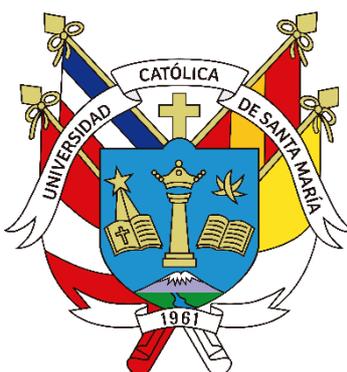


Universidad Católica de Santa María
Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y
Biotechnológicas
Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica



**PROTEÍNAS PRESINÁPTICAS COMO MARCADORES DE LA
ACTIVIDAD NEUROTÓXICA “EX VIVO” DE FOSFOLIPASAS A₂,
PROCEDENTES DE LOS VENENOS DE *Bothrops andianus* Y *Crotalus
scutulatus scutulatus***

Tesis presentada por el Bachiller:
Yi Luzquiños, Brian Jonathan Jesús
para optar el Título Profesional de
Químico Farmacéutico

Asesor:
Dr. Ponce Soto, Luis Alberto

Arequipa- Perú
2023

UCSM-ERP

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA
FARMACIA Y BIOQUIMICA
TITULACIÓN CON TESIS
DICTAMEN APROBACIÓN DE BORRADOR

Arequipa, 12 de Abril del 2023

Dictamen: 005572-C-EPFyB-2023

Visto el borrador del expediente 005572, presentado por:

2011602861 - YI LUZQUIÑOS BRIAN JONATHAN JESUS

Titulado:

**PROTEÍNAS PRESINÁPTICAS COMO MARCADORES DE LA ACTIVIDAD NEUROTÓXICA EX VIVO
DE FOSFOLIPASAS A2, PROCEDENTES DE LOS VENENO DE BOTHROPS ANDIANUS Y CROTALUS
SCUTULATUS SCUTULATUS**

Nuestro dictamen es:

APROBADO

**29389056 - PAZ ALIAGA CARLOS EITEL IVAN
DICTAMINADOR**



**43668681 - PAREDES FUENTES JULITZA LINDSEY
DICTAMINADOR**



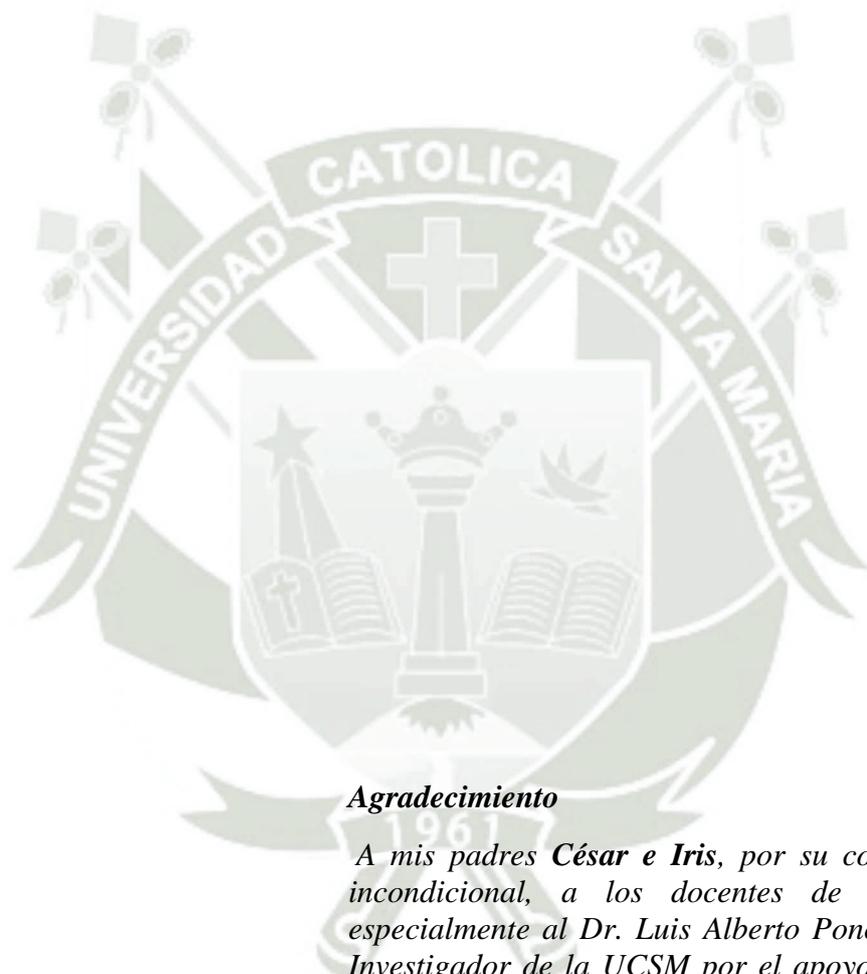
**40617097 - NIETO MONTESINOS RITA MILAGROS
DICTAMINADOR**





Dedicatoria

*In memoriam de mi abuela **Margarita** y mi abuelo **Juan**,
a toda mi familia y en especial a **Patricia** y **Gael**, amores
de mi vida.*



Agradecimiento

A mis padres César e Iris, por su confianza y apoyo incondicional, a los docentes de mi Facultad y especialmente al Dr. Luis Alberto Ponce Soto, Docente Investigador de la UCSM por el apoyo brindado en mi formación profesional.

RESUMEN

Las serpientes han sido motivo de fascinación, miedo y mito a lo largo de la historia. Su mordedura causa efectos locales y sistémicos con diversas secuelas, además de una variedad de disturbios hematológicos y bioquímicos, los cuales en la mayoría de los casos llevan a la muerte.

Nuestro país registra más de 50 especies de serpientes, destacando las familias de serpientes venenosas, Viperidae y Elapidae. En la Amazonía peruana, los envenenamientos por mordedura de serpiente ocurren por al menos siete serpientes de la familia Viperidae. Sin embargo, la información sobre las actividades tóxicas de las PLA₂(s) del veneno de *Bothrops andianus* y *Crotalus scutulatus scutulatus*, es aún escasa(1).

Por ello, el presente proyecto pretende brindar un aporte de investigación al estudiar en forma comparativa la potencia neurotóxica “*ex vivo*” de fosfolipasas A₂, procedentes de los venenos de *Bothrops andianus* y *Crotalus scutulatus scutulatus*, describiendo la purificación, caracterización bioquímica/farmacológica, aisladas de los venenos de las serpientes mencionadas, con el fin de comprender su participación en los eventos fisiopatológicos provocados por la mordedura de estas serpientes.

El método de purificación propuesto fue adecuado para la purificación de ambas PLA₂ a partir de los venenos de *Bothrops andianus* y *Crotalus scutulatus scutulatus*, ya que fue posible aislar las proteínas en un único paso cromatográfico. Al comparar los dos venenos se demostró que el veneno de *Crotalus scutulatus scutulatus* tiene un mayor efecto tóxico en el cultivo de mioblastos y miotubos C2C12 con un valor de 97.95% ± 3,95% y la actividad neurotóxica, muestra que la PLA₂ provenientes de *Crotalus scutulatus scutulatus*, tienen mayor potencia neurotóxica “*in vitro*” al disminuir la fuerza contráctil en el modelo de *biventer cervicis* de pollo.

Palabras claves:

Neurotóxica

Ex vivo

Fosfolipasas A₂

ABSTRACT

Snakes have been a source of fascination, fear, and myth throughout history. Its bite causes local and systemic effects with various sequelae, as well as a variety of hematological and biochemical disturbances, which in most cases lead to death.

Our country registers more than 50 species of snakes, highlighting the families of venomous snakes, Viperidae and Elapidae. In the Peruvian Amazon, snakebite envenomings occur from at least seven snakes in the Viperidae family. However, information on the toxic activities of PLA2(s) from the venom of *Bothrops andianus* and *Crotalus scutulatus scutulatus* is still scarce(1).

For this reason, this project aims to provide a research contribution by comparatively studying the "ex vivo" neurotoxic potency of phospholipases A₂, from *Bothrops andianus* and *Crotalus scutulatus scutulatus* venoms, describing the purification, biochemical/pharmacological characterization, isolated of the venoms of the aforementioned snakes, in order to understand their participation in the pathophysiological events caused by the bite of these snakes.

The proposed purification method was suitable for the purification of both PLA2 from *Bothrops andianus* and *Crotalus scutulatus scutulatus* venoms, since it was possible to isolate the proteins in a single chromatographic step. When comparing the two venoms, it was shown that the *Crotalus scutulatus scutulatus* venom has a greater toxic effect on the culture of C2C12 myoblasts and myotubes with a value of $97.95\% \pm 3.95\%$ and the neurotoxic activity shows that PLA2 from *Crotalus scutulatus scutulatus*, have greater neurotoxic potency "in vitro" by decreasing the contractile force in the *chicken biventer cervicis* model.

Key words:

neurotoxic potency

phospholipases A₂,

Bothrops andianus and *Crotalus scutulatus scutulatus* venoms

ABREVIATURAS

PLA ₂	Fosfolipasa A ₂
HPLC	Cromatografía líquida de alta eficiencia.
kDa	Kilodaltons
MALDI TOF	Ionización / desorción de matriz asistida por láser - tiempo de vuelo
<i>Pi</i>	punto isoeléctrico
CK	Creatina quinasa
AMBIC	bicarbonato de amonio
Rpm	revoluciones por minuto
PDA 991	PAGSHotdiode detector de matriz
PBS	Tampón de fosfato de sodio
TFA	ácido trifluoroacético
PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida
SDS	Dodecil sulfato de sodio
TDT	Ditiotreitol
Tris	Tris [hidroximetil] aminometano
Tampón A	TFA al 0,1% utilizado para cromatografía HPLC
Tampón B	66% de acetonitrilo utilizado en cromatografía HPLC
mA	Miliamperios
NOAB	Sustrato cromogénico del ácido 4-nitro- (3-octanoil) benzoico

ÍNDICE

DEDICATORIA

AGRADECIMIENTO

RESUMEN

ABSTRACT

ABREVIATURAS

INTRODUCCIÓN.....	9
CAPÍTULO I – Serpientes, veneno y sus componentes.....	10
El veneno – accidente ofídico.....	12
Componentes de los venenos de serpientes viperidae.....	12
Veneno Botrópico.....	13
<i>Crotalus scutulatus scutulatus</i>	14
Fosfolipasa A ₂	19
Miotoxinas.....	27
Neurotoxinas.....	28
Principales serpientes venenosas del Perú.....	30
Problema.....	30
Justificación.....	32
Objetivo general y específicos.....	33
Hipótesis	33
CAPÍTULO II – Materiales y Métodos.....	34
Material y reactivos.....	34
Cromatografía de interacción Hidrofóbica.....	34
Electroforesis en Page-SDS.....	35
Determinación de la actividad Fosfolipásica A ₂	35
Estudio de la actividad neurotóxica “EX VIVO”	35
Determinación del efecto citotóxico en cultivo celular de Mioblastos y Miotubos (C2C12) de Pla ₂ purificadas a partir de venenos de <i>Bothrops Andianus</i> y <i>Crotalus Scutulatus</i> <i>Scutulatus</i>	36
Western Blot (WB).....	37
Análisis estadístico.....	38
CAPÍTULO III – Resultados.....	39
Purificación de la fracción del veneno <i>Bothrops andianus</i> Y <i>Crotalus scutulatus scutulatus</i> en cromatografía de Interacción hidrofóbica.....	39
Electroforesis en SDS-Page.....	40
Determinación de la actividad PLA ₂	40
Determinación de actividad neurotóxica “in vitro” PLA ₂	41
Determinación del efecto citotóxico en cultivo celular de Mioblastos y Miotubos (C2C12) de PLA ₂	44
Western Blotting de proteínas presinápticas.....	46
Discusión.....	46
Conclusiones.....	51
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	52

INTRODUCCIÓN

Desde la perspectiva médica, en Perú como en muchos lugares del mundo, el accidente ofídico tiene valor en salud pública por sus implicancias sobre el aumento de la morbilidad en personas y animales. La familia Viperidae con sus géneros *Bothrops*, *Porthidium*, *Bothriopsis* y *Bothriechis*, es la más importante por ser responsable de más del 90% de accidentes ofídicos en el Perú; sin embargo, la información sobre las actividades tóxicas de las PLA2(s) del veneno de *Bothrops andianus* y *Crotalus scutulatus scutulatus*, es aún escasa.

Según Angulo y Lomonte, el aislamiento y caracterización de los componentes individuales del veneno constituye el sustento de la Toxinología, como estrategia fundamental para analizar y comprender la compleja serie de eventos involucrados en el envenenamiento.

De ahí que la investigación a realizar permitirá conocer más detalles específicos respecto a los componentes de los venenos de serpiente viperidae, el veneno Botrópico, el veneno de *Crotalus Scutulatus Scutulatus*, así como concretar mayor indagación respecto de Fosfolipasa A2, Miotoxinas, Neurotoxinas; Cromatografía de interacción Hidrofóbica, Electroforesis en Page-SDS, Determinación de la actividad Fosfolipásica A2; el estudio de la actividad neurotóxica “EX VIVO”, Determinación del efecto citotóxico en cultivo celular de *Mioblastos* y *Miotubos* (C2C12) de Pla2 purificadas a partir de venenos de *Bothrops Andianus* y *Crotalus Scutulatus Scutulatus*.

Asimismo, en el presente trabajo describiremos la purificación, caracterización bioquímica/farmacológica y secuenciamiento de aminoácidos de dos PLA2 denominadas, aisladas de los venenos de *Bothrops andianus* y *Crotalus scutulatus scutulatus*, con el fin de comprender su participación en los eventos fisiopatológicos provocados por la mordedura de estas serpientes, constituyendo un aporte para contar con información que permita mejorar las intervenciones frente a los accidentes ofídicos.

CAPÍTULO I

1.- SERPIENTES, VENENO Y SUS COMPONENTES:

Las serpientes han sido motivo de fascinación, miedo y mito a lo largo de la historia. En el antiguo Egipto, se adoraba a la cobra. Su réplica se usaba para decorar las coronas de los emperadores romanos y en el antiguo mundo griego, el dios de la medicina (Esculapio) vestía la prenda de un bastón cruzado con una serpiente, símbolo que todavía se utiliza para representar la Medicina.

Las serpientes componen el suborden Serpentes, que, actualmente con alrededor de 2930 especies, es el segundo en abundancia de especies después de Sauria (lagartos y lagartos) con 4636 especies. Las serpientes y Sauria forman el Orden Squamata, el grupo principal, más numeroso y moderno de reptiles vivientes.

Brasil tiene una fauna de serpientes muy rica, muchas de las cuales aún son poco conocidas o poco estudiadas, aunque esta situación ha ido cambiando en los últimos años. Hay alrededor de 265 especies, clasificadas en 73 géneros, agrupadas en 9 familias. De todas estas, solo las familias Elapidae y Viperidae agrupan las especies venenosas, es decir, aquellas que producen toxinas (veneno) en glándulas especializadas y cuentan con dispositivos adecuados para inocularlas.

El veneno de serpiente es una mezcla compleja de proteínas, nucleótidos e iones inorgánicos. Según Kini (2003) (53), entre los compuestos inorgánicos se encuentran el calcio, cobre, hierro, potasio, magnesio, manganeso, sodio, fósforo, cobalto y zinc; otros componentes presentes en el veneno incluyen carbohidratos (glicoproteínas), lípidos (fosfolípidos), aminas biogénicas, aminoácidos y nucleótidos. Sin embargo, la mayoría de los compuestos presentes en el veneno de serpiente están formados por proteínas, que corresponden aproximadamente del 90% al 95% del peso seco del veneno.

Entre las proteínas del veneno se encuentran las denominadas proteasas, que tienen actividad enzimática, teniendo como sustrato las proteínas de presa. Los principales ejemplos de proteasas presentes en los venenos son las metaloproteasas y las serina proteasas. Sin embargo, varios otros tipos de proteínas se encuentran en venenos tales como: fosfolipasas, fosfodiesterasas, colinesterasas, aminotransferasas, L-amino oxidasas, catalasas, ATPasas, hialuronidasas, NAD nucleosidasas y L-glicosaminidasas (42). Esta combinación de péptidos y polipéptidos hace que el veneno tenga diferentes propiedades tóxicas (5).

2.- EL VENENO

Los venenos ofídicos consisten en una mezcla de proteínas, sustancias orgánicas, sales, iones azúcares y lípidos, siendo que cerca del 90 al 95% del peso seco del veneno de serpientes está constituido por proteínas que presentan importantes funciones biológicas.

Dentro de los iones, se puede destacar al calcio, que es un importante cofactor de algunas enzimas proteolíticas y de las fosfolipasas A_2 ; el Magnesio y el Zinc que también son importantes iones para la acción de las principales metaloproteasas (31).

2.1.- ACCIDENTE OFÍDICO

La ofidiotoxicosis o accidente ofídico es una intoxicación producida por la inoculación de veneno al organismo de la víctima, a través de la mordedura de una serpiente venenosa que lesiona los tejidos y/o causa un cuadro clínico característico, provocando alteraciones fisiopatológicas locales o sistémicas.

Los venenos de las serpientes son secreciones tóxicas de glándulas especializadas, diseñados y perfeccionados a lo largo de la cadena evolutiva para favorecer la supervivencia de estos animales en su ambiente natural. Teniendo en cuenta la amplia distribución geográfica de las serpientes a lo largo y ancho del planeta existe también gran variabilidad y especialización en cuanto a sus características biológicas y los aspectos tóxicos de los venenos en función de su hábitat.

El accidente ofídico tiene valor en salud pública. Perú al poseer una parte de su territorio con ambientes apropiados de hábitat de diversidad de ofidios venenosos en las diferentes regiones, con condiciones no solo geográficas y climáticas sino también socioculturales y demográficas, permite que en la población se aumente la susceptibilidad de sufrir una mordedura, provocando el incremento de la morbilidad no solo de personas sino también de animales.

La familia Viperidae es la más importante desde el punto de vista médico, dentro de esta familia están los géneros Bothrops, Porthidium, Bothriopsis y Bothriechis los cuales son responsables del 90 – 95% de los accidentes ofídicos en Perú (1).

2.2.- COMPONENTES DE LOS VENENOS DE SERPIENTE DE LA FAMILIA VIPERIDAE

Los venenos de serpiente son secreciones de naturaleza seromucosa cuyos componentes se pueden clasificar de forma muy general y atendiendo criterios fármaco-cinéticos, en toxinas o enzimas, haciendo la salvedad que hay componentes de venenos que muestran ambos tipos de actividad (32).

