

**UNIVERSIDAD DE SAN MARTIN**  
**ANLIS "DR. CARLOS G. MALBRÁN"**

**MAESTRÍA EN MICROBIOLOGÍA MOLECULAR**

**AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE LA MIOTOXINA I DEL  
COMPLEJO *BOTHROPS NEUWIEDI* (YARARÁ CHICA)**



**DIRECTOR: DRA. SUSANA LAUCELLA**

**ALUMNA: BIOQ. PATRICIA ANDREA GEOGHEGAN**

---

<b>AGRADECIMIENTOS</b>	<b>iv</b>
<b>ABREVIATURAS</b>	<b>v</b>
<b>LISTA DE FIGURAS</b>	<b>vi</b>
<b>LISTA DE TABLAS</b>	<b>viii</b>
<b>NOTA ACLARATORIA</b>	<b>ix</b>
<b>RESUMEN</b>	<b>x</b>
<b>INTRODUCCION</b>	<b>1</b>
• Importancia médica de los venenos de víbora	<b>1</b>
• Serpientes venenosas de nuestro país y su veneno	<b>3</b>
• Daño tisular localizado por acción del veneno	<b>4</b>
a. Hemorraginas	<b>6</b>
b. Miotoxinas	<b>8</b>
b.1. Miotoxinas pequeñas	<b>8</b>
b.2. Cardiotoxinas	<b>9</b>
b.3. Miotoxinas PLA2	<b>10</b>
b.4. Factores miotóxicos	<b>15</b>
c. Toxinas inductoras de edema	<b>18</b>
• Envenenamiento por el género <i>Bothrops</i> (Yarará)	<b>19</b>
<b>OBJETIVOS</b>	<b>24</b>
<b>SIGNIFICADO DEL TRABAJO</b>	<b>24</b>
<b>MATERIALES Y METODOS</b>	<b>25</b>
• Obtención de veneno Complejo <i>Bothrops neuwiedi</i>	<b>25</b>
• Aislamiento y purificación de toxinas del veneno Complejo <i>Bothrops neuwiedi</i> .	<b>25</b>
• Secuenciación de Miotoxina I	<b>26</b>

• Reactividad cruzada de antígenos	26
• Caracterización bioquímica	26
Actividad Citolítica	27
Actividad Fosfolipasa A2	28
Actividad Hemorrágica	29
Actividad Miotóxica	29
Actividad Edematizante	30
Actividad Necrozante	31
Actividad Letal (DL50%)	31
Actividad Desfibrinogenante	32
<b>RESULTADOS</b>	<b>33</b>
• Ensayos <i>in vitro</i>	33
Aislamiento y purificación	33
Secuenciación de Miotoxina I	35
Reactividad cruzada de antígenos	35
Actividad citolítica	36
Actividad Fosfolipasa A2	39
• Ensayos <i>in vivo</i>	40
Actividad Hemorrágica	40
Actividad Miotóxica	41
Actividad Edematizante	44
Actividad Necrosante	45
Actividad Letal (DL50%)	47
Actividad Desfibrinogenante	47
• <b>DISCUSIÓN</b>	<b>49</b>
• <b>CONCLUSIONES</b>	<b>53</b>
• <b>BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>54</b>

## **AGRADECIMIENTOS**

Mi sincero agradecimiento a todas las personas que me guiaron, colaboraron, ayudaron, alentaron y estuvieron a mi lado en este camino:

A la Dra Laucella por haber aceptado la dirección de esta tesis, por todo su aporte y voluntad para que pueda alcanzar el objetivo.

A la Lic.Brero, quien fue la primera persona que me capacitó en el tema de antivenenos y venenos cuando llegue al Instituto Malbrán, me permitió desarrollarme en este tema y me ayudo con su aporte en la lectura crítica de esta tesis.

Al Dr. Lomonte, del Instituto Clodomiro Picado de Costa Rica quien me recibió en su laboratorio, transmitió toda su experiencia y conocimientos en forma desinteresada y me introdujo en el fascinante mundo de los venenos ofídicos.

Al Dr. Gutierrez del Instituto Clodomiro Picado por convocarme a formar parte de sus proyectos.

A los organizadores de esta Maestría, especialmente a la Dra. Carlomagno quien me alentaba a terminar esta tesis cada vez que podía.

A la Comisión Académica de la Maestría y especialmente a la Directora Baumeister, que me permitieron presentar esta tesis después de tanto tiempo.

A Adriana y Virginia por su compañerismo, su buena predisposición, su colaboración, por estar siempre que las necesito y por tantos años compartidos.

A Andrea por brindarme su conocimiento y ayuda en el tema de cultivos celulares para realizar parte de este trabajo.

A todos mis compañeros del CNCCB por su apoyo y colaboración siempre que requerí de su ayuda: Mónica, Graciela, Carlos, Marta, Graciélita, Natalia, Betina, Silvina, Silvana, Javier, Débora, Mariana, Alicia, Mirla, Ester, Gisela, Alejandro, Olga.

A Claudia por su crítica corrección y brindarme su ayuda espontáneamente.

A Marcela por bancarme todas las mañanas.

Por último, pero lo más importante quiero agradecer a mi familia que siempre estuvo y está a mi lado:

A “mis viejos”, sin ellos nada de esto podría haber ocurrido y no sería quien soy.

A mi hija Delfina, por alentarme a terminar esta etapa e interesarse por mi tema de tesis y acompañarme en todo este proceso.

A Omar por acompañarme en este momento de mi vida.

A mis hermanos, mis cuñadas y mis sobrinos. Santi y July.

## ABREVIATURAS

aa:	aminoácido
Asp:	Aspártico
BnC:	Complejo <i>Bothrops neuwiedi</i> ( <i>Bothrops neuwiedi complex</i> )
<i>B.asper</i> :	<i>Bothrops asper</i>
Ca <sup>2+</sup> :	Ion Calcio
C2C12:	Línea celular de mioblastos precursora de músculo esquelético
ClK:	Cloruro de Potasio
ClH:	Ácido Clorhídrico
ClNa:	Cloruro de Sodio
Cl <sub>2</sub> Ca:	Cloruro de Calcio
CK:	Creatinin Kinasa
CK-BB:	Creatinin Kinasa isoforma sistema nervioso central
CK-MM:	Creatinin Kinasa isoforma músculo esquelético
CK-MB:	Creatinin Kinasa isoforma músculo cardíaco
DEM:	Dosis Edematizante Mínima
DDM:	Dosis Desfibrinante Mínima
DHM:	Dosis Hemorrágica Mínima
DL50%:	Dosis Letal 50%
DMEM:	Medio de cultivo de crecimiento modificado
DMN:	Dosis Mínima Necrótizante
EDTA:	Ácido etilendiaminotetra acético
gr:	Gramos
kD:	kilodalton
L20B:	Línea celular de tejido conectivo de ratón
LDH:	Lactato deshidrogenasa
LTB4:	Leucotrieno
Lys:	Lisina
MEM:	Medio de cultivo de crecimiento
Na <sup>2+</sup> :	Ion Sodio
NaOH:	Hidróxido de Sodio
OMS:	Organización Mundial de la Salud
PAGE:	Electroforesis en gel de poliacrilamida
PBS:	Buffer Fosfato
PLA2:	Fosfolipasa A2
PO <sub>4</sub> Na <sub>2</sub> :	Fosfato de Sodio
RD:	Línea celular muscular de rhabdomiosarcoma humano
SDS:	Dodecyl Sulfato de Sodio
Ser:	Serotonina
SFB:	Suero Fetal Bovino
tEnd:	Línea celular de endotelio capilar de ratón

## LISTA DE FIGURAS

---

- Figura 1-** Localización geográfica de distribución de la especie que conforman el complejo *Bothrops neuwiedi* de Argentina. Hallazgos hasta el año 2014 (Ministerio de Salud de la Nación 2014).
- Figura 2-** Accidente ofídico por la especie *BnC*. Se evidencia edema, necrosis y hemorragia de los miembros.
- Figura 3-** Mecanismo simplificado de los eventos que ocurren en la inflamación y daño tisular inducida por el veneno del género *Bothrops*.
- Figura 4-** Representación esquemática de la estructura básica de los fragmentos de inmunoglobulina IgG.
- Figura 5-** Cromatografía de intercambio iónico, análisis del veneno *BnC* usando columna de CM- Sephadex C-25.
- Figura 6-** RP-HPLC, cromatografía líquida de alto desempeño en fase reversa, análisis del pico B-4 obtenido de la separación por cromatografía de intercambio iónico del *BnC*
- Figura 7-** Análisis electroforético de la Miotoxina I de *BnC*.
- Figura 8-** La secuencia N-amino terminal de la Miotoxina I de *BnC*.
- Figura 9-** Inmunodifusión en gel de agarosa 1%.
- Figura 10-** Alteraciones sobre las fibras musculares de las células C2C12 *in vitro* causada por la Miotoxina I de *BnC*.
- Figura 11-** Cultivo celular .Control monocapa de células L20B (A y B) y de células RD (C y D). Control negativo sin veneno *BnC*.
- Figura 12-** Efecto citotóxico del veneno *BnC* al 4to. día de la inoculación sobre las células L20B y células RD.
- Figura 13-** Actividad citotóxica del veneno *BnC* y de la Miotoxina I. Citotoxicidad estimada por la liberación de la enzima LDH en el sobrenadante de cultivos celulares. Cada barra representa la media  $\pm$  SD de dos determinaciones.
- Figura 14-** Actividad PLA2. Comparación de la actividad enzimática del veneno de *BnC* y la Miotoxina I.
- Figura 15-** Hemorragia observada *in vivo*.
- Figura 16-** Actividad Hemorrágica.
- Figura 17-** Actividad Miotóxica del veneno entero de *BnC* y de la Miotoxina I *in vivo*..
- Figura 18-** Microscopia intravital. Vista de tejido muscular de testículo de ratón sin veneno ni toxina.

