Wuster (1996) Electrophoretic profiles and biological activities: intraspecific variation in the venom of the malayan pit viper (*Calloselasma rhodostoma*). *Toxicon* Vol.34 Nro. 1 6-79.
- [26] Kaiser, E. And Michl, L. (1971) Chemistry and pharmacology of the venoms of *Bothrops* and *Lachesis*. In: W. Bucherl and E.E. Buckley (Eds.): *Venomous animals and their venoms*. Academic Press, New York-London. 307-318.
- [27] Kamiguti, A. S. and Sano-Martins, I. (1995). South american snake venoms affecting haemostasis. *J. Toxicol.*, – *Toxin Review* 14: 359–374
- [28] Kornalik, F. (1990). Toxins affecting blood coagulation and fibrinolysis. In: *Handbook of Toxicology*, pp 683 (Shier, W. T. & Mebs, D., Eds) New York: Marcel Dekker.
- [29] Kouyoumdjian, J. A., Harris, J. B. and Johnson, M. A. (1986) Muscle necrosis caused by the subunits of crotoxin. *Toxicon*, 24, 575-583.
- [30] Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227(259), 680-685.
- [31] Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins among the assembly of the head of the bacteriophage T₄. *Nature*, 227: 680 – 685.
- [32] Laskowsky, M. (1971). Venoms exonuclease. in boyer, P.D. (Ed) *Enzymes*, Vol 4 New York-London: Academic Press.
- [33] Lee, Ch.Y. (1979) Snake Venoms, *Handbook of Experimental Pharmacology*, Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York.
- [34] Li, Z.Y.; Yu, T.F. and Lian, E.C.Y. (1994) Purification and characterization of L-amino acid oxidase from king cobra (*Ophiophagus hannah*) venom and its effects on human platelet aggregation. *Toxicon* 32(11): 1349 - 1358.
- [35] Lin, Y.; Shenoy, S. S.; Harris, R. B.; Colman, R. W. (1996). Direct evidence for multifacial contacts between high molecular weight kininogen and plasma prekallikrein. *Biochemistry*, 35: 12945 – 12949.
- [36] Loayza, s.; Morante, Y., Campos, S. y Yarlequé, A. (1985) Enzimas proteolíticas en los venenos de las serpientes peruanas. *Lachesis muta* y *Bothrops atrox*. *Boletín de la Sociedad Química del Perú*. Vol.II Nro.3: 151-163.
- [37] Lomonte, B., Gené, J. A., Gutiérrez, J. M., Cerdas, L., (1983), *Toxicon*, 21:3, 379–384.
- [38] Lu, Q.-M.; Yang, J.; Li, D.-S.; Wang, W.-Y.; Xiong, Y.-L. (2000). Characterization of a thrombin-like enzyme from the venom of *Trimeresurus jerdonii*. *Toxicon*, 38: 1225–1236.
- [39] Mancin, A. C., Soares, A. M., Andriao-Escarso, S. H., Faca, V. M., Greene, L. J., Zuccolotto, S., Pela, I. R. and Giglio, J. R. (1998) The analgesic activity of crotamine, a neurotoxin from *Crotalus durissus terrificus* (South American rattlesnake) venom: a biochemical and Pharmacological study. *Toxicon* 36(12), 1927-1937.
- [40] Martins, A. M. C., Monteiro, H. S. A., Júnior, E. O. G., Menezes, D. B. and Fonteles, M. C. (1998) Effects of *Crotalus durissus cascavella* venom in the isolated rat kidney. *Toxicon*, 36(10), 1441-1450.
- [41] Mayer, F. Kiffman, P. and Linker, A. (1960). Hialuronidasa. in: Bouer, P.D.; Lardy, H.; Myrback, K. (Ed); *The Enzymes*. Vol.4 Academic Press.

- [42] McLean, R.L.; Massaro, E.J. and Elliot, W.B. Olivera BM (1971) A comparative study of the homology of certain enzymes in ellapide venoms. *Comp. Biochem. Physiol.* 39B: 1023-1037.
- [43] Mebs, D. (1970) A Comparative study of enzyme activities in snake venoms, *Int. J. Biochem.* 1:335-342.
- [44] Meneses, O. (1974) Los animales venenosos y sus peligros. Instituto de Salud Pública. Lima, Perú. Publicación Nro.2
- [45] Morrissey, J. H.; Neuenschwander, P. F.; Huang, Q.; McCallum, C. D.; Su, B.; Johnson, A. E. (1997). Factor VIIa-tissue factor functional importance of protein-membrane interaction. *Thromb. Haemost.*, 78: 112–116.
- [46] Nahas, L. (1979) Thrombin like and factor X activator components of *Bothrops* snake venoms. *Thromb Haemostasis* 41: 314.
- [47] Nikai, t., Ohara, A., Komori, Y., Fox, J.W. and Sugihara, H. (1995) Primary structure of a coagulant enzyme, bilineobin, from *Agkistrodon bilineatus* venom. *Arch. Biochem. Biophys.* 1; 318(1): 86-96.
- [48] Ownby, C. L., (1982). Pathology of Rattlesnake Envenomation. In: Rattlesnake Venoms: Their Actions and Treatment, ed by A. T. Tu, pp. 163-209, Copyright MARCEL DEKKER, INC, New York, NY.