Por otra parte, los componentes de los venenos se pueden clasificar de acuerdo a su capacidad para provocar una respuesta inmune en la víctima. Desde este punto de vista, el veneno de serpiente tiene dos tipos de componentes: a) Componentes inmunogénicos, los cuales son proteínas que constituyen más del 98% del veneno según León y cols. (33) o más de 90 % según Ramos y cols. (34) en peso seco e incluye toxinas capaces de inducir efectos tóxicos relevantes, así como también proteínas no tóxicas, y b) Componentes no inmunogénicos, tales como aminoácidos, nucleótidos, carbohidratos, lípidos y aminos biogénicas, las cuales constituyen menos del 2% del veneno en peso seco (33).

A partir de estudios de venómica se ha demostrado que aunque el veneno de serpiente de la familia viperidae está compuesto por varias proteínas, todas ellas pertenecen a un pequeño grupo de familias de proteínas, incluyendo metaloproteinasas dependientes de Zn^{+2} (svMPs), Serinproteinasas (SP), Fosfolipasas (PLA_2), L-amino ácido oxidasa (LAO), desintegrinas, lectinas tipo C (CTL) y proteínas similares a lectinas, péptidos natriuréticos, proteínas de secreción rica en cisteína (CRISPs) e inhibidores de proteasas tipo Kunitz.

Cada familia de proteínas posee ciertas propiedades que determinan su inmunogenicidad, entre ellas su tamaño y por tanto su masa molecular (Tabla 1), estructuras terciarias y modificaciones post-traduccionales. Además, diferentes proteínas están presentes en una concentración variable en los venenos, un factor que también influencia su inmunogenicidad.

Lo anterior se ve reflejado en los reportes de la literatura existentes con respecto a la composición proteica de venenos de diferentes géneros de la familia Viperidae los cuales se resumen en las secciones siguientes (33).

Tabla 1

Masas moleculares de las principales toxinas de los venenos de serpientes de la familia Viperidae. Principales familias de proteínas encontradas en los venenos de serpiente y sus masas moleculares.

Familia de proteínas	de	Características	Masa molecular (KDa)
Metaloproteinasas		Compuestas por un dominio de enlace único Zn ⁺² Metaloproteinasas (Dominio catalítico).	P-I SVMPS, 20 - 30
		Poseen un dominio desintegrina en adición al dominio catalítico.	P-II SVMPS, 30 - 60
		Comprende dominios metaloproteinasas, similar a desintegrina y rica en cisteína.	P-III SVMPS, 50 - 70
Serínproteinasas		Conservan triadas catalíticas (Ser, His, Asp)	25 -70
L-aminoacido oxidasas		Generalmente como glicoproteínas homodiméricas y unas pocas monoméricas.	110 – 150
Desintegrinas		Monómeros o dímeros. Homo o heterodímeros, con fragmentos que contienen dominios adicionales (tales como dominios ricos en cisteína).	4 - 15
Lectinas tipo C y proteínas similares		Compuestos monoméricos (Lectinas tipo C). Compuestos heterodímeros (proteínas similares a Lectinas tipo C)	~ 30

3.- VENENO BOTRÓPICO.

Se describen tres actividades fisiopatológicas del veneno de especies botrópicas (*Bothrops* sp.): Coagulante, proteolítica (definida como inflamatoria aguda) y hemorrágica (43). Evidentemente, estas actividades son extremadamente complejas y generalmente se pueden atribuir a componentes específicos. Sin embargo, diferentes toxinas pueden actuar de manera complementaria para inducir un determinado efecto, así como una sola toxina puede tener varias actividades (44).

Una característica de la intoxicación botrópica es un intenso dolor local. El efecto hiperalgésico ha sido estudiado experimentalmente en ratas con veneno de *Bothrops jararaca* (45), demostrando que este efecto está mediado principalmente por prostaglandinas, leucotrienos y factor activador de plaquetas (PAF).

A continuación, describimos las actividades más importantes de la intoxicación botrópica:

3.1.- ACTIVIDAD HEMORRÁGICA.

El sangrado es causado por toxinas llamadas hemorragias que son enzimas proteolíticas del tipo metaloproteasa, ya que su actividad enzimática depende de la presencia de un átomo de zinc en su sitio activo (46). Las hemorragias pueden

alterar la integridad del endotelio vascular y tener actividad desintegrina, además de ser potentes inhibidores de la agregación plaquetaria. Se han descrito y estudiado los efectos hemorrágicos de varias metaloproteasas de especies botrópicas, como BaP1, toxina hemorrágica aislada de *Bothrops asper*, BjussuMP-I, aislada de *Bothrops jararacussu* (47).

3.2.- ACTIVIDAD COAGULACIÓN Y AGREGACIÓN PLAQUETARIA.

El veneno de *Bothrops* tiene la capacidad de activar factores de coagulación sanguínea, provocando el consumo de fibrinógeno y la formación de fibrina intravascular, lo que frecuentemente induce la incoagulabilidad de la sangre, además de activar la protrombina en la cascada de coagulación sanguínea. La fracción del veneno que tiene esta acción coagulante actúa de manera diferente a la trombina fisiológica, ya que no es neutralizada por la heparina (48,49).

3.3.- ACTIVIDAD INFLAMATORIA.

Es causada por varias fracciones de veneno botrópico, por ejemplo, aminas biogénicas, preformas de tipo histamina, proteínas como PLA₂, esterasas, proteasas, enzimas liberadoras de quinina y lectina. La actividad edematosa es muy potente, evidenciada en casos clínicos y modelos experimentales. En este último, las dosis de veneno o fracciones necesarias para inducir un efecto significativo van desde unos pocos microgramos hasta décimas de microgramos (43). En estudios experimentales con BaTX, un PLA₂ homólogo K49 aislado de *Bothrops alternatus*, se encontró que una dosis de 2.5 µg es capaz de producir edema en el modelo de la almohadilla plantar del ratón (50). Por otro lado, 0.9 µg de veneno de *Bothrops asper* en el mismo modelo es capaz de inducir edema inmediato y transitorio en la extremidad inyectada.

4.- *CROTALUS SCUTULATUS SCUTULATUS*

La identificación de la serpiente de cascabel de Mojave (*Crotalus scutulatus scutulatus*) tiene importantes implicaciones diagnósticas y terapéuticas. El envenenamiento por ciertas poblaciones de serpientes de cascabel de Mojave puede causar una presentación clínica diferente a la causada por otras serpientes de cascabel. Específicamente, el envenenamiento por serpientes de cascabel de Mojave puede causar menos efectos

locales y más efectos neurológicos (incluida la dificultad respiratoria) que los que se ven típicamente después de las mordeduras de otros tipos de serpientes de cascabel (35).

Por lo tanto, es útil para los médicos distinguir la serpiente de cascabel de Mojave de otras serpientes de cascabel para evitar la subestimación del envenenamiento severo debido a la falta de lesión tisular local. Los pacientes sospechosos de haber sido mordidos por serpientes de cascabel de Mojave pueden necesitar un tratamiento más agresivo con antiveneno, así como cuidados de apoyo más intensivos. Además, Los pacientes con sospecha de haber sido mordidos por serpientes de cascabel de Mojave deben ser monitoreados de cerca durante un período de observación prolongado, ya que los efectos del veneno pueden retrasarse o prolongarse.

Las serpientes de cascabel de Mojave pueden ser particularmente difíciles de distinguir de las serpientes de cascabel Western Diamondback (*Crotalus atrox*) debido a su similitud en apariencia y rangos superpuestos(43).

4.1.- PROTEÍNAS DEL VENENO DEL GÉNERO CROTALUS

La fosfolipasa A₂ escinden el enlace éster C-2 de 3-sn- de los fosfoglicéridos. Juega un central papel en el metabolismo de los lípidos y, por lo tanto, en alta concentración, contribuye a la toxicidad del veneno de serpiente.

La enzima ha sido aislada de venenos de varias especies de *Crotalus*, incluida *C. atrox*, *C. scutulatus salvini* y dos isoenzimas, ct y fl de *C. adamanteus*. Estas dos isoenzimas son indistinguibles por actividad específica y peso molecular, pero son cromatográfica y electroforéticamente diferentes(20).

Es sabido que exhiben un comportamiento de movilidad electroforética dimérica que producen las fosfolipasas A₂ de venenos de *Crotalus* y cada monómero es de aproximadamente 14.000 menos activo que la forma dimérica.

También se ha aislado del veneno de *C. scutulatus* la toxina de Mojave, una neurotoxina presináptica altamente tóxica. La toxina, que se encuentra en la mayoría de *C. s. scutulatus* de poblaciones estudiadas (24), son unos complejos proteicos, compuestos por subunidades ácidas y básicas. Lo subunidad básica, de pI 9,6 y peso molecular de 14.673, que es una fosfolipasa A₂.

No se ha demostrado actividad enzimática, para el componente ácido aislado. El complejo pierde toxicidad si las subunidades son separadas, pero la reconstitución genera toda la potencia de la toxina.

La Crotoxina, aislada del veneno de *C. durissus terrificus* ha exhibido propiedades similares. Reacciona de forma cruzada inmunológicamente con toxina de Mojave, y su subunidad básica también es una fosfolipasa A₂. La subunidad básica no reacciona de forma cruzada inmunológicamente con una fosfolipasa ácida A₂ aislada de este veneno.

Los estudios por electroforesis en geles que contienen fosfatidilcolina, mostraron varias fosfolipasas presentes en el veneno de *C. s. scutulatus*. No se ha informado si estas proteínas corresponden a la subunidad básica del complejo de la toxina de Mojave. Datos sobre la variación intraespecífica de PLA₂ en el veneno de esta especie también es limitado (53).

4.2.- EFFECTO TÓXICO DEL VENENO DEL GÉNERO CROTALUS

La especie *C. durissus terrificus* del género *Crotalus* es la más ampliamente extendida en Sudamérica, incluyendo el Perú. El envenenamiento causado por esta serpiente está caracterizado por neurotoxicidad, miotoxicidad sistémica, edema leve y falla renal aguda; en adición, se han reportado también alteraciones hemostáticas. La presencia principalmente de crotoxina, bloquea la liberación de la acetilcolina, causando aislamiento y alteración de la transmisión neuromuscular y síntomas miálgicos, consecuente parálisis progresiva, con paresis en la distribución de los nervios craneales III, IV y VI y nervios motores somáticos periféricos(10).

También induce miotoxicidad con lesiones musculares locales causadas por la crotamina y crotoxina. La neurotoxicidad sistémica es frecuentemente acompañada con rhabdmiolisis con elevación de los niveles de suero de mioglobina y creatina fosfoquinasa y consecuente mioglobinuria y falla renal aguda, causando necrosis aguda tubular la cual representa la primera causa de muerte, el efecto coagulante es provocado por la activación de la trombina que convierte el fibrinógeno a fibrina con moderada coagulopatía (37).

4.3.- MECANISMOS DE DAÑO

Una de las más drásticas consecuencias del envenenamiento por mordedura de serpientes viperidae es el desarrollo de efectos locales patológicos, caracterizados como se mencionó anteriormente, por edema, mionecrosis, dermonecrosis, inflamación y hemorragia. Si no son tratadas pronta y efectivamente, esto puede

resultar en secuelas y daño permanente del tejido con un prolongado y duradero efecto físico y psicológico en la persona afectada. Es por esta razón que se han realizado investigaciones que contribuyen al entendimiento de este complejo fenómeno.

Las miotoxinas con actividad PLA₂ inducen daño muscular agudo al afectar primero la integridad de la membrana plasmática del músculo esquelético, a través de la hidrólisis de fosfolípidos, promoviendo así un flujo de calcio degenerando la célula y provocando un daño irreversible. El veneno de serpiente del género *Bothrops* contiene varias PLA₂, incluida la forma inactiva Lys49 capaz de desencadenar una fuerte lesión celular descrita en los procesos miotóxicos (35).

Un estudio reciente ha observado una estricta relación entre la inhibición de la actividad de PLA₂ en el veneno de *Bothrops* y su miotoxicidad, pero sin bloqueo neuromuscular, proponiendo que el bloqueo neuromuscular puede ser inducido por PLA₂ no catalítica u otros componentes del veneno, tales como metaloproteinasas. En efecto, dependiendo de la subfamilia (ej. D49 o K49), las enzimas sv PLA₂ pueden tener un rol en el efecto miotóxico o neurotóxico a diferentes extensiones y por distinto mecanismo molecular.

Trabajos con miotoxinas Mt-I y Mt-II de *Bothrops* han mostrado que la svPLA₂ induce la entrada de Ca⁺² y la liberación de ATP que causa la mionecrosis, a través de diferentes perfiles de hidrólisis de fosfolípidos de la monocapa externa del sarcolema.

Las miotoxinas se unen a sitios “aceptores” aún no identificados en la membrana plasmática, induciendo una rápida y drástica perturbación de la membrana basada en eventos tanto dependientes de la catálisis (que involucran el residuo Asp49 de PLA_{2s}), como independientes de esta (en el caso de proteínas homólogas de PLA₂ con Lys49). El daño de la membrana resulta en la pérdida del control de la permeabilidad a los iones y macromoléculas. La principal consecuencia de esta alteración es una prominente afluencia de Ca⁺² que desencadena una serie de eventos degenerativos intracelulares, tales como hipercontracción de miofilamentos, alteraciones mitocondriales, y la activación de proteasas dependientes de Ca⁺² citosólico y PLA_{2s}. Finalmente, las células musculares pasan rápidamente el "punto de no retorno" y se dañan irreversiblemente (39).

4.4.- PROTEÍNAS MENORES

Las toxinas más abundantes han sido ampliamente estudiadas en las últimas décadas y algunas de ellas ya han sido utilizadas para diferentes propósitos. Sin embargo, la mayoría de las clases menores de proteína de veneno de serpiente siguen siendo poco exploradas, incluso presentando posibles aplicaciones en diversas áreas. La principal dificultad para estudiar estas proteínas radica en la imposibilidad de obtener cantidades suficientes de ellas para una investigación exhaustiva, entre las familias de proteínas de veneno de serpiente poco abundantes, se encuentran factores de crecimiento, proteínas secretoras ricas en cisteína, nucleasas y nucleotidasas, entre otros.

Muchos mecanismos reguladores tienen impacto en la composición de las proteínas de los venenos de serpiente, tales son las mutaciones que afectan la expresión de genes, duplicación y pérdida de genes relacionados con toxinas, regulación post-transcripcional de micro RNAs y procesamiento proteolítico. A pesar de que presentan niveles de expresión variable en diferentes venenos de serpientes, las toxinas patológicamente importantes, como las fosfolipasas A₂, metaloproteinasas, familias de toxinas de calicreína y toxinas de tres dedos son generalmente las proteínas más abundantes que se encuentran en estas muestras biológicas.

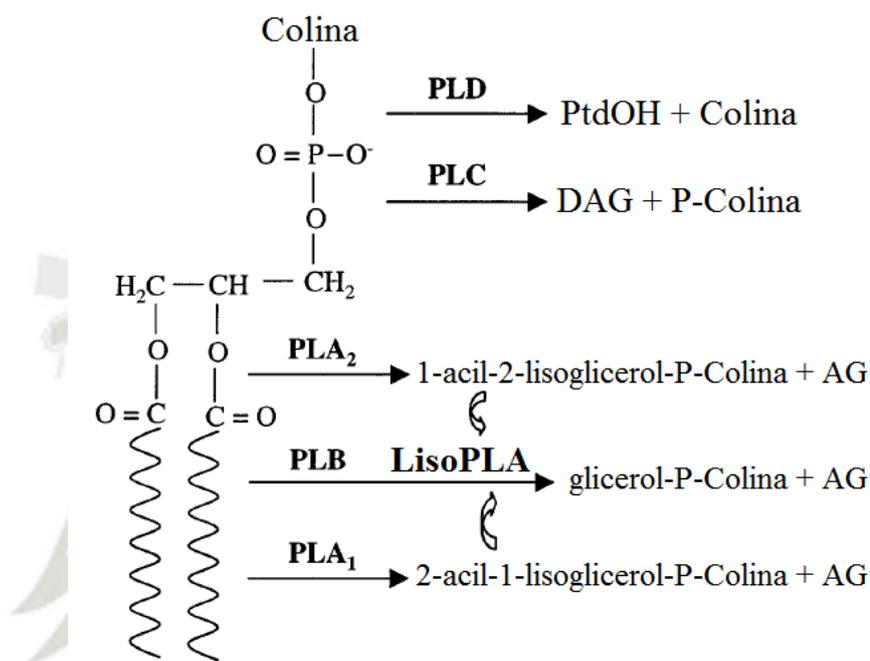
Algunas de estas toxinas componen hasta el 80% del total de proteínas del veneno, como las fosfolipasas A₂ del veneno de *Crotalus durissus*, que forma el complejo crototoxina que es una neurotoxina responsable de los principales síntomas clínicos del envenenamiento crotálico en América del Sur. Las principales toxinas de las serpientes están codificadas por las familias de genes que muestran una duplicación sustancial de genes y selección direccional y, en consecuencia, la mayor variación.

Por otro lado, se supone que las proteínas menores del veneno de serpiente tienen funciones auxiliares, menos variabilidad y poco o nada han experimentado duplicación de genes y selección positiva. Este contraste puede ser un resultado similar a la conservación de las funciones y la baja abundancia relativa de proteínas auxiliares en los venenos, lo que excluye su participación en el envenenamiento (36).

5.- FOSFOLIPASA A₂

Las fosfolipasas son enzimas esterolíticas que hidrolizan los glicerofosfolípidos. Según su modo de acción, se clasifican en cuatro grupos diferentes, denominados A1, A2, B, C y D (PLA₁, PLA₂, PLB, PLC y PLD) según el sitio de hidrólisis en el sustrato (51) (Figura 1).

Figura 1: Hidrolisis de las diferente Fosfolip en sustrato (51).



Los venenos de serpiente contienen una gran cantidad de proteínas bioactivas, entre ellas la fosfolipasa A₂ que depende del calcio, que cataliza la hidrólisis del 1,2-diacil-3-snglicerol a partir de los fosfoglicéridos, esta reacción libera cantidades equimolares de sn ácido graso -2 y lisofosfátido (52; 53). La fosfatidilcolina, el fosfatidilinositol, la fosfatidilserina, la fosfatidiletanolamina, el fosfatidilglicerol y el ácido fosfatídico son los sustratos de PLA₂ más comunes que conducen a la formación de diferentes lisofosfolípidos (54).