**Figura 19-** Tejido muscular de testículo de ratón expuesto a la Miotoxina I se visualiza ruptura de fibras musculares.

**Figura 20-** Tejido muscular de testículo de ratón expuesto al veneno de *BnC*.

**Figura 21-** Actividad Edematizante de la Miotoxina I de *BnC in vivo*.

**Figura 22-** Lesión necrótica *in vivo*.

**Figura 23-** Representación de DNM del veneno *BnC* y de la Miotoxina I aislada.

**Figura 24-** Representación de la DL50% de veneno *BnC* en ratones y de la Miotoxina I luego de 96 hs. de observación.

---

## **LISTA DE TABLAS**

**Tabla 1-** Clasificación de las miotoxinas.

**Tabla 2-** Niveles de LDH en distintos tipos celulares.

**Tabla 3-** Comparación de resultados biológicos entre el veneno entero de *BnC* y la Miotoxina I.

## **Nota Aclaratoria**

Parte de los resultados de este trabajo de tesis está basado en las investigaciones realizadas como autora y co-autora de las siguientes publicaciones:

- Characterization of a basic phospholipase A<sub>2</sub>-homologue myotoxin isolated from venom of the snake *Bothrops neuwiedii* (yará chica) from Argentina. Geoghegan, P.; Angulo, Y.; Cangelosi, A.; Diaz, M.; Lomonte, B.- *Toxicon* 37 (1999) 1735-1746.
- Comparative study of the cytolytic activity of myotoxic phospholipases A<sub>2</sub> on mouse endothelial (tEnd) and skeletal muscle (C2C12) cells *in vitro*. Lomonte, B.; Angulo, Y.; Rufini, S.; Cho, W.; Giglio, J.R.; Ohno, M; Daniele, J.J.; Geoghegan, P.; Gutierrez, J.M.- *Toxicon* 37 (1999) 145-158.

---

## RESUMEN

En Argentina más del 97% de los accidentes ponzoñosos son producidos por el género *Bothrops*, siendo el Complejo *Bothrops neuwiedi* una de las de mayor incidencia. El envenenamiento por esta especie es similar al descrito para otras especies *Bothrops* de América, presentando en el individuo accidentado daño tisular considerable: dolor, inflamación, edema, exudación, mionecrosis, problemas en la coagulación y hemorragias importantes.

Una proteína básica se aisló del veneno entero del Complejo *Bothrops neuwiedi* por cromatografía de intercambio iónico y RP-HPLC, la que se denominó Miotoxina I. Esta proteína provocó edema, miotoxicidad local cuando se la ensayó en ratones, citotoxicidad en cultivos celulares y alteración a nivel de la coagulación sanguínea, con potencia comparable al de otros venenos del género *Bothrops*.

Con el objeto de determinar en qué medida esta toxina era importante en el daño que provoca el veneno entero de *BnC* cuando se produce un accidente ofídico, se caracterizó la misma a nivel bioquímico determinando las siguientes actividades: letal, necrótica, hemorrágica, miotóxica, edematizante, desfibrinogénante, citotóxica y enzimática (fosfolipasa A<sub>2</sub>).

Al inyectar dosis de hasta 4,4 mg/ kg de peso de ratón por vía endovenosa, se observó que la toxina no era letal, a su vez no produjo necrosis ni hemorragia, como se observa cuando se inyecta el veneno *BnC* crudo, tampoco se detectó actividad fosfolipasa A<sub>2</sub> cuando se la ensayó sobre fosfolípidos de yema de huevo.

Sin embargo sí se observó un aumento de la enzima creatinina kinasa (CK) debido al daño producido en tejido muscular y de la enzima lactato deshidrogenasa (LDH) cuando se la inoculó a líneas celulares endoteliales (t-END) y mioblastos (C2C12) de ratón, observándose un daño en la monocapa celular a partir de las 3H de inoculada la toxina.

A nivel sanguíneo se pudo determinar que esta nueva toxina posee actividad anticoagulante en un porcentaje menor al que provoca el veneno entero cuando es inoculado.

Con el fin de determinar su peso molecular se realizó una electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecyl sulfato de sodio, donde se observó que la Miotoxina I de *BnC* aparecía, al colorear el gel, como un homodímero de 15 kD.

Al realizar una inmunodifusión en gel de agarosa, se observó que existe un patrón de identidad antigénica parcial entre esta nueva Miotoxina aislada y la Miotoxina II del veneno de la especie *Bothrops asper* de Costa Rica.

A su vez, se secuenció los primeros 40 residuos aminoacídicos de esta Miotoxina lo que demostró una alta homología con varias miotoxinas fosfolipasas A2 clase II, de la familia de las Lys-49, de crotálidos.

Estos resultados en conjunto sugieren que esta toxina es un nuevo miembro de las fosfolipasas A2 Lys-49, con actividades: miotóxica, citolítica e inflamatoria por inducción de edema y con actividad anticoagulante probablemente por el consumo de fibrinógeno en el torrente sanguíneo.



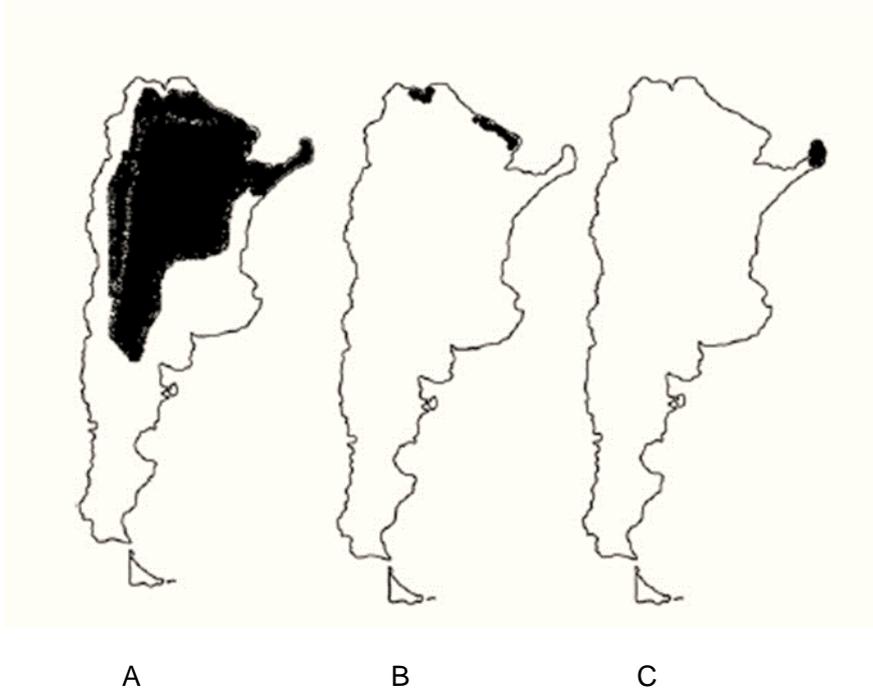
### **Importancia médica de los venenos de víboras**

Los emponzoñamientos por serpientes venenosas constituyen un problema de salud en todo el mundo y se caracterizan por una fisiopatología compleja. Estos accidentes afectan fundamentalmente a la población rural especialmente en las regiones tropicales y subtropicales, esto hace que los datos epidemiológicos sean generalmente escasos y no se pueda estimar la verdadera situación. (Gutierrez *et al.* 2006)

La Organización Mundial de la Salud (OMS) analiza, desde 1954, los datos de las muertes provocadas por mordeduras de serpiente en forma global. Se estima que existen aproximadamente entre 50.000 y 100.000 muertes anuales en el mundo por este caso, correspondiéndole a América Latina un 10% de los casos. (WHO 2010). Los accidentes ofídicos no siempre provocan la muerte del individuo, sino que pueden provocar una incapacidad permanente a la víctima debido a la severidad del daño tisular causado por el veneno de algunas especies. (Ministerio de Salud, 2014)

A pesar de existir otras familias de ofidios, la mayoría de los accidentes que ocurren en el hemisferio oeste se deben a la familia Viperidae, subfamilia Crotalinae. En América del Sur, esta subfamilia está representada por los géneros *Bothrops*, *Lachesis* y *Crotalus*. En Argentina, el 97% de los accidentes ponzoñosos son producidos por serpientes venenosas, mayoritariamente del género *Bothrops*. El complejo de *Bothrops neuwiedi* (BnC) está conformada por las especies *Bothrops diporus*, *Bothrops mattogrossensis* y *Bothrops neuwiedi neuwiedii*, siendo la especie *Bothrops diporus* la de mayor incidencia por su mayor distribución (Costa de Oliveira *et al.* 2011). Es un animal muy agresivo que se distribuye en una amplia zona geográfica de nuestro país, entre regiones frías, áridas y templadas, habita en el norte, centro y noreste argentino (Fig.1). Es conocida como “yarára chica”, su longitud alcanza entre los 70 - 130 cm y su

color varía entre claro a castaño más oscuro. Clínicamente, el envenenamiento por *BnC* es similar al descrito para otras especies *Bothrops* de América, con un daño tisular considerable (dolor, inflamación, edema, exudación, mionecrosis), problemas en la coagulación y hemorragias importantes.