- [49] Phillips, M.A. and Fletterick, R.J. (1992) Proteases. *Curr.Opin.Struc.Biol.*, 2: 713-720.
- [50] Prado- Franceschi, J., Tavares, D. G., Hertel, R., and Lobo de Araújo, A. (1981). Effects of convulxin, a toxin from the rattlesnake venom, on platelets and leukocytes of anaesthetized rabbits. *Toxicon* 19, 661-666.
- [51] Richards, G.M. du Vair G., and Laskowski, M.,Sr (1965) Comparison of the levels of phosphodiesterase, endonuclease and monophosphatases in several snake venoms. *Biochemistry* 4, 501.
- [52] Rosenfield, G. and Cillo, D.M. (1956) Neutralização pelo veneno botrópico do efeito anticoagulante da heparina. *Ver.Clin. São Paulo* 32: 27.
- [53] Sampaio, S. V., Laure, C. J., and Giglio, J. R. (1983) Isolation and characterization of toxic protein from the venom of the Brazilian scorpion *Tityus serrulatus*. *Toxicon* 21(2), 265-277.
- [54] Schägger, H. and Von Jagow, G. (1987) Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of the proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal biochem.* 166(2), 368-379.
- [55] Simy Loayza, Yolanda Morante, Sonia Campos y Armando Yarlequé (1985) Enzimas proteolíticas en los venenos de las serpientes peruanas *Lachesis muta* y *Bothrops atrox*. Boletín de la Sociedad Química del Perú. 1985.
- [56] Siqueira, J. E., Higuchi, M. L., Nabut, N., Lose, A., Souza, J. K. and Nakashima, M. (1990) Lesão miocárdica pela espécie *Crotalus durissus terrificus* (cascavel). *Relato de caso. Arq. Bras. Cardiol.* 54, 323-325.
- [57] Sixma, J. J.; Zanten, G. H.; Saelman, E. U. M.; Verkleij, M.; Lankhof, H.; Nieuwenhuis, H. K.; Groot, P. G. (1995). Platelet adhesion to collagen. *Thromb. Haemost.*, 74: 454–459.
- [58] Smith, L. A. and Schmidt, J. (1990) Cloning and nucleotide sequence of crotamine genes. *Toxicon* 28(5), 575-585.
- [59] Solís, C., Escobar, E., Yarlequé, A., y Gutiérrez, S. (1999) Purificación y caracterización de la L-aminoácido oxidasa del veneno de la serpiente *Bothrops brazili* "jergón shushupe". *Revista Peruana de Biología* 6 (1): 75-84.
- [60] Teng, C.M., and Wang, J.P. (1988) Edema formation in rat hind-paw induced by some proteases isolated from *Trimeresurus mucrosquamatus* snake venom. In: *World Congress of Animal, Plant and Microbial Toxins*. 9 Stillwater.
- [61] Toyama, M. H., Soares, A. M., Wen-Hwa, L., Polikarpov, I., Giglio, J. R., Marangoni, S. (2000). Amino acid sequence of piratoxin-II, a myotoxic Lys49 phospholipase A₂ homologue from *Bothrops pirajai* venom. *Biochimie*, 82(3): 189–264.
- [62] Tu, A. T. (1977) Venoms of crotalidae (Crotalids, pit vipers) in venoms: Chemistry And Molecular Biology, Jhon Wile & Sons Ed., New York, P 211.
- [63] Tu, A. T. (1982). Chemistry of rattlesnake venoms. in rattlesnake venoms, their actions and treatment. New York, Marcel Dekker.
- [64] Tu, A. T. (1996). Overview of snake venom chemistry. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 391: 37–62.
- [65] Warshel, A., Naray-Szabo, G., Sussman, F. and Hwang, J.K. (1989) How do serine protease really work *Biochemistry*, 28: 3629-3637.
- [66] Weinrauch, Y., Elsbach, P., Madsen, L.M., Foreman, A. E Weiss, J. (1996) The potent ant. *Staphylococcus aureus*. activity of a rabbit inflammatory fluid is due to a 14 Kda Phospholipase A₂. *J. Clin. Invest.* 1997. 250-257.
- [67] White, A., Handler, P. and Smith, E.L. (1986) Enzimas hidrolíticas. In *Principios de Bioquímica*. Editora Guanabara Koogan. Brasil.
- [68] Yarlequé, A. (1992) Investigación en venenos de serpientes. *Alma Mater* Nro.2. Ver.Inv. UNMSM. P.61-66.
- [69] Yarlequé, A. (2000) Las serpientes peruanas y sus venenos. Universidad Nacional mayor de San Marcos. Fondo Editorial.
- [70] Yarlequé, A., Escobar, E. Y Campos S. (1983) Exonucleasas y otras actividades nucleolíticas en los venenos de *Lachesis muta* y *Bothrops atrox*. *Acta científica Venezolana* 34: 336-340.
- [71] Zhang, Y.; Wisner, A.; Maroun, R.C.; Choumet, V.; Xiong Y. L.; Bon, C. (1997). Expression and site-directed mutagenesis of *Trimeresurus stejnegeri* snake venom plasminogen activator. *J. Venom Anim. Toxins*, 3: 207.

Recibido el 17 de Noviembre del 2016 y aceptado para su publicación el 10 de Diciembre del 2016