Las PLA₂ participan en una amplia variedad de procesos fisiológicos, incluida la digestión de fosfolípidos, la remodelación de la membrana celular y la defensa del huésped, y también participan en procesos fisiopatológicos que producen precursores de varios tipos de mediadores lipídicos biológicamente activos, como prostaglandinas, leucotrienos, tromboxanos y factor activador de plaquetas. (55). Las PLA₂ son enzimas ampliamente distribuidas en la naturaleza y son las más estudiadas entre todas las fosfolipasas (48;44; 56).

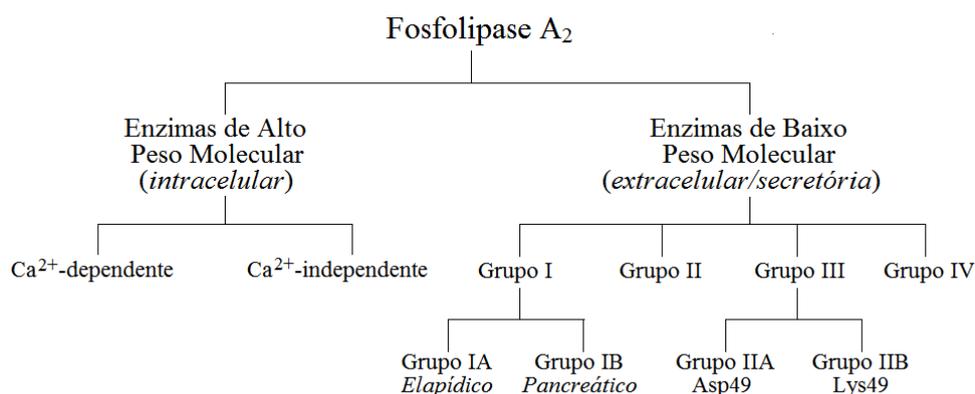
5.1.- CLASIFICACIÓN DE LAS ENZIMAS PLA₂

Existen varias formas de clasificar las PLA₂, según sus características bioquímicas como ubicación celular (intracelular y extracelular), requerimiento de Ca²⁺ (dependiente e independiente de Ca²⁺), especificidad de sustrato y estructura primaria, estas PLA₂ se clasifican en varias familias (57).

Inicialmente, los PLA₂ se clasificaron en dos grupos, que se utilizaron originalmente en 1977 para distinguir entre venenos de las familias Elapidae (serpientes, cobras, kraits, mambas y serpientes coralinas) e Hydrophyidae (serpientes marinas), ambos pertenecientes al grupo I y familia Viperidae. (surucucus, cascabel y jararacás) pertenecientes al grupo II, en base al número de puentes disulfuro (58).

Se han descubierto varias PLA₂ en secreciones (sPLA₂ o extracelular) y en el citosol (cPLA₂ o intracelular), así como enzimas de alto (61-114 KDa) y bajo peso molecular (13-18 KDa). Según Kini (1997) (48) las PLA₂ de bajo peso molecular se pueden subdividir en cuatro grupos (I, II, III y IV) por su estructura primaria (Figura 2), las PLA₂ intracelulares tienen alto peso molecular (85 kDa), generalmente son de membrana- asociado, dependiente del calcio e involucrado en el metabolismo de los fosfolípidos (alteraciones de la membrana), la señalización celular y la remodelación de los fosfolípidos PLA₂ (52; 59).

Figura 2: Clasificación de las enzimas PLA₂ (48)



* Kini RM. enzimas Venom Phosfolipasa A2 (48).

Actualmente, la superfamilia PLA₂s está compuesta por 15 grupos que, a pesar de sus variadas distribuciones y ocurrencias, se caracterizan por su similitud secuencial y estructural, diferenciándose únicamente por la ubicación y número

de puentes disulfuro y por la longitud de sus bucles. Por todas estas características mencionadas, Burke y Dennis (2009) (60) las clasifican en cinco tipos principales de PLA₂: sPLA₂ secretora, cPLA₂ citosólica, iPLA₂ independiente de Ca²⁺, PAF acetilhidrolasas y PLA₂ lisosomal.

Las PLA₂ de veneno de serpiente (sPLA₂) son proteínas secretadas que pertenecen a los grupos I y II. Los del grupo I se encuentran en venenos de serpientes de la familia Elapidae (Elapinae e hydrophiinae) y tejidos pancreáticos de mamíferos, mientras que los del grupo II se subdividen en siete subgrupos (IIA-IIIF), y el subgrupo IIA engloba las PLA₂ que se encuentran en los venenos de serpientes de la familia Viperidae (Viperinae y Crotalinae) y en tejidos no pancreáticos de mamíferos (59;60). Debido al avance constante de la secuenciación de aminoácidos y las técnicas de caracterización estructural, se han descubierto y se siguen descubriendo nuevas PLA₂, lo que requiere una revisión constante de la literatura para actualizar sus grupos y subgrupos.

Las sPLA₂ de baja masa molecular (13-18 kDa) tienen varias características distintas de otras familias de PLA₂, como un alto contenido de enlaces disulfuro, un requisito de concentraciones milimolares de calcio para la catálisis y una amplia especificidad para los fosfolípidos con diferentes grupos de cabeza polar y cadenas de ácidos grasos. Además de las funciones enzimáticas, pueden mostrar varias funciones biológicas (61), como la sPLA₂ de mamíferos que juega un papel importante en la fertilización (62), la proliferación celular (63; 64) e hipersensibilización y enfermedades inflamatorias crónicas (65; 66). Sin embargo, las enzimas de mamíferos generalmente no son tóxicas y no logran inducir efectos farmacológicos potentes.

Los venenos de serpientes del grupo I (Elapidae e Hydrophidae) y del grupo II (Crotalidae y Viperidae) son una fuente abundante de enzimas PLA₂ y presentan similitud en sus estructuras primarias y secundarias con las de los mamíferos, las PLA₂ se encuentran entre las principales proteínas tóxicas del veneno que exhiben un amplio espectro de efectos farmacológicos que interfieren con los procesos fisiológicos normales de las presas o víctimas (48; 49; 67) (Tabla 1). Las PLA₂ de veneno de serpiente existen típicamente como monómeros y a veces, como complejos formados entre las enzimas PLA₂, así como con otras proteínas, mediante interacciones covalentes o no covalentes. A menudo, un solo veneno de

serpiente contiene varias isoenzimas PLA₂ y, a veces, diferentes isoenzimas inducen diferentes efectos farmacológicos.

Tabla 1

Efectos Farmacológicos

Neurotoxicidad
neurotoxicidad presináptica
Neurotoxicidad postsináptica
Miotoxicidad
mionecrosis local
Miotoxicidad sistémica
Cardiotoxicidad
efectos anticoagulantes
Inicio de la agregación plaquetaria
Inhibición de la agregación plaquetaria
actividad hemolítica
Actividad inductora de hemoglobinuria
Hemorragia interna
actividad convulsiva
actividad hipotensora
Actividad formadora de edema
Daño a tejidos u órganos
Daño al Hígado, Riñones, Pulmones, Testículos, Pituitaria.

* Gutiérrez JM, Lomonte B. (70).

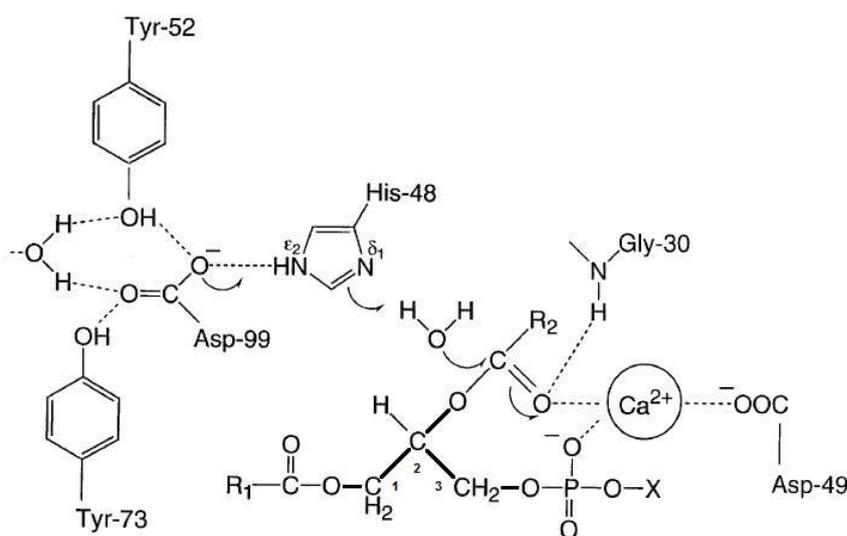
Por lo general, los del grupo IIA también se subdividen en dos subgrupos principales: los Asp49 PLA₂, llamados así porque tienen un residuo de aspartato en la posición 49 y son catalíticamente activos, y los Lys49 PLA₂, en los que el residuo de aspartato se reemplaza por residuo de lisina en la misma posición que tiene poca o ninguna actividad catalítica (68; 69), siendo ambos biológicamente activos. (70; 52). Además de la actividad enzimática, las PLA₂ del veneno pueden tener actividades neurotóxicas, miotóxicas, hemolíticas, anticoagulantes, cardiotóxicas y edematógenas, así como también acción agregante o antiagregante de plaquetas (52;48;49;71), siendo así una molécula multifuncional.

5.2.- MECANISMO CATALÍTICO DE PLA₂S

La unidad catalítica de PLA₂ consta de los residuos de aminoácidos His-48 (posición 48 de la cadena polipeptídica), Asp-99 y una molécula de agua (Figura3). En el mecanismo de catálisis propuesto, el protón en la posición 3 del

anillo imidazol de His-48 está involucrado en una fuerte interacción con el grupo carboxilato de Asp-99, impidiendo la rotación del anillo imidazol, dejando el nitrógeno en la posición 1 de este anillo (que está involucrado en la catálisis) en la posición espacial apropiada. Una molécula de agua promueve entonces un ataque nucleofílico sobre el carbono del grupo éster del sustrato y, en ese momento, el anillo imidazol de His-48 recibe un protón de la molécula de agua, facilitando la reacción.

Figura 3. Representación esquemática del mecanismo catalítico de PLA₂s



* Gutiérrez JM, Lomonte B. (70).

Después de la hidrólisis del enlace éster de acilo en la posición sn-2 del fosfoglicérido (sustrato), el anillo de imidazol dona este protón al oxígeno, que luego forma el grupo alcohol del lisofosfolípido que se liberará (72). y B). El mecanismo catalítico de la PLA₂ de bajo peso molecular (14 kDa) involucra residuos que participan en el bucle de unión de los iones Ca⁺² en la PLA₂ clásica, que son, Tyr-28 (posición 28 en la cadena polipeptídica), Gly-30, Gly-32 y Asp-49. En el mecanismo de catálisis, el calcio tiene una doble función: fijar el grupo fosfato del fosfolípido y estabilizar la carga negativa de oxígeno sobre el grupo carbonilo del enlace éster en la posición sn-2 del sustrato (73;74). También se ha sugerido que la amida NH de Gly-30 es un factor importante para estabilizar el estado de transición (75).

Como se mencionó anteriormente, el residuo de ácido aspártico en la posición 49 de las PLA₂ es esencial para la coordinación del ion Ca⁺². Este residuo es responsable, junto con otros aminoácidos, de la fijación del sustrato al sitio

enzimático y, en consecuencia, de la actividad catalítica que ejercen estas enzimas. Sin embargo, la sustitución natural de Asp49 por una lisina impide la coordinación de este ion (76) y, aún así, el Nε de la cadena lateral de Lys49 ocupa la posición del ion Ca^{+2} , haciendo inviable la reacción catalítica. (77) (Figura 4).

Figura 4: Acción Catalítica de PLA (77).

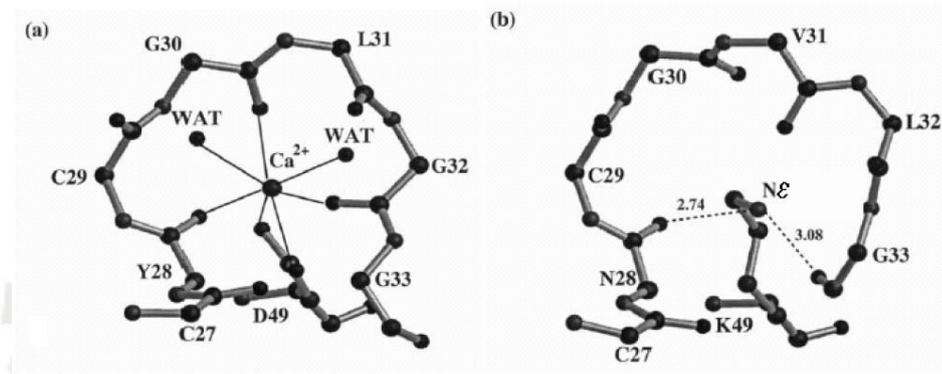


Figura 4: El. Círculo de unión de Ca^{+2} de un Asp49-PLA₂ de *Naja naja naja*. B. región análoga a la región de unión a Ca^{+2} de BaspTX-II (Lys49-PLA₂) del veneno de *Bothrops asper* (52;78).

Las Lys49-PLA₂ se consideran PLA₂ homólogas porque no tienen actividad catalítica detectable contra sustratos lipídicos. Son proteínas básicas e hidrofóbicas con alta actividad miotóxica tanto in vivo como in vitro (79; 80; 81; 82; 78).

5.3- ESPECIFICIDAD FARMACOLÓGICA DE LAS PLA₂

Según Kini, RM (2003) (53), las PLA₂ del veneno de serpiente comparten una estructura y función similares con las enzimas de los mamíferos. Sin embargo, entre los PLA₂ del veneno de serpiente, muchos son tóxicos e inducen un amplio espectro de efectos farmacológicos. Se propone que PLA₂ del veneno de serpiente tiene la capacidad de unirse a un "sitio específico" en las membranas de las células diana, debido a su alta afinidad para unirse a proteínas específicas que actúan como receptores o aceptores. Esta unión específica de PLA₂ la proporciona la presencia de un sitio "farmacológico" en su superficie, que es independiente del sitio catalítico.

La interacción de la alta afinidad de PLA₂ con su aceptor (proteína diana) probablemente se deba a la complementariedad de carga, hidrofobicidad y fuerzas de Van der Waals, que se produce entre el sitio farmacológico de PLA₂ y el sitio

diana en la superficie del receptor de la proteína o aceptor en la membrana celular. PLA₂ puede inducir sus efectos farmacológicos por mecanismos dependientes o independientes de su actividad enzimática.

Así, el esquema 2 representa la hipótesis presentada por Kini, RM (2003) (53):

1- La celda objetivo se diferencia de una celda no objetivo (extremo derecho) por la presencia de un sitio objetivo (A). Diferentes células o tejidos tienen diferentes sitios de destino en la superficie. Estos sitios diana pueden ser una proteína transmembrana o una glicoproteína que se encuentra en la superficie celular.

2 – Tenemos el sitio complementario al sitio diana, el sitio farmacológico (F) está presente en la PLA₂ específica, además del sitio catalítico (C). Una PLA₂ no específica (a la derecha) carece del sitio farmacológico (F). La naturaleza y ubicación de los sitios farmacológicos en la superficie molecular de PLA₂ varían con la enzima.

3 – Cuando se administra PLA₂ por vía intraperitoneal o intravenosa; las PLA₂ específicas buscan y se unen a las células diana, debido a su alta afinidad por el sitio diana. Esta unión específica, así como la accesibilidad al sitio diana, dependería de la accesibilidad de la celda del sitio destino. Por otro lado, una PLA₂ no específica se unirá a muchos tipos diferentes de células. La PLA₂ no específica, por lo tanto, no dañará la célula objetivo con tanta eficacia como la PLA₂ específica.

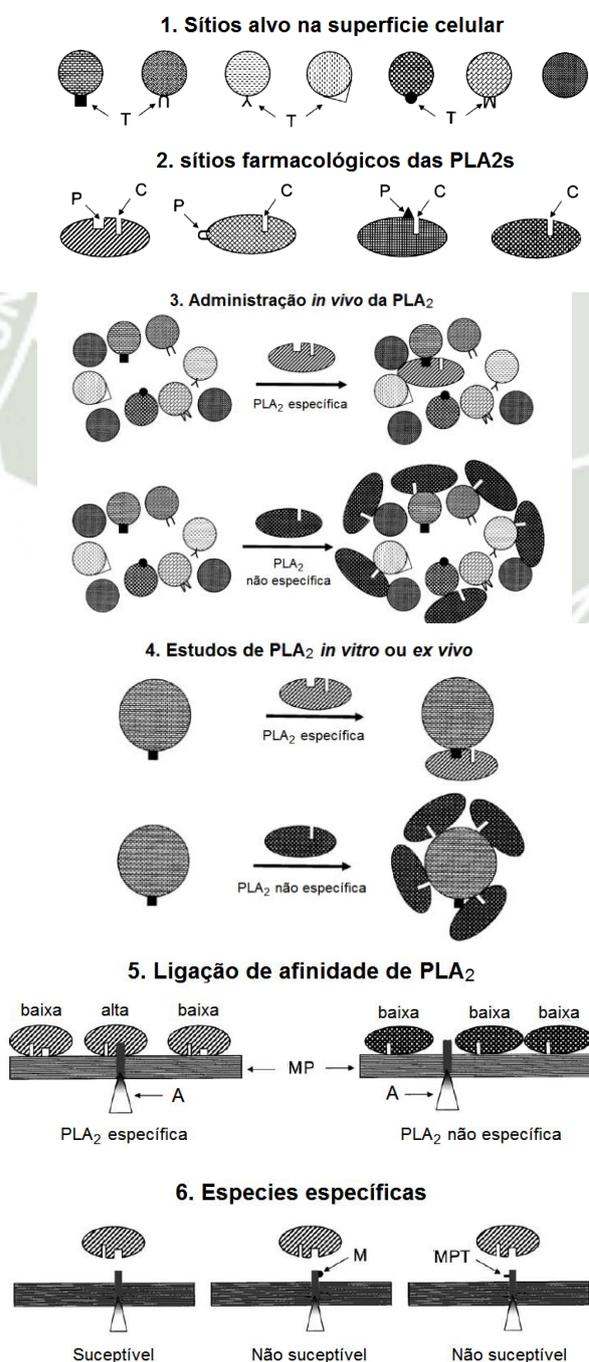
4 – Se incuba *in vitro* o *ex vivo* un sistema, una célula, tejido u órgano con PLA₂. El PLA₂ específico y no específico puede dañar la célula objetivo y podría exhibir "efectos farmacológicos". Esto es particularmente cierto cuando la actividad enzimática juega un papel más importante en la inducción del efecto farmacológico, aunque se requieren cantidades más altas (o cantidades catalíticamente muy efectivas) de enzimas no específicas para inducir efectos similares de PLA₂ específica.