**Figura 1-** Localización geográfica de distribución de las especies que conforma el complejo *Bothrops neuwiedi* de Argentina. (A) *Bothrops diporus*, (B) *Bothrops mattogrossensis*, (C) *Bothrops neuwiedi neuwiedii*. Hallazgos hasta el año 2014. (Ministerio de Salud,2014)

Los venenos de serpiente no son solamente una sustancia tóxica, por su composición son médicamente importantes desde un punto de vista básico, dado que los componentes biológicamente activos presentes en estas secreciones encierran un gran potencial como herramienta para el estudio y comprensión de su farmacología en los órganos blancos. Por ejemplo, los componentes neurotóxicos de los venenos han sido importantes en el estudio de la regulación de voltaje en los canales iónicos, liberación de neurotransmisores y en la estructura y función del receptor acetilcolínico. Muchas enzimas y péptidos provenientes de los venenos de víboras son empleados en la investigación en el campo de la coagulación, del diagnóstico y aplicaciones clínicas

(Duffon, 1993), como así también se han aislados numerosos componentes que tienen un gran potencial terapéutico, principalmente en el tratamiento de patologías de la trombosis y coagulación. Sin embargo, aún existen agentes y acciones por investigar en las secreciones tóxicas de las serpientes.

### **Serpientes venenosas y sus venenos**

Aproximadamente el 15% de las especies conocidas son venenosas y se pueden clasificar taxonómicamente de la siguiente manera:

- ❖ Familia: - *Elapidae* (Corales)
  - *Viperidae* (víboras)
    - Subfamilia *Crotalinae*
      - Género *Bothrops*
        - Especies: *Bothrops diporus*, *Bothrops mattogrossensis*, *Bothrops neuwiedi neuwiedii*, conformando el Complejo *Bothrops neuwiedi* (Silva 2008).

Los venenos de las serpientes son producidos por un par de glándulas exócrinas que se encuentran a ambos lados de la cabeza detrás de los ojos encapsuladas en una envoltura muscular. La composición de los mismos depende de la edad del animal y de su hábitat geográfico básicamente; estos son factores que determinan variaciones en la composición del veneno aunque se trate de ejemplares de la misma especie (WHO, 2010). Los venenos son una mezcla compleja de moléculas de diferente naturaleza química que causan múltiples manifestaciones clínicas; pudiendo ser tóxicos y no tóxicos, enzimáticos y no enzimáticos. Tal es así que se han detectado por distintas técnicas, a lo largo del tiempo, desde la electroforesis capilar, hasta la proteómica, más de 100 componentes en un solo veneno (Perkins *et al.* 1993; Calvete *et al.* 2009). La caracterización de sus componentes incluyen proteínas y péptidos que poseen una amplia variedad de acciones farmacológicas y tóxicas.

Históricamente, los venenos han sido clasificados del acuerdo a su principal actividad farmacológica, como neurotóxicos, hemohistotóxicos (hemorrágicos) y mixtos.

Sin embargo, esta clasificación, es demasiado simple y no parece abarcar la complejidad de las acciones de los mismos y su heterogeneidad entre especies de la misma familia.

Las diferentes actividades de los venenos pueden ser atribuidas a algún componente o toxina en particular, aunque es posible que estas diferentes toxinas actúen en forma sinérgica induciendo una mayor actividad conjuntamente que si actuaran en forma independiente.

### **Daño tisular localizado inducido por acción de los venenos**

Los venenos de muchas especies de ofidios pueden causar, además de los efectos tóxicos sistémicos, alteraciones en el sitio de inoculación ocasionando daño del tejido local. Los efectos locales que producen los venenos pueden ser clásicamente definidos como hemorragia, mionecrosis, citotoxicidad y edema (Warrell, 2004; Cardoso *et al.* 2009; Gutierrez, 2016), la magnitud de los mismos dependen del tipo de veneno (vía y dosis inoculada) y del individuo (estado, sexo y edad). En los casos más severos, el tejido dañado puede quedar con importantes secuelas como pérdida de tejido permanente, incapacidad o amputación (Rosenfeld, 1971; Ho et al.1986b; Kerrigan, 1991; Nishioka & Silveira, 1992 Gutierrez, 2006) (Fig.2).





**Figura 2.**- Accidente ofídico por la especie *BnC*. Se evidencia edema e inflamación de mano, hemorragia y necrosis de miembros.

El reconocimiento de la importancia clínica del daño tisular provocado por los emponzoñamientos ha motivado un incremento en el estudio de su patogénesis. Por otro lado, la acción de las toxinas puede revelar mecanismos en células y tejidos lesionados comunes a otras patologías. Para poder estudiar estos eventos, se han aislado toxinas específicas de los venenos responsables de la injuria tisular. Así se han aislado y caracterizado numerosas proteínas, de acuerdo a su estructura y a su bioquímica. Sin embargo, no son pocos los estudios realizados “*in vivo*” para determinar su mecanismo de acción y patogenia. Por ejemplo, más de 50 toxinas de venenos, capaces de inducir hemorragia, fueron aisladas y caracterizadas, han sido estudiadas observando la patogénesis de la acción hemorrágica en modelos animales (Ownby, 1990, Gay 2005).

Aunque el estudio de los componentes aislados es importante en el análisis de las acciones de los venenos, los efectos inducidos por el veneno entero puede ser el

resultado de los efectos sinérgicos de dos o más componentes, por lo tanto, la inducción de un efecto dado por parte de un componente aislado no necesariamente informa a cerca de su relativa contribución o importancia en el contexto de las acciones del veneno crudo.

Se han aislado un número importante de toxinas que provocan daño tisular, las que podemos clasificar en tres tipos según el daño que provoquen en el tejido:

**a. Toxinas hemorrágicas (Hemorraginas)**

**b. Miotoxinas**

**c. Toxinas inductoras de edema**

**a. Hemorraginas**

Muchas toxinas capaces de inducir hemorragia en el sitio de inoculación o en sitios a distancia han sido purificadas de los venenos de crotálicos y vipéridos (Bjarnason and Fox,1988). Todas estas toxinas son proteínas y tienen distinto grado de actividad proteolítica *in vitro* sobre sustratos tales como la gelatina, caseína y hemoglobina.

La caracterización bioquímica de estas enzimas ha demostrado que son metaloproteínas dependientes del zinc y se las puede clasificar en tres grupos de acuerdo a sus pesos moleculares y a dominios que poseen: pequeñas (~25kD), medianas (30-60kD) y grandes (60-90kD) estas últimas tienen mayor actividad *in vivo* (Bjarnason and Fox,1994). La relación entre su actividad proteolítica y el mecanismo de hemorragia, fue materia de discusión por largo tiempo debido a distintos factores. Inicialmente, algunas toxinas fueron descritas como carentes de actividad proteolítica. Esta discrepancia aparente se debió a la ausencia de sensibilidad de los sustratos y a las condiciones sub-óptimas del ensayo y por otro lado, a la carencia de correlación

entre la actividad hemorrágica *in vivo* y la actividad proteolítica *in vitro* cuando se usan sustratos comunes. No obstante, otros trabajos demostraron una mejor correlación entre la actividad biológica y enzimática de las toxinas usando sustratos más específicos y adecuados como los componentes de la lámina basal de los tejidos (colágeno). Se han reportado varios estudios histopatológicos del daño del endotelio capilar por hemorraginas purificadas en los que se han confirmado que la lámina basal de los capilares es frecuentemente destruida (Ownby *et al.* 1978, 1979; Ownby & Geren 1987; Moreira *et al.* 1994, Gutierrez *et al.* 2016).

Se ha encontrado *in vivo* que el efecto de las hemorraginas sobre las células endoteliales es muy rápido, provoca cambios morfológicos degenerativos que pueden llegar a la destrucción celular o agujeros en las células. La observación de este fenómeno sugiere la posibilidad de que las toxinas hemorrágicas puedan tener una acción directa sobre las células endoteliales (Gutierrez & Lomonte, 1989). Las alteraciones de las células endoteliales pueden ser una consecuencia indirecta de la degradación proteolítica de la matriz extracelular que la rodea. Existe evidencia de que el efecto hemorrágico se produciría por la unión de las hemorraginas a la lámina basal de los vasos y por su acción proteolítica, desestabilizaría la integridad de la estructura de los vasos escindiendo, de manera altamente selectiva, los enlaces peptídicos clave de los componentes de la membrana basal, afectando de este modo la interacción entre la membrana basal y las células endoteliales. Como consecuencia, estas células experimentan una serie de alteraciones morfológicas y funcionales *in vivo*, ocasionando colapso de los capilares y extravasación (Gutierrez, 2000).

Se han desarrollado varios métodos para la cuantificación de la actividad biológica de las hemorraginas (Bjarnason & Fox, 1988); el más utilizado es el ensayo de Kondo (Kondo *et al.* 1960) que utiliza la inoculación intradérmica, en conejos, de distintas concentraciones de la sustancia a ensayar y luego la medición del área de hemorragia

que se genera en la parte interna de la piel disecada. Algunos utilizan el ensayo de Kondo modificado utilizando ratas o ratones (Theakston & Reid 1983; WHO 2010, 2016). La potencia o actividad se expresa como la “Dosis Mínima Hemorrágica” (DMH), que se define como la cantidad de toxina que induce un área hemorrágica de 10 mm de diámetro, en un tiempo de 2 hasta 24 horas, dependiendo de los distintos experimentos.

**b. Miotoxinas**

Estas son toxinas que abundan en algunos venenos ofídicos e inducen necrosis del músculo esquelético, las cuales contribuyen a digerir la presa y causan un significativo daño al tejido en los accidentes por envenenamiento en humanos (Mebs *et al.*1983; Harris & Cullen,1990). Las toxinas que provocan el daño muscular han sido clasificadas en cuatro grupos de acuerdo a las diferentes características señaladas en la Tabla 1.

Tabla 1. **Clasificación de las miotoxinas** (Angulo, 2005)

Grupo	Características	
b.1. Miotoxinas pequeñas	Proteínas básicas, sin actividad enzimática. Formada por cadena simple peptídica de no más de 45 aminoácidos (aa).	
b.2. Cardiotoxinas	Proteínas básicas, sin actividad enzimática. Formada por cadena simple peptídica de aproximadamente 60 aminoácidos.	
b.3. Miotoxinas con actividad fosfolipasa A <sub>2</sub> (PLA <sub>2</sub> )	Neurotóxica	Proteínas básicas, simple cadena de péptidos (aproximadamente 120 aa) o complejo de proteínas con actividad PLA <sub>2</sub> . Pueden ser desde monómeros hasta tetrameros unidos covalentemente o no. Denominadas D49
	No Neurotóxica	Proteínas básicas, simple cadena de péptidos (aproximadamente 120aa) o dímeros con estructura PLA <sub>2</sub> . <ul style="list-style-type: none"> <li>• Enzimáticamente activa PLA<sub>2</sub> Asp-49.</li> <li>• Enzimáticamente inactiva PLA<sub>2</sub> Lys-49.</li> </ul>
b.4. Factores miotóxicos	Existen otros factores miotóxicos que pueden dañar el músculo esquelético por otros mecanismos provocando isquemia.	

*b.1. Miotoxinas pequeñas*

El grupo de las miotoxinas pequeñas, está formado por proteínas básicas con 42-45 residuos aminoacídicos sin actividad enzimática conocida. La carga positiva de los aminoácidos, juega un papel central en el mecanismo de reconocimiento celular. Algunas de estas miotoxinas han sido aisladas, como por ejemplo la crotamina de *Crotalus durissius terrificus*, víbora de cascabel (Laure, 1975). La inoculación de estas toxinas en ratones es causante de postración inmediata, contractura de los miembros posteriores y distress respiratorio. Estudios histopatológicos del músculo esquelético, muestran formación de vacuolas (dilatación del retículo sarcoplásmico y del espacio perinuclear) progresando a necrosis muscular 48 horas después de la inoculación. Otro tipo de células, como fibroblastos y células endoteliales, no son afectadas (Ownby, 1990; Mebs & Ownby, 1990). A pesar de su potente acción *in vivo* (Baker *et al.*1993; Bruses *et al.*, 1993), estas miotoxinas no son precursoras de la citólisis de las células musculares. El mecanismo de acción aún no se ha establecido, pero se sugiere que actuarían sobre los canales de Na<sup>+</sup> incrementando la permeabilidad de membrana para ese ion. Esta acción permite la afluencia de Na<sup>+</sup> y de agua que causa un aumento del retículo sarcoplásmico y eventualmente necrosis de la célula muscular (Mebs & Ownby, 1990).

Otros investigadores proponen que las miotoxinas actuarían directamente sobre la enzima Ca-ATPasa del retículo sarcoplásmico (Volpe *et al.*, 1986). Estudios *in vitro* e *in vivo* usando péptidos sintéticos y fragmentos de miotoxina sugieren que la región amino y carboxilo terminal de la proteína participan en la acción del daño muscular (Baker *et al.*1991).

### *b.2. Cardiotoxinas*

Las cardiotoxinas, también llamadas citotoxinas, son proteínas de 60–62 residuos aminoacídicos sin actividad enzimática estructuralmente homólogas a neurotoxinas post-sináptica o  $\alpha$ -neurotoxinas. Estas proteínas activas de membrana se han encontrado en algunos venenos elapídicos. Se las denomina cardiotoxinas por la habilidad que tienen estos componentes de causar alteraciones cardíacas *in vitro* e *in vivo* (Harris & Cullen 1990). Estudios con estas toxinas han revelado mionecrosis con ruptura de la membrana plasmática en el área de la lesión y condensación de las miofibras en grumos densos, alternados con zonas claras conteniendo algunos elementos del sistema sarcotubular y mitocondrial dañado (Ownby *et al.*1993).

### *b.3. Miotoxinas Fosfolipasa A<sub>2</sub>*

Las miotoxinas fosfolipasa A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) han sido aisladas de venenos de numerosas víboras de las familias Elapidae, Crotalidae y Viperidae. Estas se pueden dividir en dos grupos, como se indicó en la Tabla 1:

*b.3.1. Neurotoxinas, miotoxinas con alta actividad PLA<sub>2</sub> pre-sináptica*

*b.3.2. No-neurotoxinas, miotoxinas con baja actividad PLA<sub>2</sub> (Mebs & Ownby, 1990)*

#### *b.3.1. Neurotoxinas, miotoxinas con alta actividad PLA<sub>2</sub> pre-sináptica*

Algunas miotoxinas de este grupo, entre ellas la crotoxina del veneno de *Crotalus durissius terrificus*, han sido muy bien caracterizadas. Además de tener una potente acción pre-sináptica, que explica su alta actividad letal, estas toxinas inducen un gran daño en músculo esquelético. Sin embargo, es importante hacer notar que la acción fosfolipásica pre-sináptica no siempre es miotóxica, ejemplo de esto es la  $\beta$ -bungarotoxina (Mebs & Ownby, 1990; Mora-Obando, 2014).

Morfológicamente, el daño muscular inducido por ambos grupos de PLA<sub>2</sub> (neurotóxica y no neurotóxica) es similar con una rápida degeneración de las fibras musculares, la que es evidente entre los 30 minutos y 3 horas luego de la inoculación. Por lo general, estas miotoxinas no son citolíticas. Las alteraciones tempranas son hipercontracción de sarcómeros y la aparición de lesiones en membrana. Las mitocondrias muestran signos de daño como hinchazón y luego ruptura, provocando la liberación de enzimas que se detectan rápidamente en plasma sanguíneo, siendo la enzima creatinina kinasa (CK) la más importante. El proceso degenerativo va acompañado por edema e infiltración de células fagocíticas, pero no con hemorragia. Entre las 12 y 24 horas se observan las fibras musculares totalmente destruidas con apariencia amorfa e hialina. La lámina basal se preserva a lo largo de todo este proceso así como la microvasculatura y células satélites que se encuentran entre la membrana basal y la membrana plasmática de las fibras musculares (Harris & Cullen, 1990; Mebs & Ownby, 1990). Las células satélites serían en condiciones adecuadas las responsables de la formación de mioblastos, miotubos y la eventual regeneración del músculo esquelético luego de la necrosis.