5 – PLA₂ específico se une al objetivo (o aceptor), la proteína de membrana plasmática (MP) con una alta afinidad (10⁻⁹ M). Sin embargo, también se produce baja afinidad (10⁻⁴ a 10⁻⁶ M) cuando se une a fosfolípidos. Los estudios de unión específica siempre indican una afinidad alta y baja por los sitios diana. La afinidad es alta en el sitio objetivo, es baja en comparación con los sitios de unión de baja afinidad. Los tratamientos para destruir proteínas diana producen una pérdida de alta afinidad de unión, pero no reducen la afinidad de los sitios diana. Por lo tanto,

la PLA₂ no específica se une a los fosfolípidos con baja afinidad y no se une al sitio objetivo.

6 – Vemos que el sitio de destino es un “buen ajuste” para el sitio farmacológico en especies de células o tejidos susceptibles. En especies no sensibles, aquellas que han sufrido procesos de mutaciones (M) o modificaciones postraduccionales (MPT) como glicosilaciones, células o tejidos susceptibles son suficientes para alterar la afinidad específica de PLA₂ con la célula diana. Esto explica la especificidad de especie observada en la capacidad de PLA₂ para exhibir sus efectos farmacológicos (53).

Esquema 2 - Modelo para explicar los efectos farmacológicos de PLA₂. (53).

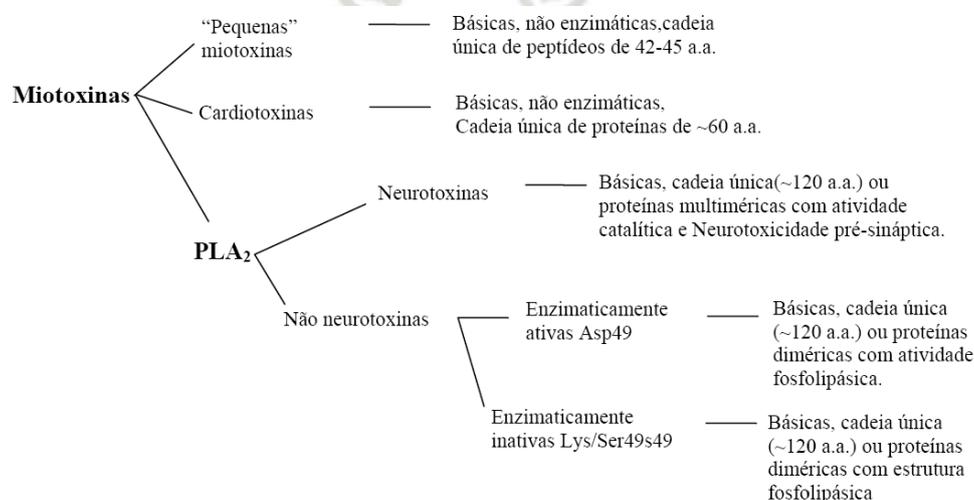


6. MIOTOXINAS

Las miotoxinas 1. Generalmente se definen como componentes naturales (generalmente pequeñas proteínas y péptidos) de secreciones venenosas que pueden actuar localmente, dañando irreversiblemente las fibras musculares (mionecrosis) en y alrededor del sitio de la mordedura, sin embargo, otras miotoxinas actúan sistemáticamente, causando daño muscular en sitios distantes. La mionecrosis se considera una complicación médica importante de la mordedura de serpiente, ya que puede causar secuelas drásticas como la pérdida de tejido hasta la amputación (83; 84; 85). Por otro lado, la miotoxicidad sistémica puede causar mioglobinuria e insuficiencia renal grave,

Las miotoxinas descritas en los venenos de serpiente se pueden clasificar en tres grupos principales (86) que constituyen familias de proteínas estructuralmente distintas. Estos incluyen (1) las miotoxinas "pequeñas" (p. ej., *Crotalus durissus terrificus* crotamina, *Crotalus v. viridis* miotoxina A), (2) las cardiotoxinas y (3) las miotoxinas PLA₂ (Figura 5). Las miotoxinas PLA₂ forman el grupo más grande que se puede clasificar en tipos neurotóxicos y no neurotóxicos (87). Entre estas últimas, existe una clara división entre las miotoxinas 'Asp49' y 'Lys49', como se detallará más adelante. Se ha considerado un cuarto grupo de proteínas miotóxicas, que incluye una variedad de componentes del veneno que pueden dañar el músculo esquelético a través de mecanismos indirectos. A modo de ejemplo, las toxinas hemorrágicas que causan alteración del flujo sanguíneo local, isquemia y mionecrosis secundaria de aparición lenta se considerarían factores miotóxicos indirectos. Sin embargo, el componente más importante y abundante que daña los músculos en los venenos de animales son las PLA₂.

Figura 5. Clasificación y características generales de las miotoxinas del veneno de serpiente (85).



* Lomonte B, Angulo Y, Calderón L. (85).

7. NEUROTOXINAS

Las neurotoxinas son componentes presentes del veneno, pueden afectar el sistema nervioso de diferentes maneras: bloqueando todos los impulsos nerviosos, de forma que la presa se paraliza y se interrumpe la respiración, o sobrecargando el sistema nervioso, provocando su colapso debido a convulsiones graves y la contracción de todos los músculos, seguida de muerte. Sin embargo, no todas las neurotoxinas tienen el mismo modo de acción ni producen efectos clínicos similares (88).

Uno de los principales objetivos del veneno de serpiente es el sistema nervioso somático, en particular la unión neuromuscular del músculo esquelético. La inhibición de la transmisión neuromuscular en este sitio produce parálisis de los músculos respiratorios, como el diafragma, por ejemplo, que conduce a la muerte (89). Por lo tanto, gran parte de la investigación se ha dirigido a aumentar nuestra comprensión de la acción del veneno de serpiente y las toxinas aisladas que actúan en la unión neuromuscular (90).

Las neurotoxinas se pueden clasificar en dos grupos: Inhibidores de la conducción axonal, la estimulación axonal resulta de la despolarización de la membrana celular e implica un cambio en la conductancia de los iones Na^+ , K^+ y Ca^{+2} . Así, cualquier sustancia que altere el movimiento normal, principalmente de los iones Na^+ y K^+ , puede considerarse neurotóxica. Como ejemplo se puede citar la tetrodotoxina, que es una neurotoxina aislada del pez globo o veneno de pez globo, caracterizada por bloquear los canales de sodio. (91;92). Las toxinas del veneno de escorpión también pueden afectar la conductividad del axón, debido a su acción sobre los canales de sodio (93; 94).

Inhibidores de la transmisión sináptica, además de las toxinas que actúan sobre la conducción axonal, existen las que actúan sobre la transmisión sináptica en la región de la placa motora de la unión neuromuscular, que es una región especializada de la fibra muscular donde llega el impulso nervioso. La terminación nerviosa presináptica, determina su despolarización al activar la entrada de calcio en la membrana, lo que señala la liberación del neurotransmisor. Estos actúan afectando la liberación del neurotransmisor (acetilcolina) y consecuentemente impidiendo la transmisión del impulso nervioso. Esta clase de toxinas que provocan cambios en la transmisión sináptica se divide en dos grandes subgrupos: neurotoxinas presinápticas (neurotoxinas β) y neurotoxinas postsinápticas (neurotoxinas α).

7.1.- NEUROTOXINAS PRESINÁPTICAS.

Llamadas β -neurotoxinas, estas toxinas actúan inhibiendo el proceso de liberación de acetilcolina. Su potencia es mayor que la de las neurotoxinas postsinápticas (α -neurotoxinas). Como ejemplo, citamos la toxina β -bungarotoxina, una toxina compuesta por dos subunidades de 8800 y 12400 daltons, unidas por enlaces disulfuro (95; 96). Tanto las neurotoxinas β como las α se encuentran en venenos elápidos, como *Bungarus multicinctus* (bungarotoxina α y β). Además, puede ser un polipéptido de cadena sencilla (p. ej., notexina) o toxinas que constan de múltiples subunidades. Por ejemplo, la crotoxina, la taipoxina y la textiloxina constan de dos, tres y cinco subunidades, respectivamente.

La mayoría de los venenos contienen múltiples isoformas de una neurotoxina que difieren en sus secuencias de aminoácidos (97). Después de varios estudios, no parece haber una correlación directa entre la cadena estructural y la potencia, por lo que las actividades neurotóxicas no parecen estar directamente correlacionadas con su actividad de fosfolipasa y la subsiguiente hidrólisis de los fosfolípidos de membrana. En general, estas toxinas producen un bloqueo neuromuscular al inhibir la liberación de acetilcolina de la terminal nerviosa. La acción neurotóxica caracterizada por el bloqueo neuromuscular (como consecuencia de la inhibición de la liberación de acetilcolina en la terminal nerviosa) no altera significativamente la sensibilidad de la placa terminal motora a la acetilcolina, es decir, cuando actúa una neurotoxina presináptica (98).

7.2.- NEUROTOXINAS POSTSINÁPTICAS.

Son toxinas que se unen a los receptores colinérgicos nicotínicos en la región subsináptica de la placa terminal motora similar al curare. Llamadas α -neurotoxinas, son capaces de bloquear reversiblemente la transmisión nerviosa, unirse competitivamente a los receptores colinérgicos nicotínicos, prevenir la transmisión neuromuscular y provocar la muerte por parálisis flácida del diafragma (99; 100). Las neurotoxinas postsinápticas son péptidos de bajo peso molecular (7 a 8 kDa), tienen entre 60 y 70 aminoácidos y carecen de actividad enzimática (99).

8.- PRINCIPALES SERPIENTES VENENOSAS DEL PERÚ

Considerando la extensa región de selva que comprende nuestro territorio, superando los 600 000 km², son muchas las serpientes que se han ido registrando en esta región, además de aquellas registradas en los valles interandinos y la costa del Pacífico. En 1974 Meneses, reportó un número aproximado de 50 especies venenosas y posteriormente Carrillo e Icochea describieron 33 especies de serpientes de este tipo. Sin embargo, la investigación al respecto no está concluida ya que con seguridad se obtendrán próximos informes (2). No obstante, el serpentario “Oswaldo Meneses” ha reportado las siguientes especies de serpientes venenosas y que están siendo objeto de estudio en la actualidad. (Cuadro 1).

Cuadro 1.

Principales serpientes venenosas del Perú.

FAMILIA	ESPECIE	NOMBRE COMÚN
Viperidae	<i>Bothrops atrox</i>	Jergón de la selva
	<i>Bothrops brazili</i>	Jergón shushupe
	<i>Bothrops pictus</i>	Jergón de la costa
	<i>Bothrops roedingeri</i>	Jergón de la costa
	<i>Bothriopsis bilineata</i>	Loromachaco
	<i>Bothriopsis oligolepis</i>	Lamon o jergón negro
	<i>Lachesis muta</i>	Shushupe
	<i>Crotalus durissus terrificus</i>	Cascabel sudamericana
Elapidae	<i>Micrurus spixii</i>	Coral o naca naca
	<i>Micrurus surinamensis</i>	Coral o naca naca
	<i>Micrurus tschuddi</i>	Coral de la costa

*

Calvete JJ, Sanz L, Cid P, Torre P, Flores-Díaz M, Santos MCD (2).

9.- PROBLEMA:

Los ofidios o serpientes pertenecen a la clase de los reptiles. Actualmente hay descritas cerca de 3000 especies en todo el mundo, de las cuales tan sólo 250 especies son venenosas. Se alimentan de animales vivos que tragan enteros, especialmente mamíferos (roedores), y aves; también de anfibios, lagartos, peces, insectos, arácnidos, huevos y, en algunas ocasiones, de otras serpientes, para lo cual han desarrollado diferentes características en su dentadura, lo que permite clasificarlos y, a su vez, identificar el tipo de maniobras de agresión, defensa y captura de sus presas. En Perú se encuentran dos familias de serpientes venenosas, Viperidae y Elapidae, con algunos géneros respectivamente.

Su mordedura causa efectos locales y sistémicos con diversas secuelas, además de una variedad de disturbios hematológicos y bioquímicos, los cuales en la mayoría de los casos

llevan a la muerte. El diagnóstico por mordedura de serpiente, depende de la condición del paciente (signos clínicos) y si es posible, de la identificación del espécimen. Su tratamiento se basa en brindar un soporte hemodinámico al paciente mientras las toxinas son eliminadas del organismo y en controlar los efectos de las toxinas mediante el manejo adecuado del anti-veneno ofídico (1; 2).

Los componentes y mecanismos de acción de las toxinas presentes en los venenos son muy variados, donde se encuentran componentes no proteicos (inorgánicos y orgánicos) tales como carbohidratos y sales, y proteicos con acción necrotizante, coagulante o hemorrágica, entre otras, algunos de estos compuestos han sido aislados y caracterizados o descritos como toxinas letales, o se les han atribuido acciones potentes sobre proteínas específicas como, por ejemplo, las involucradas en la coagulación sanguínea (1;2).

En estas mezclas biológicas sin embargo predominan péptidos y proteínas, por lo que es posible establecer las características cualitativas de los mismos basados en su análisis electroforético y cromatográfico. Usando la técnica de electroforesis (en geles de poliacrilamida) y cromatográfica como HPLC se pueden analizar los perfiles de los venenos de diferentes especies de serpientes (3).

Los venenos de serpiente son rasgos de complejidad genética moderada compuestos en gran parte por toxinas proteínicas que funcionan en la depredación y la defensa (4;5;6;7;8;9;16). Con algunas excepciones (10;11), se ha encontrado que los venenos de serpiente evolucionan rápidamente bajo selección positiva dentro y entre especies, lo que implica cambios en los patrones de expresión de toxinas (12;13;15;17) y secuencias de proteínas (18;19). Se cree que esta rápida evolución es el resultado de los roles evolutivamente críticos del veneno en la alimentación y la defensa (20) y las interacciones co-evolutivas antagónicas con depredadores y presas (21;22). Sin embargo, las mismas presiones selectivas que resultan en la adaptación local y la divergencia a nivel de especie en los venenos también pueden operar en las etapas del ciclo de vida, particularmente si la presa o los depredadores cambian con la edad o el tamaño. Se han identificado cambios ontogenéticos en la composición del veneno en numerosas especies de serpientes (5;8;14;23-29), pero ciertamente no en todas las especies que se han examinado (14;30).

10.- JUSTIFICACIÓN

La acción del veneno de serpientes de vipéridos en los tejidos está asociada a una reacción inflamatoria compleja, caracterizada por edema, dolor e infiltrado de células inflamatorias. El edema y el dolor ocurren como consecuencia de la acción de proteinasas principalmente de las PLA₂s y metaloproteinasas, que conllevan a la activación de varias vías inflamatorias, que provocan un aumento de la histamina y la generación de prostaglandinas, leucotrienos, quininas, óxido nítrico, anafilatoxinas complementarias y citoquinas. Estos y otros mediadores actúan sobre las células del endotelio venular y sobre una variedad de nociceptores en neuronas aferentes, provocando edema y dolor. También actúan directamente sobre los macrófagos residentes y otras células inflamatorias, induciendo su activación de manera decisiva.

Tales efectos son el resultado de actividades proteolíticas, miotóxicas, de coagulación sanguínea y hemorrágicas atribuidas a las fosfolipasas A₂ contenidas en sus venenos. Un efecto dominante que tienen las mordeduras de serpientes, es su miotoxicidad marcada sin ningún signo clínico de neurotoxicidad. Sin embargo, estudios *in vitro* en preparaciones de músculos nerviosos de anfibios, aves y mamíferos han mostrado neurotoxicidad, con bloqueo neuromuscular total y/o irreversible, a concentraciones muy bajas de veneno o toxinas de diferentes especies. Por lo tanto, es probable que una acción directa de las miotoxinas de la fosfolipasa A₂ (PLA₂), más una acción indirecta causada por la anoxia tisular tenga un papel clave en los efectos del veneno de *Bothrops* en las fibras musculares y nerviosas, incluida la destrucción inmediata de los axones motores y el agotamiento completo de los troncos nerviosos motores intramusculares.

Existen diferencias en los estudios de homología secuencial respecto de las PLA₂ miotóxicas sistémicas procedentes del veneno de serpientes del género *Bothrops andianus* y *Crotalus scutulatus scutulatus*, en ese entender el presente proyecto pretende evaluar la potencia neurotóxica “*ex vivo*” de fosfolipasas A₂, procedentes de los veneno de *Bothrops andianus* y *Crotalus scutulatus scutulatus*, con el objetivo de establecer claras diferencias respecto de la potencia neurotóxica “*ex vivo*” revelada en las regiones responsables de la estructura primaria de las fosfolipasas A₂ estudiadas, procedentes de una misma región intercontinental, sin embargo con una diferencia geográfica significativa, como lo es entre América del Sur y América del Norte(1-5).

11.-. OBJETIVO: (GENERAL Y ESPECÍFICOS):

11.1.- OBJETIVO GENERAL.

Estudiar en forma comparativa la neurotóxica “*ex vivo*” de fosfolipasas A₂, procedentes de los venenos de *Bothrops andianus* y *Crotalus scutulatus scutulatus*.

11.2.-. OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

1. Purificar las PLA₂ a partir de los venenos *Bothrops andianus* y *Crotalus scutulatus scutulatus* a través de cromatografía líquida de hidrofobicidad (mini columnas HiTrap).
2. Caracterizar bioquímicamente las PLA₂ a través de electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE), actividad fosfolipásica A₂.
3. Caracterizar la actividad neurotóxica “*ex vivo*” de fosfolipasas A₂, procedentes de los venenos de *Bothrops andianus* y *Crotalus scutulatus scutulatus*.

12.-. HIPÓTESIS

La ausencia de proteínas en la integridad de las vesículas sinápticas (sinaptofilinas) es evidencia directa y sólida que la PLA₂ en estudio, afecta la maquinaria de liberación de neurotransmisores al impedir el acoplamiento de vesículas sinápticos a la axolema del terminal nervioso.

La presencia de proteínas en la integridad de las vesículas sinápticas (sinaptofilinas) es evidencia directa y sólida que la PLA₂ en estudio, afecta la maquinaria de liberación de neurotransmisores al impedir el acoplamiento de vesículas sinápticos a la axolema del terminal nervioso.

CAPÍTULO II

2.- MATERIALES Y MÉTODOS

2.1.- 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). Los reactivos de transferencia Western se adquirieron de Sigma-Aldrich, Biorad, Amresco y Kodak. Todas las sales de la solución fisiológica eran de grado analítico o de secuenciación.