El mecanismo por el cual las PLA<sub>2</sub>S inducen la necrosis de las células musculares se debe a una serie de drásticos eventos degenerativos que probablemente se inicien en la membrana plasmática y culminan con necrosis selectiva de músculo esquelético. Se supone que el efecto miotóxico es provocado por interacción electrostática con la membrana y posterior penetración de la bicapa. Los efectos causados por PLA<sub>2</sub> inducen a desestabilización de la membrana, con pérdida selectiva de la permeabilidad a iones Ca<sup>2+</sup> mediadores importantes en el proceso de necrosis muscular (Gutiérrez & Lomonte, 1995; Mora-Obando, 2014). En muchos casos, las modificaciones químicas de aminoácidos específicos han provocado la disociación de la actividad catalítica de la farmacológica. Esto sugiere que la miotoxicidad, como otras acciones tóxicas, puede ser mediada parcialmente por mecanismos no enzimáticos, contrario a lo que originalmente se postuló que sostenía que los efectos tóxicos serían causados por la

actividad enzimática (Lomonte, 1994; Angulo, 2005). Además de la miotoxicidad y la neurotoxicidad, otra potente acción biológica que tienen algunas fosfolipasas A<sub>2</sub> es el efecto anticoagulante (Kini & Evans, 1987; Valeriano-Zapana, 2012).

### b.3.2. No-neurotoxinas, miotoxinas PLA<sub>2</sub> con baja actividad

Este grupo incluye un número de enzimas aisladas, principalmente, de venenos de víboras de la familia Crotalidae y Viperidae. Se han caracterizado miotoxinas PLA<sub>2</sub>S aisladas del género *Bothrops* spp., *Agkistrodon* spp., y *Trimeresurus* spp. En éstas, la ausencia de neurotoxicidad se refleja por la baja actividad letal, que más bien es atribuída a la mioglobinuria y al daño renal (Mebs & Ownby, 1990). Los rasgos morfológicos del daño muscular, causado por estas toxinas son similares a los observados a las neurotoxinas con actividad PLA<sub>2</sub>, sin embargo hay diferencias notables con estas en el modo que provocan el daño muscular. Primero, algunas de las miotoxinas de este grupo, a diferencia de miotoxinas PLA<sub>2</sub> neurotóxicas, son directamente citotóxicas en células musculares *in vitro* por su acción proteolítica (Brusés *et al.*1993; Bultron *et al.*1993b; Lomonte, 1994). En segundo lugar, en este grupo se han aislado un número importante de variantes naturales de estas toxinas (isoformas), que teniendo claramente una estructura de PLA<sub>2</sub> son incapaces de hidrolizar fosfolípidos debido a cambios de residuos aminoácidos que son esenciales para el mecanismo catalítico. Debido a que estas isoformas aún conservan la capacidad de dañar el músculo, es claro que algunas de las miotoxinas PLA<sub>2</sub> no neurotóxicas pueden inducir mionecrosis sin la necesidad de la actividad enzimática. De esta manera existe la posibilidad que algunas de las miotoxinas no neurotóxicas puedan utilizar mecanismos de acción miotóxicos diferentes.

La primer miotoxina aislada con estructura de PLA<sub>2</sub> y sin actividad enzimática es la miotoxina de *Bothrops nummifer* (Gutierrez *et al.*, 1986<sup>a</sup>; 1989). Otros ejemplos de este tipo de miotoxinas son la bothropstoxin I de *Bothrops jararacussú* (Honsi-Brandeburgo

*et al.*, 1988; Cintra *et al.*, 1993), miotoxina II de *Bothrops asper* (Lomonte & Gutierrez, 1989), proteína básica I y II de *Trimeresurus flavoviridis* (Yoshizumi *et al.*, 1990; Kihara *et al.*, 1992), L- ammodytoxin de *Vipera ammodytes* (Krizaj *et al.*, 1991) y la miotoxina de *Agkistrodon contortrix laticinctus* (Johnson & Ownby, 1993). A excepción de la L- ammodytoxin, en la que una serina reemplaza al aspartato (Asp) conservado en la posición 49, todas las otras miotoxinas enzimáticamente inactivas tienen en esa posición 49 una lisina (Lys) y comúnmente se las denomina PLA<sub>2</sub> Lys-49.

Aunque se ha descrito que algunas PLA<sub>2</sub> Lys-49 presentan actividad enzimática, por debajo de 0.1- 1.5% con respecto a las PLA<sub>2</sub> Asp-49, se cree que estas son incapaces de realizar catálisis enzimática. Estudios en los que se ha reemplazado el Asp-49 por la Lys-49 resultaron en la ausencia de actividad enzimática (van den Bergh *et al.* 1989). Por lo cual la baja actividad enzimática PLA<sub>2</sub> encontrada en las toxinas Lys-49 probablemente se deba a trazas contaminantes de las isoformas enzimáticamente activas (ej. Asp-49) que son difíciles de separar (van den Bergh *et al.* 1989; Scott *et al.* 1992, Mora-Obando, 2014).

El mecanismo de acción de este grupo de miotoxinas PLA<sub>2</sub> no neurotóxicas, estaría dado por la acción primaria sobre la membrana plasmática de las fibras musculares. Esta premisa se basa en las siguientes evidencias: (1) la observación de la ruptura de membrana, o discontinuidad de ésta, en las fibras musculares afectadas, (2) el incremento de la concentración de Ca<sup>2+</sup> intracelular en el tejido muscular afectado, (3) la inmunodetección *in vitro* de miotoxinas en la membrana plasmática de las células musculares, (4) la habilidad de las miotoxinas de romper distintos tipos de liposomas y (5) la ausencia del efecto inhibitorio de agentes bloqueantes de endocitosis en el daño citolítico inducido por las miotoxinas *in vitro* (Gutierrez *et al.* 1984, 1989; Johnson & Ownby, 1993; Diaz *et al.* 1991; Bultron *et al.* 1993; Fernandes, 2014).

Contrario a la hipótesis inicial, en la que el daño muscular fue atribuido a la hidrólisis enzimática de los fosfolípidos de membrana, resulta claro que la actividad de éstas miotoxinas sobre las membranas se lleva a cabo sin el requerimiento de la actividad PLA<sub>2</sub>. Esto ha sido demostrado por la habilidad de las variantes Lys-49 o Ser-49 para causar mionecrosis y romper liposomas, además de los estudios de neutralización realizados con anticuerpos que inhiben la acción miotóxica (Lomonte *et al.*1992) o que conservan la actividad miotóxica luego de inhibir la actividad PLA<sub>2</sub> y por la capacidad de las miotoxinas, enzimáticamente activas, para dañar el músculo *in vitro* bajo condiciones inhibitorias de la actividad enzimática (Gutierrez *et al.*1986; Bultron *et al.*1993; Fernandes,2014).

En algunas de estas enzimas la actividad PLA<sub>2</sub> no está involucrada en el daño de la membrana, varias observaciones indican que la actividad PLA<sub>2</sub> podría aumentar el rol de algunas de estas miotoxinas; por ejemplo se sabe que la miotoxina I de *B.asper*, enzimáticamente activa, es 2 ó 3 veces más potente induciendo la mionecrosis y destruyendo los liposomas comparada con la miotoxina II enzimáticamente inactiva (Diaz *et al.* 1991). Además, cuando la actividad PLA<sub>2</sub> de la miotoxina I es inhibida *in vitro* por EDTA, quelante del ión Ca<sup>2+</sup>, la ruptura de los liposomas disminuye y comienza a comportarse como la miotoxina II, que no es afectada por el EDTA. Por otro lado, en el caso de la PLA<sub>2</sub> de la especie *Trimeresurus flavoviridis* se ha descrito que la miotoxina Lys-49 es dos veces más potente que la miotoxina Asp-49 indicando que las observaciones hechas con la miotoxina de *B.asper*, respecto al rol de la actividad PLA<sub>2</sub>, no pueden extrapolarse a todas las miotoxinas del grupo. A pesar de los avances y entendiendo el modo de acción de este grupo de miotoxinas el sitio receptor en la membrana aún no es conocido (Gutierrez, 1995).

Además de su acción miotóxica, varias PLA<sub>2</sub> inducen edema aún en ausencia de la

actividad PLA<sub>2</sub> (Gutierrez *et al.*1986; Selistre *et al.*1990) y cuando la actividad PLA<sub>2</sub> está presente estas miotoxinas, al igual que varias otras PLA<sub>2</sub>s, tienen un potente efecto anticoagulante *in vitro*, prolongando el tiempo de coagulación del plasma (Gutierrez *et al.* 1986; Díaz *et al.* 1991).

#### *b.4. Factores miotóxicos indirectos*

Los tres grupos de miotoxinas mencionados anteriormente, actúan directamente sobre la fibra muscular induciendo la degeneración de la misma y necrosis. A diferencia de estos, este cuarto grupo incluye toxinas que pueden inducir daño muscular local, no por una vía directa sino como consecuencia secundaria del daño generado a la microvasculatura, de la alteración del flujo sanguíneo y del desarrollo de isquemia. Por esos motivos, este grupo incluye algunas toxinas hemorrágicas que se han reportado como inductoras del daño muscular.

La mionecrosis observada después de la inoculación de algunas toxinas hemorrágicas, se desarrolla más lentamente que la causada por miotoxinas propiamente dichas. La morfología de las fibras musculares dañadas por toxinas hemorrágicas tiene una apariencia hialina, también definida como necrosis “coagulativa” en oposición a la apariencia “miolítica” descrita con anterioridad (Quiroz *et al* 1985). Otra observación importante es que estas toxinas son la causa del daño extensivo en los vasos sanguíneos en aparente ausencia de la necrosis del músculo esquelético (Salistre *et al.*1990). Esto sugiere que factores adicionales, además del daño de la microvasculatura, serían necesarios para provocar la injuria en el músculo inducida por algunas toxinas hemorrágicas. Teóricamente, entre estos posibles factores se encuentran la inducción del edema, con la consecuente compresión del tejido y la acción isquémica, el efecto de los componentes sobre la coagulación y sobre las plaquetas, que son críticos en los disturbios del flujo sanguíneo.

Existen varios métodos disponibles, *in vivo* e *in vitro*, para la evaluación de la actividad miotóxica de venenos y de toxinas. Una de las técnicas más simples es la cuantificación de la actividad necrosante de los venenos, basada en la inyección intradérmica del veneno y la medición de la lesión en la piel luego de las 72 horas. Sin embargo, este ensayo no evalúa la mionecrosis y no está claro qué tipo de componentes de los venenos es posible detectar (Theakston & Reid 1983). El análisis histológico del tejido muscular inyectado, es sin duda el método de referencia y también puede ser cuantificado (Ownby *et al.* 1982; Preston *et al.* 1990).

El estudio histológico cuantitativo es laborioso y requiere de equipamiento adecuado, por lo que en muchos estudios la evaluación histológica se usa de manera cualitativa. Como alternativa se han utilizado métodos donde se evalúa la liberación de marcadores bioquímicos del daño muscular. Estos incluyen la cuantificación de enzimas intracelulares específicas liberadas luego de la injuria celular ya sea por el incremento de su actividad en el plasma o por la disminución intracelular de las mismas en el tejido muscular afectado. Entre estas enzimas, la CK es la más evaluada. Esta enzima tiene tres isoformas electroforéticamente distintas, MM, MB, y BB las cuales se expresan en músculo esquelético, en músculo cardíaco y en sistema nervioso central, respectivamente. Cuando se quiere cuantificar la CK total, en el estudio del daño del músculo esquelético inducido por el veneno o toxina, es importante verificar el aumento de la isoenzima CK-MM. A si mismo los parámetros farmacocinéticos, tal como la distribución y vida media de la enzima en plasma, pueden influenciar significativamente los resultados, por lo tanto es importante seleccionar un tiempo óptimo de muestreo para estas determinaciones (Gutierrez *et al.*1980; Ownby *et al.*1982). Se ha demostrado que el pico máximo de liberación de la CK en plasma luego de la mionecrosis, ya sea inducida por miotoxinas PLA<sub>2</sub> no neurotóxicas o por el veneno crudo, ocurre entre la primera y tercer hora luego de la inoculación, posteriormente declina rápidamente (Gutierrez *et al.*1984; 1991; Lomonte and Gutierrez, 1989; Díaz *et al.* 1992).

El uso de la CK u otro marcador enzimático, como estimador de la necrosis muscular, puede no ser el apropiado para algunos tipos de toxinas que provocan daño muscular por un mecanismo citopático diferente. Por ejemplo, en el caso del veneno de *Notechis scutatus*, que contiene una PLA<sub>2</sub> neurotóxica presináptica, no se observó una buena correlación entre el daño muscular y el nivel de CK en plasma (Preston *et al.*1990); pero esto pudo deberse a que la correlación se analizó a las 24 horas, cuando los niveles de CK plasmáticos ya disminuían.

Sin embargo, con el grupo de las miotoxinas PLA<sub>2</sub> no neurotóxicas hay una muy buena correlación entre la cantidad de veneno inyectado y el incremento de la CK en plasma. Esto puede ser reflejo del tipo de mecanismo utilizado por tales miotoxinas, las cuales presentan alguna sutil diferencia con respecto a las PLA<sub>2</sub>s neurotóxicas y diferencias mayores con las miotoxinas pequeñas.

Preparaciones *ex vivo*, del músculo gastrocnemio del ratón ha sido también utilizado en la determinación de la actividad miotóxica midiendo la liberación de la CK como marcador del daño celular (Gutierrez *et al.*1986). Algunas ventajas de este sistema *ex vivo* sobre el sistema *in vivo* son la no influencia de la distribución de la enzima y su vida media, la posibilidad de controlar las variables en solución y la reducción del uso de animales a la mitad si se utilizan los músculos de ambas extremidades de un animal. (Lomonte, 1994).

Para algunos tipos de toxinas, los cultivos celulares *in vitro* de mioblastos de músculo esquelético, miotúbos u otros tipos celulares, pueden ser potencialmente usados como modelos para medir la actividad miotóxica, al menos para algunos tipos de miotoxinas. De existir una buena correlación entre el sistema de cultivos celulares y el sistema *in vivo* se podría sustituir el uso de animales para el estudio de las miotoxinas y su

neutralización por anticuerpos.

**b. Toxinas inductoras de edema**

Muchos tipos de venenos contienen potentes factores inflamatorios que inducen edema de manera rápida y drástica. Una consecuencia importante del edema es la compresión del tejido y como resultado aumenta la isquemia en el sitio de la mordedura contribuyendo al desarrollo del daño local en el tejido. Además de las consecuencias locales, un edema de considerable magnitud contribuirá a los efectos hipotensores e hipovolémicos del veneno que conducen al shock cardiovascular.

Los componentes de los venenos que inducen edema son bioquímicamente heterogéneos y pueden ser desde aminas como la histamina hasta pequeños péptidos o proteínas del tipo PLA<sub>2</sub> metaloproteasas y serinoproteasa, (Mamede, 2016).

La mayoría de los componentes de los venenos que inducen edema probablemente promueven indirectamente, inflamación ya sea liberando o induciendo la producción de autacoides. Los estados más avanzados del edema son inducidos por distintos mediadores, incluyendo bradiquinina, prostaglandinas y leucotrienos, actuando de manera interrelacionada. La bradiquinina, puede ser generada en respuesta al veneno, es un potente hipotensor, induce dolor y aumenta la permeabilidad microvascular. Las prostaglandinas y leucotrienos, inducidos por algunos venenos, median la dilatación y prolongan la fase de permeabilidad vascular aumentada (Mebs,1990, Mamede,2016).

Todo esto sugiere que el edema inducido por los venenos de víboras tiene un origen multifactorial, con lo cual no hay una droga o un simple inhibidor, que pueda contrarrestar este efecto (Bonta *et al.*1979; Trebien & Calixto, 1989). La diversidad de mecanismos que participan en la inducción y el mantenimiento del edema se observa incluso a nivel de componentes de una sola toxina (Chen *et al.*1990; Wang *et al.*1991).

Estudios con toxinas purificadas han mostrado baja actividad edematizante en comparación con el veneno crudo.

Algunos de los varios mecanismos descritos en la inducción del edema por los componentes purificados de los venenos son: desgranulación de mastocitos con liberación de histamina y serotonina (Wang & Teng, 1990), atracción de neutrófilos polimorfonucleares (Wang *et al.*1991), producción de prostaglandinas y leucotrienos (LTB<sub>4</sub>) en mastocitos, liberación de bradiquinina, liberación de péptidos vasoactivos diferentes a la bradiquinina, potenciación de la bradiquinina por péptidos inhibidores de la enzima convertidora de la angiotensina (Ferreira *et al.* 1992) y liberación de sustancias de reacción lenta, identificadas como LTC<sub>4</sub> y sus metabolitos LTD<sub>4</sub> y LTE<sub>4</sub> (Lam & Austen, 1992).

Se ha observado, que los antivenenos utilizados comúnmente para la terapia de las mordeduras muestran una eficacia limitada en la neutralización de la actividad edematizante inducida por los venenos (Gutiérrez *et al.*1981; Rojas *et al.*1987), lo que sugiere hacer más estudios combinando diferentes drogas para llegar a neutralizar la actividad edematizante. Experimentalmente, la cuantificación del edema se realiza inyectando el veneno, o alguno de sus componentes, en la pata de ratas o ratones y observando el peso, volumen, espesor o inflamación de la misma (Ponce-Soto, 2007).

### **Envenamiento por *Bothrops* (“Yarará”)**

El veneno de “*yarará*”, debido a su composición, posee acciones fundamentales: proteolítica, necrótica, hemolítica y alteraciones en la coagulación. La acción necrótica se debe a la presencia de distintas enzimas como: proteasas, PLA<sub>2</sub>, nucleasas y otras sustancias tales como L-aminoácido-oxidasa, hialuronidasa y factores liberadores de histamina, bradiquinina, etc. Todas estas enzimas actúan produciendo un daño celular con inflamación que se traduce por una necrosis localizada en el sitio de la mordedura.