Los venenos de *Bothrops andianus* y *Crotalus scutulatus scutulatus*, serán cedidos por el Dr. Luis Alberto Ponce Soto. Los experimentos serán realizados en 3 laboratorios compartidos:

Laboratorio Proteómica, Inflamación y Dolor del Vicerrectorado de Investigación de la Universidad Católica de Santa María: Purificación de fosfolipasas y electroforesis SDS-PAGE (Gel de poliacrilamida en presencia de dodesil sulfato de sodio) y blotting.

Laboratorio de ciencias biológicas de la Universidad San Antonio Abad del Cusco bajo la supervisión de la Doctora María Holgado Rojas: Experimento de farmacología

Laboratorio de ciencias biomédicas de la Universidad Señor de Sipán (Chiclayo): Experimentos de farmacología (44).

2.2.- CROMATOGRAFÍA DE INTERACCIÓN HIDROFÓBICA

Las PLA₂ del veneno de *Bothrops andianus* y *Crotalus scutulatus scutulatus* son purificadas en columnas del sistema HITrap (H&C USA.) El sistema cromatográfico que se usará es el de cromatografía convencional. Son colectadas fracciones de 1 mL. por tubo determinándose actividad enzimática. Las fracciones que exhiban mayor actividad fosfolipásica A₂ y/o masa de 14 kDa serán empleadas para la obtención del “pool” y guardadas a 0°C (41).

2.3.-. ELECTROFORESIS EN PAGE-SDS

La electroforesis en gel de poliacrilamida fue realizada siguiendo la metodología descrita por Laemmli, en que las placas de poliacrilamida (PAGE) serán preparadas de modo discontinuo, presentando un gel de concentración de 5 % y un gel de corrida de 12,5 %. Las placas serán preparadas utilizando una solución de acrilamida stock (30%T, 0,8%C). El gel de concentración a 5 % se preparará usando un tampón Tris-HCl 0.5M de pH = 6,8 y el gel de corrida será preparado usando tampón Tris-HCl 1M de pH = 8,8. A ambos geles se les agregará SDS al 20% en cantidad suficiente para llevar a una concentración final de 0.5% (v/v).

La corrida electroforética será realizada en un sistema doble de miniplacas SE 250 Mighty Small II (Hoeffer scientific instruments). Tanto las muestras y los marcadores de masa molecular estarán disueltos en tampón de muestra (Tris-HCl 0,075M; pH = 6,8; 10% glicerol; 4% de SDS; 0,001% de Bromofenol). La corrida electroforética será realizada a 30 mA. Los geles estarán coloreados con solución de Comassie Blue 0,05% a 37°C, y el exceso de colorante será removido con ácido acético al 7% (44).

2.4.-. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD FOSFOLIPÁSICA A₂

La determinación de la actividad fosfolipásica A₂ se realizará según el método descrito por Cho & Kézdy, (1991) (100) y Holzer & Mackessy (1996) (95), se utilizará como sustrato el ácido 4-nitro-3-(octanoiloxi) benzóico. Se utilizaron muestras con una concentración inicial de 1,0 mg/ml. en el caso del veneno total y fosfolipasa A₂ aisladas. El ensayo contiene 0,5 ml. de muestra, 0,5 ml de sustrato y 4,0 ml. de tampón Tris-HCl 0,1M Ca²⁺ 0,01 M pH 8.0. Las muestras se encuentran en una concentración final de 0,1 mg en 5 ml del volumen final de reacción y se incubarán por 20 minutos a 37°C. Enseguida la reacción es bloqueada con ácido acético al 30% y la absorbancia leída a 420 nm (filtro verde) en un fotolorímetro de Klett Summerson (44).

2.5.-. ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD NEUROTÓXICA “EX VIVO”

Los animales se anestesiaron con halotano y se sacrificarán mediante sangrado. Se extraerá el músculo *biventer cervicis* y se montará bajo una tensión de 0,5 g en un baño de órganos de 5 ml (Automatic Organ multiple-bath LE01 Leticia

Scientific Instruments. Barcelona, España) a 37°C que contendrá solución de Krebs de la siguiente composición (en mM): NaCl 118,7, KCl 4,7, CaCl₂ 1,88, KH₂ PO₄ 1,17, MgSO₄ 1,17, NaHCO₃ 25,0 y glucosa 11,65. (pH 7,5) y aireada a (95% O₂ - 5% CO₂).

Para la contractura, se aplicará exógenamente Acetilcolina (ACh; 110 mM durante 60 s) y KCl (20 mM durante 130 s), obtenido en ausencia de estimulación de campo, antes de la adición de toxinas PLA₂ en concentraciones finales de 0.35, 0.7, 1.4 y 3,5 µM y del veneno total (20 µg / ml). Las concentraciones que se usarán se tomarán de los trabajos de farmacología sobre el efecto de neurotoxicidad donde fueron evaluados las concentraciones dosis-respuesta, publicados por el Doctor Ponce Soto LA (36-41). Se colocará un electrodo de anillo de platino bipolar alrededor del tendón, que atravesará el músculo inervado. La estimulación indirecta se realizará con un Estimulador (MAIN BOX LE 12404 Panlab s.l. Powerlab AD Instruments Barcelona, España) en las siguientes condiciones: 0,1 Hz, 0,2 ms, 3-4 V.

Las contracciones y contracturas musculares se registrarán isométricamente durante 120 minutos, mediante transductores de fuerza (Transductor de fuerza modelo MLT0201 5 mg-25 g Panlab sl AD Instruments Pty Ltd. España) conectados a un amplificador y un sistema de adquisición de datos PowerLab / 4SP (OUAD Bridge AD Instruments, Barcelona, España). En esta parte del Proyecto se trabajará con colaboración de la Universidad San Antonio de Abad del Cusco (44,41).

2.6.-. DETERMINACIÓN DEL EFECTO CITOTÓXICO EN CULTIVO CELULAR DE MIOBLASTOS Y MIOTUBOS (C₂C₁₂) DE PLA₂ PURIFICADAS A PARTIR DE LOS VENENOS DE *Bothrops andianus* y *Crotalus scutulatus scutulatos*

El objetivo fue determinar el efecto citotóxico en cultivo celular de mioblastos C₂C₁₂, por la acción de PLA₂ purificadas a partir de los venenos de *Bothrops andianus* y *Crotalus scutulatus scutulatos*.

Se utiliza como diseño experimental una microplaca de 96 pocillos, eligiendo un n de 3, correspondiente a 3 pozos previamente llenados con un cultivo celular de mioblastos C₂C₁₂, en un medio DME con 10-15% de suero fetal bovino (FBS) a 37°C y CO₂ al 5% (50 µL) incubado previamente en un horno de cultivo celular.

Luego de remover 150 μ l de medio (sobrenadante), se adicionaron 150 μ l de muestra previamente disuelta en PBS, conteniendo las siguientes concentraciones: 5, 10, 20 y 40 μ g. Se consideran dos tipos de controles: positivo en presencia de Tritón X-100 (+) y negativo solo en presencia de medio de cultivo DME que contenga suero bovino fetal al 1% (-), con el fin de establecer parámetros porcentuales (%) a partir de 0 al 100% de cuantificación de lactato deshidrogenasa (LDH). Después de 3 horas, se retiraron 100 μ l del sobrenadante de cada pocillo y se estimó la liberación de la enzima lactato deshidrogenasa (LDH), liberada como resultado de la lisis celular por la acción de la toxina.

El medio de reacción contiene 1ml de sustrato preparado según indica el kit del fabricante (LDH-P UV Optimized UV Method SFBC Lab. Winer), previamente incubado durante dos minutos a 30°C. Luego se agregan 80 μ l del sobrenadante, luego se incuban durante aproximadamente 3 minutos. Y luego se lee la absorbancia a 340 nm.

Luego del valor obtenido como negativo, se convierte en simple positivo y se multiplica por 1000. El valor obtenido se convierte a un valor porcentual (%), en relación al control positivo máximo encontrado con el Tritón X-100 (44,41).

2.7.- WESTERN BLOT (WB)

La preparación de músculo-nervio de NF-DAR, mantenida en solución de Tyrode aireada con carbógeno (control) fue incubada con 10 μ g/mL por separado, de las PLA₂ purificadas a partir de los venenos de *Bothrops andianus* y *Crotalus scutulatus scutulatos*. Durante 120 minutos bajo estimulación indirecta, se homogeneizó en 1 mL de cóctel antiproteasa. Se utilizaron alícuotas de 15 μ g de proteínas para la electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio al 12% (120 V, 90 min). Después de la transferencia de proteínas electroforéticas a la membrana de nitrocelulosa (400 mA, 90 min), las muestras se bloquearon durante la noche a 4 ° C en PBS que contenía leche en polvo al 5% p/v y se sondaron con anticuerpos primarios (diluidos en PBS que contenía 3% p/v leche a una concentración final de 1/500 sinaptofisina, 1/500 sinaptobrevina y 1/1000 SNAP25) durante 4 h. Las transferencias se lavaron en PBS y se incubaron con el correspondiente anticuerpo secundario conjugado con HRP diluido en PBS que contenía leche en polvo al 1% p/v hasta una concentración final de 1/1000 de

cabra anti-conejo, 1: 5000 de conejo anti-ratón y 1: 3000 conejo anti-cabra, respectivamente.

Las transferencias se escanearon, se almacenaron como archivos TIF y se cuantificaron utilizando el software Image J 1.45s (Wayne Rasband, NIH, Bethesda, MD, EE. UU.). Los datos densitométricos del control endógeno se generaron incubando transferencias con GAPDH (1/1000, seguido de anti-conejo conjugado con HRP de cabra 1/1000). Después de enjuagar en PBS, las bandas inmunorreactivas se detectaron por quimioluminiscencia (Super Signal, sustrato quimioluminiscente Pierce West Pico, EE. UU.) Utilizando película de rayos X (BioMax XAR Film Kodak, EE. UU.). Los datos experimentales se expresaron en términos de densidad óptica relativa (41,44).

2.8.- ANÁLISIS ESTADÍSTICO

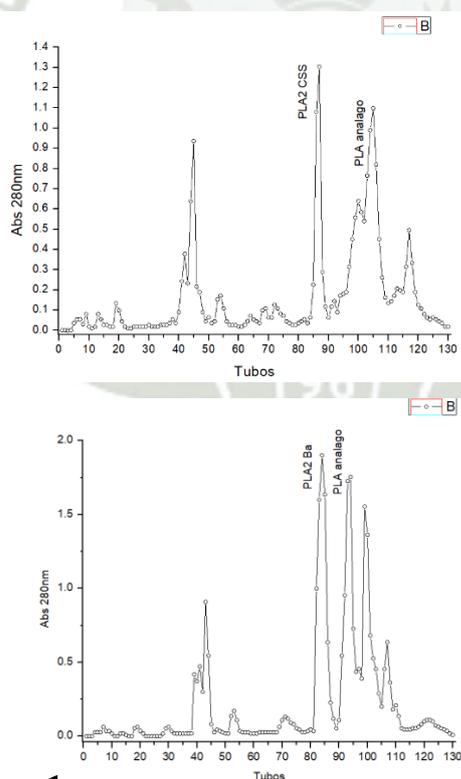
Los resultados serán representados por la media de experimentos error padrón. La significancia es obtenida a través del test no-pareado t-Student y considerado como $p < 0,05$.

CAPÍTULO III

3.- RESULTADOS

3.1.- PURIFICACIÓN DE LA FRACCIÓN DEL VENENO DE *BOTHROPS ANDIANUS* Y *CROTALUS SCUTULATUS SCUTULATUS* EN CROMATOGRAFÍA DE INTERACCIÓN HIDROFÓBICA

El perfil cromatográfico de los venenos totales de *Bothrops andianus* y *Crotalus scutulatus scutulatus* en columna HiTrap HIC, se muestra a continuación. La presencia de cinco (5) picos principales, denominados 1 al 5 respectivamente (Fig.1). Las fracciones de los picos fueron sometidas a ensayos de actividad fosfolipásica A₂, dando positivo el pico 3. El pico 4 no mostró actividad fosfolipásica A₂ sin embargo evidenció una masa aproximada de 14 kDa, sugiriendo que posiblemente se trate de una PLA₂ homóloga K49, el cual sería caracterizado después vía MS/MS. El pico 3 fue denominado como PLA₂ y el 4 como PLA₂ K49.

**Figura 1**

Cromatograma de PLA₂ del veneno total de *B. andianus* y *C. scutulatus*.

3.2 ELECTROFORESIS EN SDS-PAGE DE LAS FRACCIONES AISLADAS DEL VENENO DE *BOTHROPS ANDIANUS* Y *CROTALUS SCUTULATUS SCUTULATUS*

La electroforesis SDS-PAGE muestra que las fracciones PLA₂ B.A. (Figura 2, carril 2) y PLA₂ C.s.s (Figura 2, carril 3) muestran la presencia de una banda de proteína con Mr alrededor de 14 kDa.

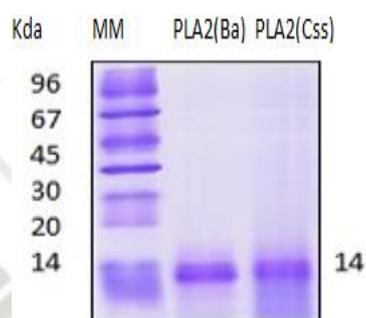


Figura 2

Electroforesis en gel SDS PAGE, 1) marcadores moleculares, 2) PLA₂(Ba), 3) PLA₂(Css).

3.3 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD PLA₂ DEL VENENO TOTAL, Y LAS FRACCIONES DEL VENENO DE *Bothrops andianus* y *Crotalus scutulatus scutulatus*

La medición de la actividad PLA₂ se realizó de acuerdo con Cho y Kézdy (1991) (100), Holzer y Mackessey (1996) (95) y se adaptó a la microplaca por Ponce-Soto et al (2006) (35-40) utilizando el NOAB [4-nitro-3- (octanoiloxi) ácido benzoico] como sustrato cromogénico.

La actividad de PLA₂ se expresa como velocidad de reacción inicial (Vo). El valor de actividad del veneno total de *B. andianus* es $4.59 \pm 1,15$ nmol / min (Figura 3). La actividad de PLA₂ se expresa como velocidad de reacción inicial (Vo). El valor de actividad del veneno total de *C. scutulatus scutulatus* es $4.31 \pm 1,15$ nmol / min (Figura). Las fracciones PLA₂ de *B. Andianus* y PLA₂ de *C. Scutulatus Scutulatus* con actividades de $7,92 \pm 0,77$ y $8,85 \pm 1,38$ nmoles / min, respectivamente, muestran una mayor actividad enzimática en comparación con la actividad del veneno total.

Estas dos fracciones: PLA₂ *B. andianus* y PLA₂ *C. scutulatus scutulatus* se confirma su actividad porque presentan alta actividad catalítica sobre el sustrato NOAB.

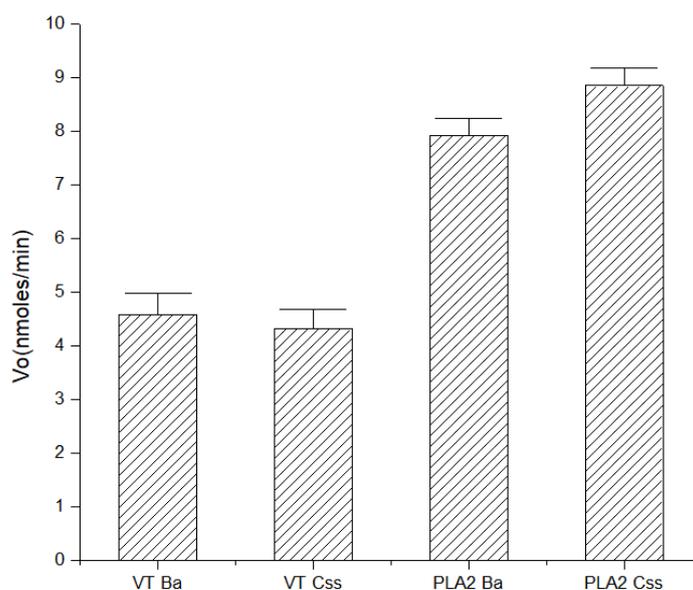


Figura 3

Actividad PLA₂ del veneno total de *B. andianus* (VT) y *C. scutulatus* (VT), y las fracciones PLA₂ Ba y PLA₂ Css, utilizando el sustrato cromogénico NOAB

3.4.-. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD NEUROTÓXICA “IN VITRO” DE PLA₂ A PARTIR DEL VENENO DE *B. andianus* Y PLA₂ *C. scutulatus scutulatus*.

En este experimento se probó la concentración estándar de PLA₂ purificada a partir del veneno de *B. andianus* y *C. Scutulatus Scutulatus*. La Figura 4 representa el experimento realizado con preparaciones de biventer cervicis de pollo, mostrando un ligero efecto miotóxico a diferentes concentraciones.

El tiempo para lograr un bloqueo del 50% de la respuesta contráctil es de $30 \pm 0,1$ minutos para *B. Andianus*, para *C. Scutulatus Scutulatus* $30 \pm 0,1$ minutos.

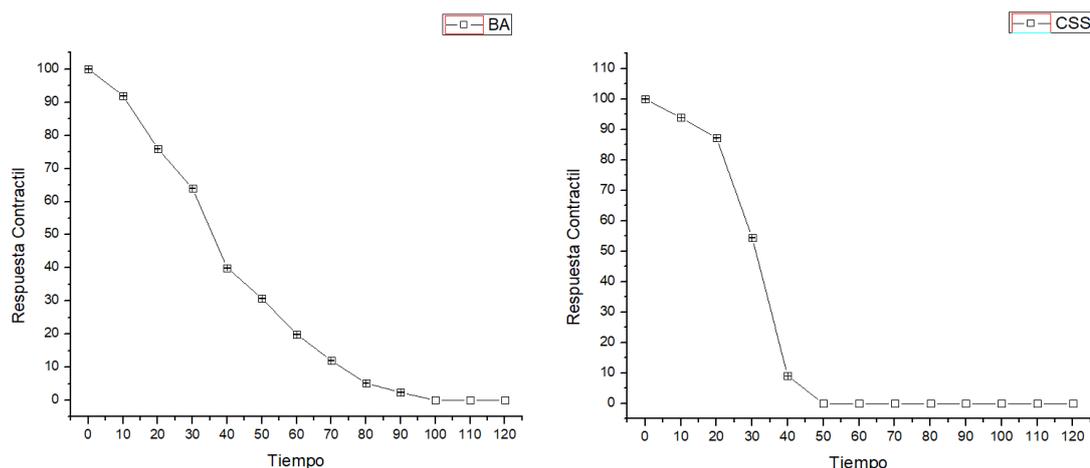


Figura 4. Curvas de respuesta contráctil en reparación de cuello uterino biventer de pollo incubado con PLA₂ BA y PLA₂ CSS (estímulo eléctrico indirecto), *p<0,05, en comparación con el control de Krebs. Los puntos representan la media ± error estándar de la media de los experimentos.