Otra alteración que provoca el veneno de *Bothrops* es sobre la coagulación, la presencia de enzimas, como las proteasas séricas, tienen efecto “trombin-like” consumiendo el fibrinógeno, el masivo consumo de éste lleva a hemorragias generalizada (Mackessy, 2010).

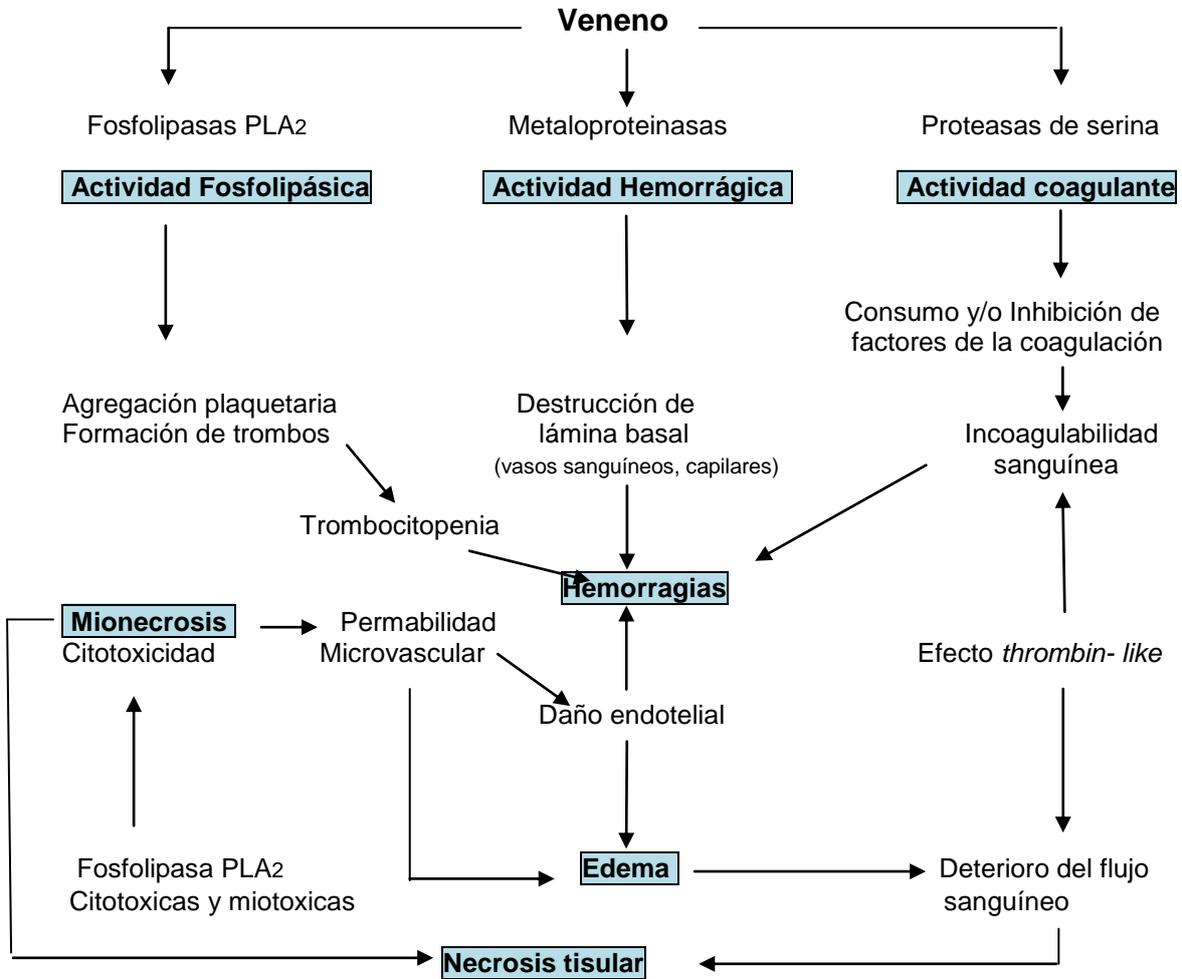
El envenenamiento botrópico se trata de un síndrome hemohistotóxico con tendencia a la coagulación intra o extravascular, caracterizada por presentar inflamación local, edema y necrosis del tejido conectivo y muscular, y efectos sistémicos como hemorragias, desfibrinogénación y trombocitopenia, pudiendo llegar a hasta una complicación renal grave que provoque la muerte (Gutiérrez, 1989; Mandelbaum, 1989; Gutiérrez,1990; Kaiser,1971). La patogénesis de estas alteraciones es bastante compleja, y es inducida por diferentes toxinas presentes en el veneno, como las miotoxinas, que afectan las fibras musculares (Gutiérrez, 1980; Gutiérrez,1984; Queiroz,1984.), las metalo-hemorráginas, que alteran la microvasculatura local y sistémica (Mandelbaum,1984) y otras sustancias inductoras de edema que incrementan la presión tisular local (Chavez, 1995). El daño del tejido local puede complicarse por infecciones bacterianas y por el desarrollo del síndrome compartimental (Warrell, 1993).

Algunos estudios han reportado el aislamiento y la caracterización de componentes del veneno del complejo *Bothrops neuwiedi* responsables de los efectos tóxicos específicos. Entre ellos dos toxinas hemorrágicas (Mandelbaum, 1984; Queiroz, 1985) y un activador de protrombina. Asimismo, a partir de este veneno se ha purificado una PLA<sub>2</sub> ácida con actividad citotóxica *in vitro* y efecto edemático demostrado *in vivo* (Daniele, 1995; 1997).

El efecto mionecrótico inducido por este veneno es atribuible a la acción de miotoxinas con estructura de PLA<sub>2</sub> clase II (Gutiérrez, 1997). Se ha demostrado que algunos de sus componentes están antigénicamente relacionados con miotoxinas aisladas del

veneno de *Bothrops jararacussú* (Moura-da-Silva, 1990) de Brasil y del veneno de *Bothrops asper* (Lomonte, 1990) de Costa Rica.

**Mecanismo de acción del veneno de “yará”**



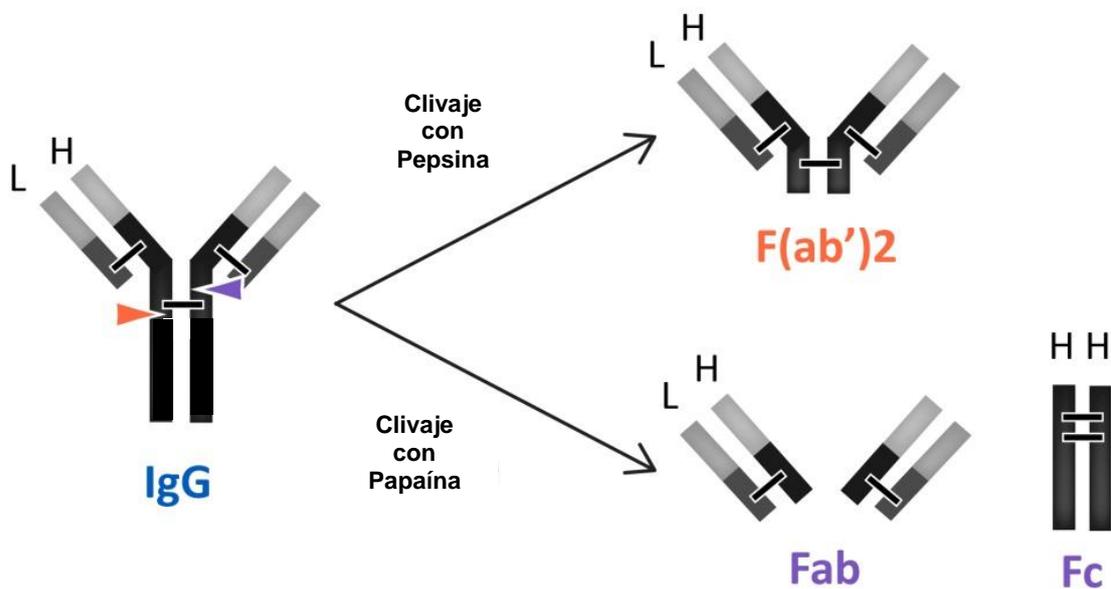
**Figura 3.-** Esquema simplificado de los eventos que ocurren en la inflamación y daño tisular inducida por el veneno del género *Bothrops*

El tratamiento sistémico del envenenamiento, luego de una mordedura, se realiza mediante la administración del antiveneno específico que es una preparación de inmunoglobulinas heterólogas contra la especie que provocó el accidente.

Los antivenenos son producidos a partir del plasma de animales hiperinmunizados, con el veneno específico, generalmente equinos. Cuando el nivel de anticuerpos ha

alcanzado un título suficiente como para neutralizar el efecto letal del veneno se extrae el plasma que es procesado hasta obtener una preparación purificada de inmunoglobulinas séricas.