Tras la adición de una dosis (50 ug/ml) del veneno total de *Bothrops Andianus*, hubo una disminución de la respuesta por el efecto neurotóxico del propio hasta llegar a no producir una respuesta del músculo por el bloqueo colinérgico producido.

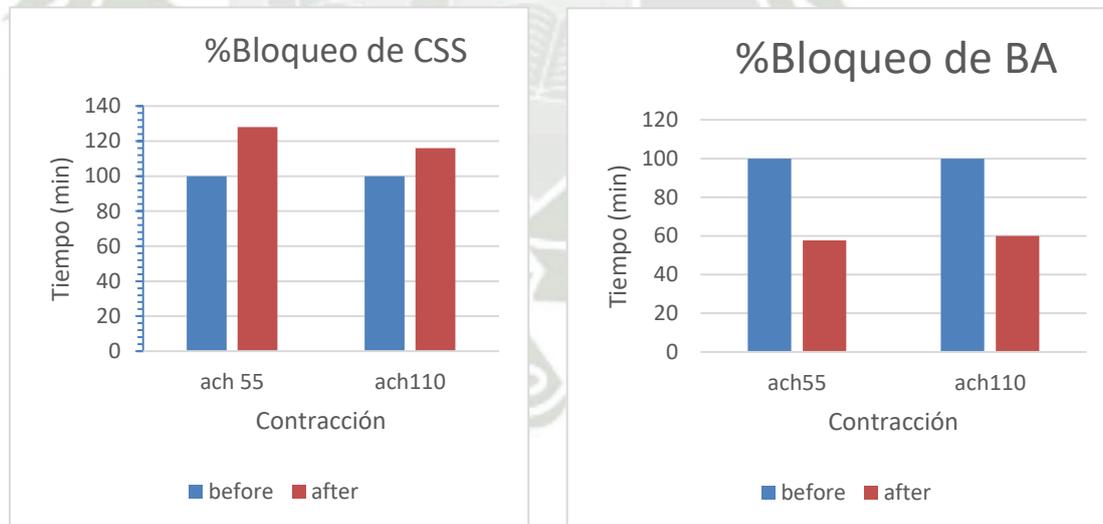


Figura 5. Porcentaje de bloqueo de la respuesta de contracción a la acetilcolina (ACh), obtenido después de 120 minutos de incubación con el veneno total de *Bothrops andianus*, en músculo biventer cervicis de pollo. Nivel de significancia de las muestras en relación al control (P<0.05).

Este resultado muestra que las respuestas de contracción a la acetilcolina y KCl 13,4 mM no fueron significativamente diferentes entre el veneno, no se evidenció un ligero cambio en las curvas de KCl (Figura 6).

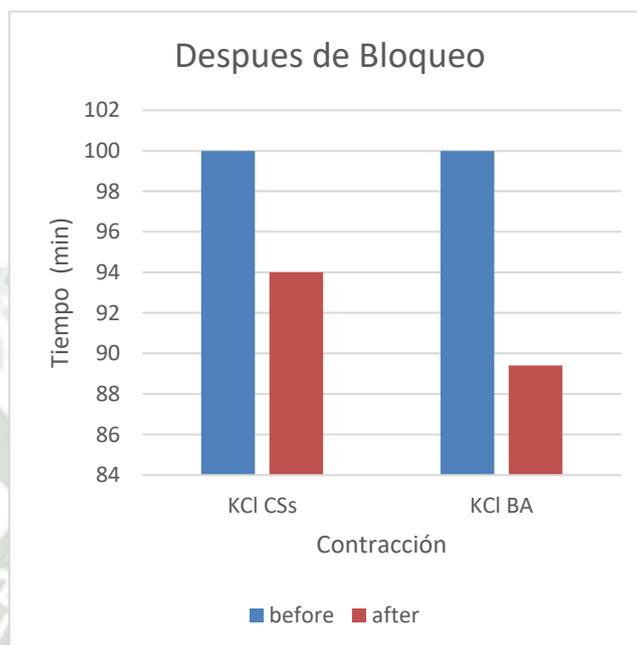


Figura 6. Porcentaje de bloqueo de la respuesta de contracción al potasio, en forma de KCl, obtenido después de 120 minutos de incubación con veneno total de *Bothrops Andianus*, en músculo biventer cervicis de pollo. Nivel de significancia de ($P < 0.05$).

Este resultado muestra que las respuestas de contracción a la acetilcolina y KCl 13,4 mM no fueron significativamente diferentes entre el veneno total.

3.5.-. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD NEUROTÓXICA IN VITRO DE

PLA₂ *B. andianus* Y PLA₂ *C. scutulatus scutulatus*.

En este experimento, se probó una concentración de 20 $\mu\text{g} / \text{ml}$ de PLA₂ *B. Andianus* y PLA₂ *C. Scutulatus Scutulatus* aislado de veneno correspondientemente en preparación del Diafragma de Ratón. Para PLA₂ *B. Andianus*, el tiempo necesario para obtener un bloqueo del 50% de la respuesta contráctil fue: $75 \pm 5,72$ min para 20 $\mu\text{g} / \text{ml}$. PLA₂ *C. Scutulatus Scutulatus*, el tiempo necesario para obtener un bloqueo del 50% de la respuesta contráctil fue: $48 \pm 3,20$ minutos para 20 $\mu\text{g} / \text{ml}$.

La Figura 7 muestra la representación gráfica del bloqueo de la respuesta contráctil en la transmisión neuromuscular en la preparación de biventer cervicis

de pollo de PLA2 *B. andianus* y PLA2 *C. scutulatus scutulatus*. En la dosis de toxinas utilizada, hay un bloqueo irreversible después del lavado con solución de Krebs.

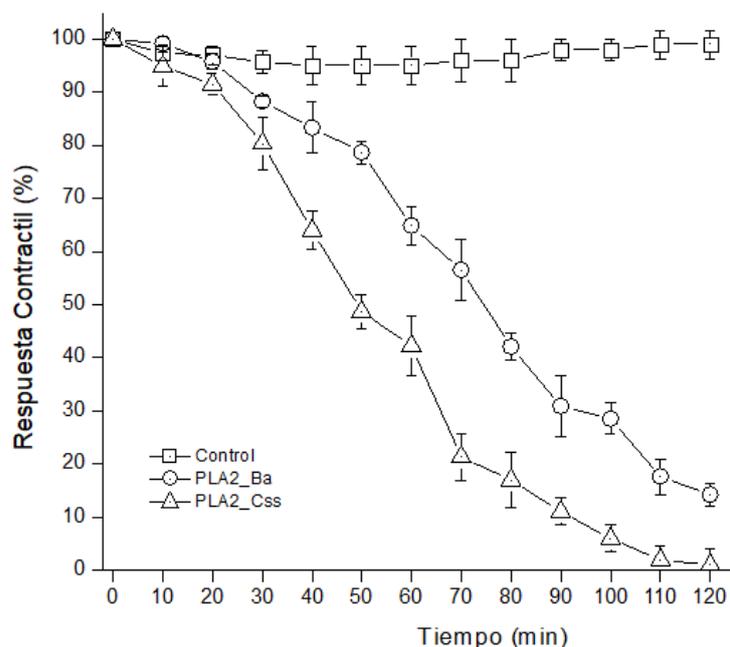


Figura 7. Representación gráfica del bloqueo de la respuesta contráctil en la transmisión neuromuscular en la preparación de Diafragma de Ratón (estímulo indirecto) por la acción de miotoxinas PLA2 *B. andianus* y PLA2 *C. scutulatus scutulatus* aisladas del veneno a una dosis de 20 $\mu\text{g} / \text{ml}$. Cada punto corresponde a la media \pm error estándar. Representación gráfica del 50% del bloqueo de la transmisión neuromuscular.

3.6.-. DETERMINACIÓN DEL EFECTO CITOTÓXICO EN CULTIVO CELULAR DE MIOBLASTOS Y MIOTUBOS (C₂C₁₂) DE PLA₂ PURIFICADAS A PARTIR DE LOS VENENOS DE *Bothrops andianus* y *Crotalus scutulatus scutulatus*

El efecto citotóxico ensayado en cultivo celular de mioblastos y miotubos (C2C12) de las fosfolipasas A₂ procedentes de los venenos de *Bothrops andianus* y *Crotalus scutulatus scutulatus*, muestran un comportamiento citotóxico, ya que a medida que se van incrementando las dosis de las fracciones, los niveles de LDH también aumentan significativamente tras la adición de la PLA₂ Ba y Css, a una dosis de 20 μg de toxina (BtTX-II) que reveló efecto citotóxico de $65,15 \pm 3,53\%$ y de $71,62 \pm 4,56\%$ para los mioblastos tratados con PLA₂ Ba y Css y $95,37 \pm$

4,85% y de $97,95 \pm 3,95\%$ respectivamente en cultivo celular de miotubos de la línea C2C12. (Figura 8 y 9).

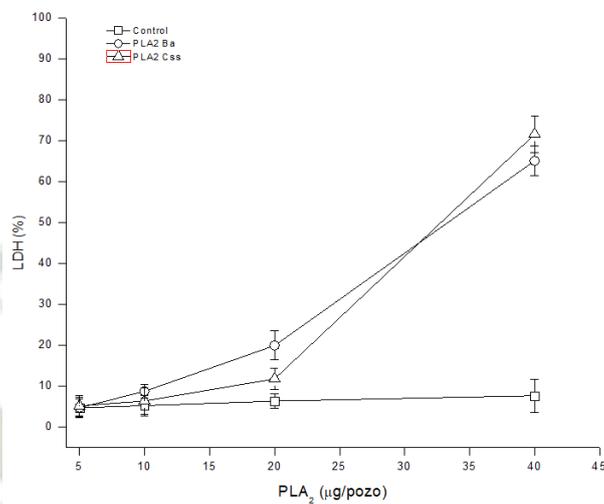


Figura 8. Actividad citotóxica de la toxina PLA₂ Ba y PLA₂ Css sobre mioblastos C2C12, con una dosis de 20 µg diluida en medio de ensayo y luego añadida a las células en crecimiento e incubadas durante 3 horas.

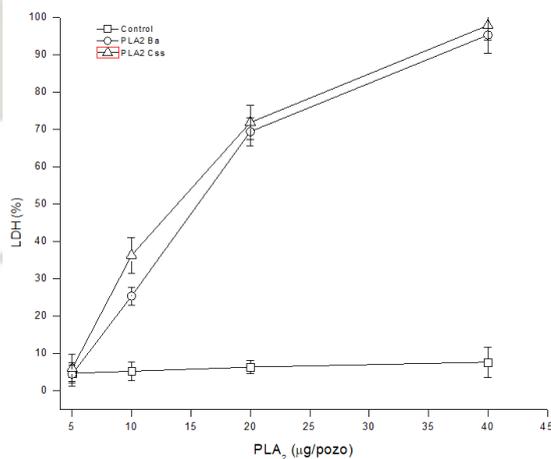


Figura 9. Actividad citotóxica de la toxina PLA₂ *B. andianus* y PLA₂ *C. scutulatus scutulatus* sobre miotubos C2C12, con una dosis de 20 µg diluida en medio de ensayo y luego añadida a las células en crecimiento e incubadas durante 3 h

WESTERN BLOTTING DE PROTEÍNAS PRESINÁPTICAS

El homogeneizado de la preparación de biventer cervicis de ave control, mostró una proporción diferencial entre las tres proteínas presinápticas examinadas. Se muestra un nivel de expresión acentuada y diferenciada entre sinaptofisina, SNAP25 y sinaptobrevina (Figura 10). Por otro lado, no se evidenció la expresión de sinaptofisina, sinaptobrevina o proteína SNAP25 en el homogeneizado de biventer cervicis de ave incubado con las PLA₂, Ba y Css observándose de esta manera, claras y evidentes diferencias significativas entre el control y las preparaciones incubadas con la PLA₂ Ba y Css. (Figura 10).

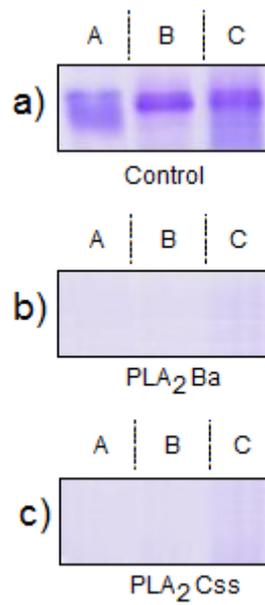


Figura 10. Análisis de transferencia Western para la expresión de proteínas de sinaptofisina ((a), A), sinaptobrevina ((a), B) y SNAP25 ((a), C) en preparaciones de de biventer cervicis de ave control. En b) y c) Ausencia de expresión de proteínas de sinaptofisina (A), sinaptobrevina (B) y SNAP25 (C) en preparaciones de de biventer cervicis de ave, en presencia de las PLA₂ aisladas a partir del veneno total de *Bothrops andianus* y *Crotalus scutulatus scutulatus*.

3.7.- DISCUSIÓN

En la Amazonía peruana, los envenenamientos por mordedura de serpiente ocurren por al menos siete serpientes de la familia Viperidae: *Bothriopsis bilineata*, *Bothriopsis taeniata*, *Bothrops atrox*, *Bothrops brazili*, *Crotalus durissus*, *Lachesis muta muta* y *Porthidium hyoprora* (83). Sin embargo, se han identificado y caracterizado numerosas PLA₂ a partir de estos venenos (101; 102;

103; 104), la información sobre las actividades tóxicas de las PLA₂(s) del veneno de *Bothrops andianus* y *Crotalus scutulatus scutulatus*, es aún escasa.

Según Angulo y Lomonte (2009) (8), el aislamiento y caracterización de los componentes individuales del veneno constituye el sustento de la Toxinología, como estrategia fundamental para analizar y comprender la compleja serie de eventos involucrados en el envenenamiento.

En el presente trabajo se describe la purificación, caracterización bioquímica/farmacológica de dos PLA₂ denominadas, aisladas de los venenos de *Bothrops andianus* y *Crotalus scutulatus scutulatus*, con el fin de comprender su participación en los eventos fisiopatológicos provocados por la mordedura de estas serpientes.

El método de purificación propuesto es adecuado para la purificación de ambas PLA₂ a partir de los venenos de *Bothrops andianus* y *Crotalus scutulatus scutulatus*, ya que fue posible aislar las proteínas en un único paso cromatográfico (Cromatografía de Interacción hidrofóbica) (37-41). Se pudo haber aplicado Cromatografía de intercambio Iónico o HPLC en fase Reversa como métodos de purificación, pero dado que no se tienen esos equipos ni los reactivos a usar, por ello se optó por el método aplicado dando buenos resultados.

Para el caso del veneno total de *Bothrops andianus*, los picos 2 y 3 evidenciaron ser PLA₂ y PLA₂ homóloga y fueron denominados como PLA₂ Ba y PLA₂ homólogo, respectivamente; mostraron actividad paralizante neuromuscular, miotóxica y PLA₂ alta, y fueron seleccionados para su caracterización bioquímica y farmacológica.

Para el caso del cromatograma del veneno de *Crotalus scutulatus scutulatus*, se identificaron los picos 2 y 3 y también evidenciaron ser PLA₂ y PLA₂ homóloga y fueron denominados como PLA₂ C_{ss} y PLA₂ homólogo, respectivamente, mostraron actividad paralizante neuromuscular, miotóxica y PLA₂ alta, y fueron seleccionados para su caracterización bioquímica y farmacológica al igual que la PLA₂ de *Bothrops andianus*.

Para el presente trabajo sólo fueron caracterizadas las PLA₂ de *Bothrops andianus* y *Crotalus scutulatus scutulatus*, y no las PLA₂ homólogas de ambos venenos.

El perfil electroforético en SDS-PAGE (Fig. 2) revela que tanto la PLA₂ (Ba) como la PLA₂ (C_{ss}) en condiciones no reducidas presentan una única banda electroforética con una masa molecular relativa en torno a 14 kDa, estando por

tanto constituidas por una única cadena polipeptídica. Brasiltoxina III de *B. brazili* (105), b1D-PLA2 de *B. leucurus* y LmTX-I de *L. muta muta* (102) son algunos ejemplos de los venenos de serpiente con la presencia de PLA₂ de la familia Viperidae, que también tienen una estructura monomérica.

El envenenamiento por mordedura de serpiente es un problema de salud pública a nivel mundial, particularmente en países tropicales y subtropicales. Para entender cómo el veneno ejerce su toxicidad, se requieren datos cuantitativos sobre la presencia de toxinas individuales y sus actividades en ciertos venenos (106).

Para ello, se investigó un perfil de actividades tóxicas inducidas por las PLA₂ purificadas a partir de los venenos de *Bothrops andianus* y *Crotalus scutulatus scutulatus*, incluyendo actividad paralizante neuromuscular, miotoxicidad, actividad edematógena y citotoxicidad.

Algunas PLA₂ actúan específicamente sobre el sistema nervioso periférico, paralizando a la víctima, como las neurotoxinas producidas por las serpientes *Bungarus multicinctus* (β -bungarotoxina), *Oxyuranus scutellatus scutellatus* (taipoxina) y *Pseudonaja textilis* (textilotoxina) (107). Otras PLA₂ afectan tanto al sistema nervioso periférico como al músculo esquelético, como *Crotalus durissus terrificus* que, además del bloqueo neuromuscular, inducen miotoxicidad sistémica, asociada a incrementos en la actividad plasmática de enzimas derivadas del músculo como la creatina quinasa (CK) (108).

Las PLA₂ de serpientes de la familia Viperidae (géneros *Bothrops*, *Porthidium*, *Bothriopsis*) actúan principalmente sobre el músculo produciendo mionecrosis local pronunciada (109). Aunque la actividad miotóxica de estas PLA₂ se acompaña de otros efectos tóxicos como edema, hiperalgesia y liberación de citoquinas proinflamatorias (109), no hay evidencia clínica reportada de neurotoxicidad. Es por ello que han sido clasificadas como miotoxinas no neurotóxicas (109).

Sin embargo, una serie de estudios utilizando preparaciones neuromusculares *ex vivo* aisladas de aves y mamíferos han demostrado que las PLA₂s de especies de la familia Viperidae induce bloqueo neuromuscular (110; 111; 112; 104; 113).

En el presente trabajo se evaluó la actividad paralizante neuromuscular *ex vivo* de las PLA₂ procedentes de los venenos de *Bothrops andianus* y *Crotalus scutulatus scutulatus*, utilizando la preparación biventer cervicis aislada de ave. Ambas PLA₂

indujeron un bloqueo neuromuscular irreversible, disminuyendo la respuesta contráctil tras la aplicación de las toxinas en la concentración de 10 μg (Fig. 4). Se observaron que las preparaciones neuromusculares de aves son más sensibles a los venenos botrópicos que las preparaciones de mamíferos, de acuerdo con esta afirmación, ambas PLA₂, bloquearon el 50% de la respuesta neuromuscular alrededor de 15 minutos (Fig. 5). Se observó una eficacia similar para LmTX-I, un PLA₂ D49 con actividad paralizante de la transmisión neuromuscular aislado del veneno de *Laquesis muta muta* (114).

La preparación neuromuscular biventer cervicis tiene fibras musculares con innervación multifocal. Esta preparación puede estimularse indirectamente a través de breves pulsos sobre el nervio motor, o directamente sobre el músculo. Esto hace posible discriminar entre los efectos neurotóxicos y miotóxicos de un veneno o toxina. Mientras que la neurotoxicidad solo provoca la inhibición de los estímulos indirectos, la miotoxicidad induce la inhibición de los estímulos directos e indirectos (115).

Una ventaja adicional de la preparación biventer cervicis de ave, es que puede responder a la estimulación eléctrica y agonistas nicotínicos exógenos. Esto permite diferenciar entre venenos o toxinas con efectos presinápticos o postsinápticos. Una neurotoxina presináptica inhibe los estímulos indirectos sin afectar la respuesta a los agonistas colinérgicos o la respuesta a la estimulación directa en el músculo por estimulación inducida por KCl.

Las neurotoxinas postsinápticas inhiben la respuesta a los agonistas colinérgicos así como a la estimulación indirecta, pero no afectarían las concentraciones altas de K⁺ ni la estimulación muscular directa. La presencia de componentes miotóxicos en el veneno se evidencia al reducir la respuesta de un músculo esquelético a estímulos eléctricos directos o exposición a altas concentraciones de K⁺ y/o al iniciar la contractura muscular (115).

Ambas PLA₂ procedentes de los venenos de *Bothrops andianus* y *Crotalus scutulatus scutulatus*, producen contractura y reduce la respuesta a KCl y ACh después de la incubación (Fig. 6). Tal inhibición podría implicar daños a los receptores nicotínicos causados por las fracciones, aún no descrito en la literatura, así como daños a las fibras musculares (116) como ocurre con el veneno de *Bothrops neuwiedi pauloensis* (117).

Por otro lado, el bloqueo neuromuscular producido por las PLA₂ procedentes de los venenos de *Bothrops andianus* y *Crotalus scutulatus scutulatus* a bajas concentraciones de 0.35 μ M (datos no mostrados) y 0.7 μ M no afectó la respuesta a potasio (KCl) y acetilcolina (ACh) (Fig. 7), lo que indica que la toxina a bajas concentraciones no tiene acción sobre los receptores postsinápticos.

La actividad citolítica parece ser una característica común de PLA₂ del grupo II. Así, las PLA₂ de *Bothrops andianus* y *Crotalus scutulatus scutulatus*, se estudiaron en dos modelos diferentes, en cultivo de mioblastos/miotubos (linaje C2C12) (Fig. 8). El uso de dos modelos nos permite inferir acerca de las diferencias de sensibilidad en los modelos en estudio, por ejemplo, la cepa C2C12 es un blanco altamente susceptible a la actividad citolítica de las miotoxinas del grupo II (118).

La lisis de la membrana celular inducida por las PLA₂ D49 aquí estudiada se evaluó mediante la liberación de LDH, alteraciones similares se han observado con el veneno de Agkistrodon, Trimeresurus, Crotalus (Viperidae) y Notechis (Elapidae).

El PLA₂ D49 estudiado aquí indujo citotoxicidad en mioblastos, siendo menos expresivo en miotubos (Figura 7). Esta actividad ha sido previamente descrita para otras PLA₂ D49 de *Bothrops jararacussu* (44).

Estos resultados indican que las características bioquímicas y morfológicas del linaje C2C12 hicieron que estas células fueran más susceptibles al mecanismo tóxico de PLA₂ de *Bothrops andianus* y *Crotalus scutulatus scutulatus* y esta diferencia en la susceptibilidad puede estar relacionada con la existencia de sitios altamente específicos (diana), en la membrana plasmática similares a los que se encuentran en el músculo esquelético de las células.

La expresión de sinaptofisina está relacionada con la integridad de las vesículas sinápticas y su ausencia en preparados incubados con ambas toxinas está en consonancia con la reducción de vesículas en las terminaciones terminales y el bloqueo de la tensión twitch en preparados tratados con las toxinas. Por otro lado, se podría asumir la reducción del área de la terminal nerviosa, lo que podría indicar que la acción presináptica de las dos toxinas está más allá del efecto sobre la expresión de las proteínas presinápticas, cuya naturaleza exacta es oscura.

La ausencia de proteínas involucradas en la integridad de las vesículas sinápticas (sinaptofisina), el acoplamiento de vesículas y la exocitosis del transmisor

(sinaptofisina, sinaptobrevina y SNAP25), en preparaciones incubadas con las PLA₂ de *Bothrops andianus* y *Crotalus scutulatus scutulatus*, es evidencia directa y sólida que respalda nuestra hipótesis de que ambas toxinas afectan la maquinaria de liberación de neurotransmisores al impedir el acoplamiento de vesículas sinápticas al axolema de la terminal nerviosa.

El estudio refuerza la hipótesis de que la falta de estas proteínas son las responsables de la neurotoxicidad provocada por ambas toxinas de los venenos de *Bothrops andianus* y *Crotalus scutulatus scutulatus*.

4. CONCLUSIONES

1. Utilizando metodologías de purificación cromatografía de Interacción Hidrofóbica, se purificaron toxinas del veneno completo de *B. Andianus* y *C. Scutulatus Scutulatus*. con un alto grado de pureza y homogeneidad molecular y sin pérdida de actividad biológica.
2. La neurotoxina se determinó en el proceso experimental de Electroforesis donde muestran que se trata de una PLA₂ inespecífica y sus efectos farmacológicos son mecanismos de actividad catalítica completamente independientes.
3. Las miotoxinas PLA₂ son capaces de inducir un bloqueo irreversible de la respuesta contráctil en la unión neuromuscular en la preparación biventer cervicis de pollo.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Kasturiratne A, Wickremasinghe AR, De Silva N, Gunawardena NK, Pathmeswaran A, Premaratna R, et al. The global burden of snakebite: A literature analysis and modelling based on regional estimates of envenoming and deaths. *PLoS Med.* 2008;5:1591–1604.
2. Chippaux JP. Snake-bites: Appraisal of the global situation. *Bull World Health Organ.* 1998;76:515–524.
3. Peterson ME. Snake Bite: Pit Vipers. *Clin Tech Small Anim Pract.* 2006;21:174–182.
4. Boldrini-França J, Corrêa-Netto C, Silva MMS, Rodrigues RS, Torre PDL, Pérez A, et al. Rodrigues VM+2 more. *Journal of Proteomics.* 2010;73:1758–1776.
5. Calvete JJ, Sanz L, Cid P, Torre P, Flores-Díaz M, Santos MCD, et al. Snake venomomics of the central american rattlesnake *Crotalus simus* and the south american *Crotalus durissus* complex points to neurotoxicity as an adaptive paedomorphic trend along *Crotalus* dispersal in South America. *Journal of Proteome Research.* 2010;9:528–544.
6. Rokyta DR, Wray KP, Lemmon AR, Lemmon EM, Caudle SB. A high-throughput venom-gland transcriptome for the eastern diamondback Rattlesnake (*Crotalus adamanteus*) and evidence for pervasive positive selection across toxin classes. *Toxicon.* 2011;57:657–671.
7. Rokyta DR, Lemmon AR, Margres MJ, Aronow K. The venom-gland transcriptome of the eastern diamondback rattlesnake (*Crotalus adamanteus*). *BMC Genomics.* 2012;13(312).
8. Durban J, Pérez A, Sanz L, Gómez A, Bonilla F, Rodríguez S, Chacón D, Sasa M, Angulo Y, Gutiérrez JM. Integrated omics profiling indicates that miRNAs are modulators of the ontogenetic venom composition shift in the Central American rattlesnake, *Crotalus simus simus*. *BMC Genomics* 14:234. 2013.
9. Margres MJ, Aronow K, Loyacano J, Rokyta DR. The venom-gland transcriptome of the eastern coral snake (*Micrurus fulvius*) reveals high venom complexity in the intragenomic evolution of venoms. *BMC Genomics.* 2013;14(531).
10. Margres MJ, McGivern JJ, Seavy M, Wray KP, Facente J, Rokyta DR. Contrasting modes and tempos of venom expression evolution in two snake species. *Genetics.* 2015;199:165–176.
11. Margres MJ, Wray KP, Seavy M, McGivern JJ, Herrera ND, Rokyta DR. Expression differentiation is constrained to low-expression proteins over ecological timescales. *Genetics.* 2016;202:273–283.
12. Gibbs HL, Sanz L, Calvete JJ. Snake population venomomics: proteomics-based analyses of individual variation reveals significant gene regulation effects on venom protein expression in *Sistrurus* rattlesnakes. *Journal of Molecular Evolution.* 2009;68:113–125.

13. Rokyta DR, Margres MJ, Calvin K. Post-transcriptional mechanisms contribute little to phenotypic variation in snake venoms. *Genes—Genomes—Genetics*. 2015;5:2375–2382.
14. Rokyta DR, Wray KP, McGivern JJ, Margres MJ. The transcriptomic and proteomic basis for the evolution of a novel venom phenotype within the Timber Rattlesnake (*Crotalus horridus*). *Toxicon*. 2015;98:34–48.
15. Margres MJ, Wray KP, Seavy M, McGivern JJ, Sanader D, Rokyta DR. Phenotypic integration in the feeding system of the eastern diamondback rattlesnake (*Crotalus adamanteus*). *Molecular Ecology*. 2015;24:3405–3420.
16. Margres MJ, McGivern JJ, Wray KP, Seavy M, Calvin K, Rokyta DR. Linking the transcriptome and proteome to characterize the venom of the eastern diamondback rattlesnake (*Crotalus adamanteus*). *Journal of Proteomics*. 2014;96:145–158.
17. Margres MJ, Walls R, Suntravat M, Lucena S, Sánchez EE, Rokyta DR. Functional characterizations of venom phenotypes in the eastern diamondback rattlesnake (*Crotalus adamanteus*) and evidence for expression-driven divergence in toxic activities among populations. *Toxicon*. 2016;119:28–38.
18. Lynch VJ. Inventing an arsenal: adaptive evolution and neofunctionalization of snake venom phospholipase A2 genes. *BMC Evolutionary Biology* 7:2. 2007.
19. Gibbs HL, Rossiter W. Rapid evolution by positive selection and gene gain and loss: PLA2 venom genes in closely related *Sistrurus* rattlesnakes with divergent diets. *Journal of Molecular Evolution*. 2008;66:151–166.
20. Jansa SA, Voss RS. Adaptive evolution of the venom-targeted vWF protein in opossums that eat pitvipers. *PLOS ONE*. 2011;6(6).
21. Biardi JE, Chien DC, Coss RG. California ground squirrel (*Spermophilus beecheyi*) defenses against rattlesnake venom digestive and hemostatic toxins. *Journal of Chemical Ecology*. 2005;31(11).
22. Biardi JE, Nguyen KT, Lander S, Whitley M, Nambiar KP. A rapid and sensitive fluorometric method for the quantitative analysis of snake venom metalloproteases and their inhibitors. *Toxicon*. 2011;57:342–347.
23. Mackessy SP. Venom ontogeny in the Pacific rattlesnakes *Crotalus viridis helleri* and *C. v oregonus* Copeia. 1988;1988(1).
24. Glenn JL, Straight RC, Wolf TB. Regional variation in the presence of canebrake toxin in *Crotalus horridus* venom. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C*. 1994;107(3).
25. López-Lozano JL, De Sousa MV, Ricart CAO, Chávez-Olortegui C, Sanchez EF, Muniz EG, et al. Ontogenetic variation of metalloproteinases and plasma coagulant activity in venoms of wild *Bothrops atrox* specimens from Amazonian rain forest. *Toxicon*. 2002;40:997–1006.

26. Saldarriaga MM, Otero R, Núñez V, Toro MF, Díaz A, Gutiérrez JM. Ontogenetic variability of *Bothrops atrox* and *Bothrops asper* snake venoms from Colombia. *Toxicon*. 2003;42:405–411.
27. Mackessy SP, Sixberry NM, Heyborne WH, Fritts T. Venom of the brown treesnake, *Boiga irregularis*: ontogenetic shifts and taxa-specific toxicity. *Toxicon*. 2006;47:537–548.
28. Mackessy SP. Evolutionary trends in venom composition in the Western Rattlesnakes (*Crotalus viridis sensu lato*): toxicity vs. tenderizers. *Toxicon* 55:1463-1474. 2010.
29. Zelanis A, Tashima AK, Rocha MMT, Furtado MF, Camargo ACM, Ho PLH, et al. Analysis of the ontogenetic variation in the venom proteome/peptidome of *Bothrops jararaca* reveals different strategies to deal with prey. *Journal of Proteome Research*. 2010;9:2278–2291.
30. Gibbs HL, Sanz L, Chiocchi JE, Farrell TM, Calvete JJ. Proteomic analysis of ontogenetic and diet-related changes in venom composition of juvenile and adult Dusky Pigmy rattlesnakes (*Sistrurus miliarius barbouri*). *Journal of Proteomics*. 2011;74:2169–2179.
31. Doley R, Zhou X, Kini RM. Snake venom phospholipase A2 enzymes. In: Mackessy SP, editor. Boca Raton: CRC Press; 2010. p. 173–205.
32. Sanchez EF, Flores-Ortiz RJ, Alvarenga VG, Eble JA. Direct fibrinolytic snake venom metalloproteinases affecting hemostasis: Structural, biochemical features and therapeutic potential. *Toxins (Basel)*. 2017;9:392.
33. Angulo Y, Lomonte B. Biochemistry and toxicology of toxins purified from the venom of the snake *Bothrops asper*. *Toxicon*. 2009;54:949–957.
34. Zhou X, Manjunatha Kini R, Doley R. Snake Venom Phospholipase A2 Enzymes. In: Mackessy SP, Ed. CRCP, Francis, editors. Boca Raton, FL, USA; 2009. p. 173–205.
35. Sanhajariya S, Duffull SB, Isbister GK. Pharmacokinetics of snake venom. *Toxins (Basel)*. 2018;10:73.
36. Revealing the functional structure of a new PLA(2) K49 from *Bothriopsis taeniata* snake venom employing automatic “de novo” sequencing using CID/HCD/ETD MS/MS analyses. Revealing the functional structure of a new PLA(2) K49 from *Bothriopsis taeniata* snake venom employing automatic “de novo” sequencing using CID/HCD/ETD MS/MS analyses. *JOURNAL OF PROTEOMICS*; 2016.
37. LA (Ponce-Soto Luis Alberto) 2 Marangoni S (Marangoni Sergio) 2 Gallacci M (Gallacci Marcia) CW (garrido CWL 1. P-S. Neuromuscular effects of venoms and crotoxin-like proteins from *Crotalus durissus ruruima* and *Crotalus durissus cumanensis*. *TOXICON*; 2015.
38. LA (Ponce-Soto Luis Alberto) 2 3 Marangoni S (Marangoni Sergio) 2 Soares AM (Soares Andreimar M.) 5 4 Fontes MRM (Fontes Marcos R. M.) FC (fernandes CAH). 1. CEJ (comparetti EJ). 1. BRJ (borges RJ). 1. H-VS (huancahuire-VS 2. P-S. Structural bases for a complete myotoxic mechanism: Crystal structures of two non-catalytic

- phospholipases A(2)-like from Bothrops brazili venom. *BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACTA-PROTEINS AND PROTEOMICS*; 2013.
39. LA (Ponce-Soto Luis Alberto) 1 Marangoni S (Marangoni Sergio) CVC (carregari VC 1. FRS (floriano RS 2. R-SL (rodrigues-SL 2. WFV (winck FV). 3. 4. BPA (baldasso PA 1. P-S. Biochemical, Pharmacological, and Structural Characterization of New Basic PLA (2) Bbil-TX from Bothriopsis bilineata Snake Venom. *BIOMED RESEARCH INTERNATIONAL*; 2013.
 40. LA (Ponce-Soto Luis Alberto) Baldasso PA (Baldasso Paulo Aparecido) Romero-Vargas FF (Romero-Vargas Frey Francisco) Winck FV (Winck Flavia V) Novello JC (Novello Jose Camillo) Marangoni S (Marangoni Sergio) P-S. Biochemical, pharmacological and structural characterization of two PLA (2) isoforms Cdr-12 and Cdr-13 from *Crotalus durissus ruruima* snake venom. 2007.
 41. LA (Ponce-Soto Luis Alberto) Lomonte B (Lomonte Bruno) Rodrigues-Simioni L (Rodrigues-Simioni Lea) Novello JC (Novello Jose Camillo) Marangoni S (Marangoni Sergio) P-S. Biological and structural characterization of crotoxin and new isoform of crotoxin B PLA (2) (F6a) from *Crotalus durissus collilineatus* snake venom. 2007.
 42. Proteasas de veneno de serpiente que afectan la hemostasia y la trombosis. *Biochim. Biophys.* 2000.
 43. Gutiérrez JM, Lomonte B. Efectos locales en el envenenamiento por serpientes en América Latina - *ANIMALES VENENOSOS EN BRASIL: Biología.* 2003.
 44. Ponce-Soto LA, Bonfim VL, Rodrigues-Simioni L, Novello JC, Marangoni S. Determinación de la estructura primaria de dos isoformas 6-1 y 6-2 PLA2 D49 del veneno de serpiente *Bothrops jararacussu* y caracterización neurotóxica usando in vitro preparaciones neuromusculares. 2006.
 45. Teixeira C, Landucci E, Antunes E, Chacur M, Cury Y. Efectos inflamatorios de las fosfolipasas miotóxicas del veneno de serpiente A2. *Toxicon.* 2003;
 46. Fox JB. Metaloproteinasas hemorrágicas de venenos de serpientes. *Pharmacol Ther.* 1994;
 47. Rucavado A, Lomonte V, Obadia M, Gutierrez JM. Daño tisular local inducido por BaP1, una metaloproteinasa aislada del veneno de serpiente *Bothrops asper* (Terciopelo). 1995.
 48. Kini RM. enzimas Venom Phosfolipasa A2: estructura, función y mecanismo. En: Fosfolipasa A2: un complejo rompecabezas de proteínas multifuncionales en: RM Kini. Wiley, Chichester; 1997. p. 1–28.
 49. Kini RM. Serina proteasas que afectan la coagulación sanguínea y la fibrinólisis de los venenos de serpientes *Pathophysiol Haemost Thromb. Pathophysiol Haemost Thromb.* 2005;34:200–4.
 50. Ponce-Soto LA, Lomonte B, Gutiérrez JM, Rodrigues-Simioni L, Novello JC, Marangoni S. Propiedades estructurales y funcionales de BaTX, un nuevo homólogo de

- la fosfolipasa A2 Lys49 aislado del veneno de la serpiente *Bothrops alternatus*. *Biochim Biophys Acta*. 2007;770:585–93.
51. Wang X. Fosfolipasa vegetal. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*. 2001;52:211–31.
 52. Arni RK, Ward RJ. Fosfolipasa A2: una revisión estructural. *tóxico*. 1996.
 53. Kini RM. Emoción por delante: estructura, función y mecanismo de las enzimas fosfolipasa A2 del veneno de serpiente. *tóxico* 42: 827–840. 2003.
 54. Cisne De Paula R, Rodrigues CR, Melo PA. Características estructurales y farmacológicas de las fosfolipasas A2 de los venenos de serpiente. *Letras de proteínas y péptidos*. 16:899–907.
 55. Arita H, Nakano T, Hanasaki K. Tromboxano A2: su generación y función en la activación plaquetaria. *programa Lipid Res*. 1989;28:273–301.
 56. Zhang Q, Wang J, Han Y, Xie Q, An L, Bao Y. Identificación de una nueva fosfolipasa A2 similar a la trombina del veneno de serpiente *Gloydius ussuriensis*. *Fibrinólisis del coágulo sanguíneo*. 2007;18:723–9.
 57. Davidson FF, Dennis EA. Secuencia de aminoácidos y dicroísmo circular de la fosfolipasa ácida A2 del veneno de serpiente india (*N. naja naja*). *bioquímica Biografía Minutos*. 1990;1037:7–15.
 58. Heinrikson RL. Secuencia de aminoácidos de la fosfolipasa A2- α del veneno de *Crotalus adamanteus*. Una nueva clasificación de fosfolipasas A2 basada en determinantes estructurales. *J Biol química*. 252:4913–21.
 59. Da D. La superfamilia en expansión de enzimas fosfolipasa A2: clasificación y caracterización. *bioquímica Biografía*. *bioquímica Biografía Acta*. 1488:1–19.
 60. Burke JE. Bioquímica de la fosfolipasa A2. *Fármacos cardiovasculares Ther*. 23:49–59.
 61. Mukherjee AB, Pattabiraman ML. Enzima fosfolipasa A2: regulación y función fisiológica. *Farmacobioquímica*. 1994;5:1–10.
 62. Fry MR, East JM. Papel de la fosfolipasa A2 del esperma humano en la fertilización: efectos de un nuevo inhibidor de la actividad de la fosfolipasa A2 sobre las perturbaciones de la membrana y la penetración de los ovocitos. *Biol tocar*. 1992;47:751–9.
 63. Nakajima M, Hanasaki K, Ueda M, Arita H. Efecto de la fosfolipasa A2 de tipo pancreático en arterias cerebrales porcinas aisladas a través de sus sitios de unión específicos. *FEBS Lett*. 1992;309:261–4.
 64. Sommers CD, Bobbitt JL, Bemis KG, Snyder DW. Contracciones inducidas por fosfolipasa A2 pancreática porcina de tiras pleurales de pulmón de cobayo. *Eur J Pharmacol*. 1992;216:87–96.
 65. Vadas P, Pruzanski W. Papel de las fosfolipasas A2 secretoras en la patobiología de la enfermedad. *Lab Invertir*. 1986;55:391–404.

66. Vadas P, Browning J, Edelson J, Pruzanski W. Expresión e inflamación de fosfolipasa A2 extracelular: la relación con los estados patológicos asociados. *J Mediadores de lípidos*. 1993;8:1–30.
67. Schaloske RH, Dennis E. La superfamilia de fosfolipasa A2 y su sistema de numeración de grupos. *bioquímica Biografía*. *bioquímica Biografía Minutos*. 2006;1761:1246–59.
68. De Araujo. Análisis de secuencia de miotoxinas Lys49 fosfolipasa A2: una clase de proteínas altamente conservada. *tóxico*. 1996;34:1237–42.
69. De Araujo, Ownby CL. Análisis de secuencia de miotoxinas Lys49 fosfolipasa A2: una clase de proteínas altamente conservada. *Arco Bioquímica Biografía*. 1996;326:21–30.
70. Gutiérrez JM, Lomonte B. Miotoxinas de fosfolipasa A2 de venenos de serpientes *Bothrops*. *tóxico*. 1995;33:1405–24.
71. Ohno M, Chijiwa T, Oda-Ueda N, Ogawa T, Hattori S. Evolución molecular de las fosfolipasas A2 miotóxicas del veneno de serpiente. *Toxicon*. 2003;42:841–54.
72. Verheij HM, Boffa MC, Rothen C, Bryckert MC, Verger R, De Haas GH. Correlación de la actividad enzimática y las propiedades anticoagulantes de la fosfolipasa A2. *Eur J Biochem*. 1980;112.
73. Yang CC. Relación estructura-función de PLA2 de venenos de serpiente. *J Toxicol Toxina Rev*. 1994;13:125–7.
74. Yang CC. Modificación química y sitios funcionales de fosfolipasas A2. En: *Venom Phospholipase A2 Enzymes: Structure, Function and Mechanism*. Wiley, Chichester, Inglaterra, págs; 1997. p. 185–204.
75. Verheij HM, Jansen E, Drenth J. Metilación de histidina-48 en fosfolipasa A2 pancreática. Papel de la histidina y del ion calcio en el mecanismo catalítico. *Bioquímica*. 1980;19:743–50.
76. Scott DL, Otwinowski Z, Yuan W. Catálisis interfacial: el mecanismo de la fosfolipasa A2. *Ciencias*. 250(4987):1541–6.
77. Lee WH, Marangoni S, Polikarpov I. Base estructural de la actividad catalítica baja en la hipótesis de las fosfolipasas A2-A Lys49: la estructura cristalina de la piratoxina II Complejado con Ácido Graso. *Bioquímica*. 40(1):28–36.
78. Ward RJ, De A. En la interfaz: estructuras cristalinas de fosfolipasas A2. *tóxico*. 1998;36:1623–33.
79. Liu SY, Yoshizumi K, Oda N, Ohno M, Tokunaga F, Iwanaga S, et al. Purificación y secuencia de aminoácidos de la proteína básica II, una lisina-49-fosfolipasa A2 con baja actividad, del veneno de *Trimeresurus flavoviridis*. *J Bioquímica*. 1990;107:400–8.
80. Francis B, Gutierrez JM, Lomonte B. Miotoxina II del veneno de *Bothrops asper* (Terciopelo) en una lisina-49 fosfolipasa A2. *Arco Bioquímica Biografía*. 284:352–9.
81. Dennis EA. Diversidad de tipos de grupos, regulación y función de la fosfolipasa A2. *J Biol química*. 1994;269:13057–60.

82. Gutiérrez JM, Lomonte B. En: Venom fosfolipasa A2 enzimas: estructura, función y mecanismo. Inglaterra, Reino Unido: John Wiley & Sons; 1997.
83. Otero R, Gutiérrez J, Mesa Mb Duque E, Rodríguez O, Gomez F, Toro A, et al. Complications of Bothrops, Porthidium and Bothriechis snakebites in Colombia. Estudio clínico y epidemiológico de 39 casos atendidos en un hospital universitario. tóxico. 2002;40:1107–14.
84. Gutierrez JM, Rucavado A, Escalante T, Diaz C. Hemorragia inducida por metaloproteinasas de veneno de serpiente: mecanismos bioquímicos y biofísicos implicados en el daño de microvasos. Toxicón. 2005;45:997–1011.
85. Lomonte B, Angulo Y, Calderón L. Una descripción general de las miotoxinas de la lisina-49 fosfolipasa A2 de los venenos de serpientes crotálicos y sus determinantes estructurales de la acción miotóxica. tóxico. 2003;42:885–901.
86. Harris JB. Necrosis muscular causada por venenos y toxinas de serpientes. Microscopía electrónica. Rev. 1990;3:183–211.
87. Mebs D. Componentes miotóxicos de los venenos de serpiente: sus actividades bioquímicas y biológicas. farmacéutico El r. 1990;48:223–36.
88. Rodríguez-Acosta. Los venenos y el síndrome del envenenamiento por serpiente. Vitae: Academia Biomédica Digital, ISSN 1317-987X, No. 9. 2001.
89. Lalloo DG, Trevett AJ, Black J, Mapao J, Saweri A, Naraqi S, et al. Neurotoxicidad, actividad anticoagulante y evidencia de rabdomiólisis en pacientes mordidos por víboras de la muerte (*Acanthophis* sp.) en el sur de Papúa Nueva Guinea. QJM. 1996;89(1):25–35.
90. Hodgson WC, Wickramaratna J. Actividad neuromuscular in vitro de los venenos de serpiente Farmacología y fisiología clínica y experimental. 2002;29:807–14.
91. Narahashi T, Hg Y Therrien EF. Saxitoxina y tetrodotoxina: comparación del mecanismo de bloqueo nervioso. Ciencias. 1967;22:1441–2.
92. Hass A, Rossberg MI, Hodes HL, Yatt AC, Hodes DS. Niveles de endotoxinas en niños inmunocomprometidos con fiebre. J Pediatr. 1986;109:265–9.
93. Zlotkin E, Fraenkel F, Miranda F, Lissitzky S. El efecto de los venenos de escorpión en las larvas de mosca azul: un nuevo método para evaluar la potencia de los venenos de escorpión. Toxicón. 1971;9:1–8.
94. Strichartz GR. Disociación rápida dependiente del voltaje de las toxinas β del escorpión acopladas a la inactivación del canal de Na en el nervio mielinizado. J Gen Physiol. 88:413–35.
95. Chang CC. La crotoxina, la neurotoxina del veneno de la serpiente de cascabel sudamericana, es una toxina presináptica que actúa como Lige β -Bungarotoxina. Naunyn-Schmiedeberg ArchPharmacol. 296:159–68.
96. Kelly RB. Inhibición dependiente de fosfolipasa e independiente de fosfolipasa de la liberación del transmisor por b-bungarotoxina. Adv Citofarmacol. 3:77–85.

97. Harris JB. Fosfolipasas en venenos de serpiente y su efecto sobre el nervio y el músculo, En: Snake Toxins, Harvey AL (ed), pp 91 - 129. 1991.
98. Rosenberg P. Manual de Toxinología. Marcel Dekker. Shier WT, Mebs D, editores. Nueva York, págs; 1990.
99. Karlsson E. Química de toxinas proteicas en venenos de serpiente. En: LEE, CY Manual de farmacología experimental. Nueva York; Berling Heidelberg: Springer; 1979.
100. Tselin VI, Hucho F. Toxinas de serpientes y caracoles que actúan sobre los receptores nicotínicos de acetilcolina: aspectos fundamentales y aplicaciones médicas. FEBS Lett. 2004;557:9–13.
101. Bogarín G, Segura E, Durán G, Lomonte B, Rojas G, Gutiérrez JM. (Evaluation of neutralizing ability of four commercially available antivenoms against the venom of *Bothrops asper* from Costa Rica). *Toxicon*. 1995;33(9):1242–7.
102. Damico DCS, Bueno LGF, Rodrigues-Simioni L, Marangoni S, da Cruz-Höfling MA, Novello JC. Neurotoxic and myotoxic actions from *Lachesis muta muta* (surucucu) whole venom on the mouse and chick nerve-muscle preparations. *Toxicon*. 2005;46(2):222–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.toxicon.2005.04.011>
103. Porto M. The Brazilian environmental justice network: Five years of experiences. *Epidemiology*. 2007;18(5):S156. Available from: <http://dx.doi.org/10.1097/01.ede.0000276808.53957.a4>
104. Pereañez JA, Núñez V, Huancahuire-Vega S, Marangoni S, Ponce-Soto LA. Biochemical and biological characterization of a PLA2 from crotoxin complex of *Crotalus durissus cumanensis*. *Toxicon*. 2009;53(5):534–42. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.toxicon.2009.01.021>
105. Huancahuire-Vega S, Ponce-Soto LA, Martins-de-Souza D, Marangoni S. Structural and functional characterization of brazilitoxins II and III (BbTX-II and -III), two myotoxins from the venom of *Bothrops* brazil snake.
106. Calvete J, Sanz L, Juárez P. Snake venomomics and disintegrins: Portrait and evolution of a family of snake venom integrin antagonists. In: Handbook of Venoms and Toxins of Reptiles. CRC Press; 2009. p. 337–57.
107. Prasarnpun S, Walsh J, Awad SS, Harris JB. Envenoming bites by kraits: the biological basis of treatment-resistant neuromuscular paralysis. *Brain*
108. Warrell DA. Treatment of bites by adders and exotic venomous snakes. *BMJ* [Internet]. 2005;331(7527):1244–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1136/bmj.331.7527.1244>
109. Lomonte B, Angulo Y, Santamaría C. Comparative study of synthetic peptides corresponding to region 115-129 in Lys49 myotoxic phospholipases A2 from snake venoms. *Toxicon* [Internet]. 2003;42(3):307–12. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/s0041-0101\(03\)00149-1](http://dx.doi.org/10.1016/s0041-0101(03)00149-1)
110. Gallacci M, Oliveira M, Dal Pai-Silva M, Cavalcante WLG, Spencer PJ. Paralyzing and myotoxic effects of a recombinant bothropstoxin-I (BthTX-I) on mouse neuromuscular

- preparations. *Exp Toxicol Pathol* [Internet]. 2006;57(3):239–45. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.etp.2005.09.004>
111. Ponce-Soto LA, Lomonte B, Gutiérrez JM, Rodrigues-Simioni L, Novello JC, Marangoni S. Structural and functional properties of BaTX, a new Lys49 phospholipase A2 homologue isolated from the venom of the snake *Bothrops alternatus*. *Biochim Biophys Acta* [Internet]. 2007;1770(4):585–93. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbagen.2006.11.015>
 112. Damico DCS, da Cruz Höfling MA, Cintra M, Leonardo MB, Calgarotto AK, da Silva SL, et al. Pharmacological study of edema and myonecrosis in mice induced by venom of the bushmaster snake (*Lachesis muta muta*) and its basic Asp49 phospholipase A(2) (LmTX-I). *Protein J* [Internet]. 2008;27(6):384–91. Available from: <http://dx.doi.org/10.1007/s10930-008-9148-x>
 113. Fagundes FHR, Oliveira M, Huanchuire-Vega S, Romero-Vargas FF, Ponce-Soto LA, Marangoni S. cDNA and deduced primary structure of basic phospholipase A2 with neurotoxic activity from the venom secretion of the *Crotalus durissus collilineatus* rattlesnake. *Braz J Med Biol Res* [Internet]. 2010;43(3):262–70. Available from: <http://dx.doi.org/10.1590/s0100-879x2010007500009>
 114. Damico DCS, Bueno LGF, Rodrigues-Simioni L, Marangoni S, da Cruz-Höfling MA, Novello JC. Functional characterization of a basic D49 phospholipase A2 (LmTX-I) from the venom of the snake *Lachesis muta muta* (bushmaster). *Toxicon* [Internet]. 2006;47(7):759–65. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.toxicon.2006.02.007>
 115. Harvey RL. *Neural Network Principles*. London, England: Prentice-Hall; 1994.
 116. Prianti ACG Jr, Ribeiro W, Lopes-Martins RAB, Lira-Da-Silva RM, Prado-Franceschi J, Rodrigues-Simioni L, et al. Effect of *Bothrops leucurus* venom in chick biventer cervicis preparations. *Toxicon*. 2003;41(5):595–603.
 117. Beghini DG, Hernandez-Oliveira S, Rodrigues-Simioni L, Novello JC, Hyslop S, Marangoni S. Anti-sera raised in rabbits against crotoxin and phospholipase A2 from *Crotalus durissus cascavella* venom neutralize the neurotoxicity of the venom and crotoxin. *Toxicon* [Internet]. 2004;44(2):141–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.toxicon.2004.05.011>
 118. Rufini S, Incerpi S, Pedersen JZ. Phospholipase-like myotoxins induce Ca²⁺ increase in muscle cells in culture. *Toxicon* [Internet]. 1995;33(3):300. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/0041-0101\(95\)99353-5](http://dx.doi.org/10.1016/0041-0101(95)99353-5)
 119. Yao T, Asayama Y. Animal-cell culture media: History, characteristics, and current issues. *Reprod Med Biol*. 2017;16(2):99–117. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29259457/>
 120. Tinción de Cristal Violeta (0.5%) en cultivo de células adherentes. Conogasi. 2018. Disponible en: <https://conogasi.org/articulos/tincion-de-cristal-violeta-0-5-en-cultivo-de-celulas-adherentes/>

PROTEÍNAS PRESINÁPTICAS COMO MARCADORES DE LA ACTIVIDAD NEUROTÓXICA "EX VIVO" DE FOSFOLIPASAS A2, PROCEDENTES DE LOS VENENOS DE BOTHROPS ANDIANUS Y CROTALUS SCUTULATUS SCUTULATUS

INFORME DE ORIGINALIDAD

14%

INDICE DE SIMILITUD

12%

FUENTES DE INTERNET

3%

PUBLICACIONES

11%

TRABAJOS DEL ESTUDIANTE

FUENTES PRIMARIAS

1	Submitted to Universidad Católica de Santa María Trabajo del estudiante	6%
2	repositorio.unsa.edu.pe Fuente de Internet	4%
3	repositorio.unicamp.br Fuente de Internet	2%
4	www.oalib.com Fuente de Internet	1%
5	repositorio.unap.edu.pe Fuente de Internet	1%
6	peerj.com Fuente de Internet	1%
7	www.ins.gov.co Fuente de Internet	1%

Excluir citas

Apagado

Excluir coincidencias < 1%

Excluir bibliografía

Apagado