El grado de purificación depende de los laboratorios productores, algunos pueden producir antivenenos sin digerir, o sea IgG total, o digerido obteniendo de esta forma los fragmentos  $F(ab')_2$  o Fab, según el tratamiento enzimático que se utilice, pepsina o papaína respectivamente (Fig.4).



**Figura 4.** Representación esquemática de la estructura básica de IgG. Fragmentos de inmunoglobulina IgG obtenidos por la acción enzimática de la pepsina y la papaína. "H" cadena pesada y "L" cadena liviana de la inmunoglobulina. (Ministerio de Salud, 2011)

Para obtener un antiveneno con alta capacidad neutralizante sobre los efectos del envenenamiento, es conveniente contar con un veneno de alta calidad para la hiperinmunización. El veneno utilizado para tal fin debe ser representativo de la región donde ocurren los accidentes ofídicos. Para esto, se realiza una mezcla de venenos de la misma especie, recolectados a partir de diferentes ejemplares, de distinta edad y sexo pertenecientes a la zona geográfica donde van a ser utilizados los antivenenos (WHO, 1990; WHO, 2010).

Los antivenenos pueden ser monovalentes, preparados con el veneno de una sola especie, o polivalentes, preparados con una mezcla de venenos. No todos los accidentes ofídicos requieren del uso indiscriminado de antiveneno, esto depende de la especie agresora y de la cantidad de veneno inyectado. Para especies altamente venenosas, el uso de un antiveneno de alta calidad es fundamental para el tratamiento clínico.

Los antivenenos son cuidadosamente controlados determinando la potencia contra la acción letal del veneno. Aunque, también puede determinarse el poder neutralizante de las toxinas que provocan las acciones del veneno, como las fosfolipasas miotóxicas y las metaloproteinasas hemorrágicas (Lomonte, 2009). Dada la complejidad de la composición del veneno, además de la variabilidad de la respuesta inmune en animales genéticamente distintos, los antivenenos probablemente no produzcan la misma cantidad de anticuerpos contra todos los componentes del veneno ni tampoco el mismo poder neutralizante contra todos ellos. (WHO 2016) .

---

## **OBJETIVOS**

El objetivo de este trabajo es el aislamiento y caracterización de toxinas del veneno del complejo *Bothrops neuwiedi* con el fin de identificar, componentes tóxicos responsables de la acción biológica del veneno.

### **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- ✚ Aislar y purificar componentes del veneno entero del complejo *Bothrops neuwiedi*.
- ✚ Caracterizar uno de los componentes relevante del veneno aislado, de acuerdo a sus propiedades bioquímicas y farmacológicas.
- ✚ Determinar en qué medida el componente aislado representa la actividad biológica del veneno entero.

### **Significado del trabajo**

La importancia del presente estudio radica en poder identificar uno de los componentes del veneno para establecer en qué medida provoca daño tisular a nivel de los tejidos muscular y endotelial, y a nivel sanguíneo. Este estudio podría ser de utilidad para orientar sobre la fisiopatología del envenenamiento bothrópico y de esta manera ayudar a la terapéutica en el desarrollo de tratamientos más eficaces del mismo. Por otro lado también podría orientar a la producción del antivenenos purificados contra las actividades más relevantes del veneno..

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

---

- **Obtención del veneno del complejo *B.n.***

El veneno del complejo *Bn* se extrajo de ocho ejemplares provenientes de las provincias de nuestro país (Santiago del Estero, Corrientes, Misiones) las cuales son representativas del accidente ofídico provocado por esta especie. El proceso de ordeñe manual de las serpientes se realizó en el ex - serpentario de la Universidad de La Plata. Una vez obtenido el veneno, se lo desecó y se produjo un “pool” que fue mantenido a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta el momento de ser utilizado.

- **Aislamiento y purificación de toxinas del veneno del complejo *B.n.***

El fraccionamiento del pool de veneno del *BnC* se realizó por cromatografía de intercambio catiónico en columna de CM-Sephadex C-25. Para esto se disolvió el veneno en buffer Tris-ClH 0,05 M, ClK 0,1M, pH 7,0 y aplicado en columna CM-Sephadex C-25 (30 x 2,5 cm; Pharmacia) equilibrada con el mismo buffer. Luego de la elusión de las proteínas ácidas, que no fueron retenidas en la columna, se eluyeron las proteínas básicas, retenidas en la columna, aplicando un gradiente de concentración continuo de ClK de 0,1M a 0,75 M a un flujo de 0,4 ml/min (Lomonte, 1989). La absorbancia de las fracciones eluidas se midieron a 280 nm en forma continua en un cromatógrafo Bio Rad. Las fracciones eluidas, proteínas básicas, fueron cromatografiadas nuevamente en idénticas condiciones, dializadas durante 48hs con agua destilada y por último liofilizadas. Se obtuvieron varias fracciones y se decidió tomar, para este estudio, la que generó en el cromatograma, el pico de mayor proporción (B-4) con respecto a todas las fracciones eluidas, la misma fue denominada Miotoxina I de *BnC* luego de realizar su caracterización. La homogeneidad de la proteína en estudio se determinó mediante tres criterios: (a) cromatografía líquida de alto desempeño en fase reversa (RP-HPLC) usando una columna C4, a un flujo de 1,0 ml/min con un gradiente de 0 a 60% de acetonitrilo en 0,1% de ácido trifluoroacético, (b)

electroforesis en gel de poliacrilamida al 12% en presencia de dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE) (Laemmli, 1970) y (c) electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de urea, usando un sistema de amortiguador catiónico (UREA-PAGE) (Traub et al. 1971).

- **Secuenciación de la Miotoxina I**

Se determinó la secuencia N-terminal de la proteína en forma directa, mediante la degradación de Edman. Posteriormente, la proteína fue carboximetilada (Shively, 1986) y sujeta al análisis de su secuencia parcialmente utilizando un secuenciador Beckman LF 3000, en el Instituto Biotecnológico de la Universidad Nacional Autónoma de México.

- **Reactividad cruzada de antígenos**

La Miotoxina I de *BnC* fue testada por inmunodifusión (Outcherlony & Nilsson 1978), enfrentándola a un antisuero producido en conejo contra otra miotoxina del mismo género pero distinta especie ofídica, Miotoxina II de *Bothrops asper* (*B.asper*). Se utilizó la Miotoxina II de *B.asper* como control positivo.

En un gel de agarosa al 1% en PBS (0,12M NaCl, 40 mM PO<sub>4</sub>Na<sub>2</sub>, pH 7,2) se realizaron orificios a modo de roseta, en los periféricos se sembraron 30 µl de las miotoxinas en diferentes concentraciones 1, 0,5 y 0,25 mg/ml y en el orificio central se sembró el antisuero en igual volumen que las toxinas. Luego se incubó por 24 H a temperatura ambiente en cámara húmeda para favorecer la difusión. Pasado este tiempo se observó la reacción de precipitación entre los diferentes componentes.

- **Caracterización bioquímica**

Se realizó la caracterización bioquímica del veneno entero y de la fracción aislada de acuerdo a actividades biológicas ensayadas *in vitro* e *in vivo*.

Todos los ensayos *in vivo* fueron realizados con grupos de ratones, cepa NIH, de peso entre 18 y 22 gr. los que fueron mantenidos en condiciones ambientales (luz y temperatura) controladas, recibieron comida y agua *ad libitum* y tratados de acuerdo a lineamientos éticos institucionales de la ANLIS y a la Guía para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio, (Public Health Service, 2002).

#### - **Actividad Citolítica**

La actividad citolítica de la Miotoxina I de *BnC* se midió sobre dos tipos de células: las células tEnd, células endoteliales de ratón transformadas con poliovirus, y las células C2C12 (ATCC CRL-1772), línea celular de mioblastos precursora de músculo esquelético de ratón (Lomonte, 1999). Para el crecimiento de ambos tipos de células se utilizó medio MEM modificado, suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB), glutamina 2 mM, ácido pirúvico 1mM y los antibióticos penicilina 100U/ml, estreptomycin 0,1 mg/mL y anfotericina B (0,25 µg/ml), en una atmósfera humificada con 7% de CO<sub>2</sub> a 37°C. Las células fueron cosechadas, a partir de monocapas cultivadas, en botellas de 25 cm<sup>3</sup> después de su desprendimiento por tripsina (1500 U/ml) que contenía EDTA 5,3 mM, durante 5 minutos a 37°C, fueron resuspendidas y se sembraron en microplacas de 96 pocillos, a una densidad inicial de 4.10<sup>4</sup> células / pocillo, en el mismo medio. Entre 3 y 5 días, cuando se alcanzó la monocapa, las células endoteliales se utilizaron en la ensayo de citotoxicidad. En el caso de los mioblastos C2C12, el medio de crecimiento fue reemplazado por medio de diferenciación que consistió en DMEM suplementado con 1% de SFB. Cuando se vio la diferenciación a miotúbulos, luego de 6 días de cultivo, estas células también fueron utilizadas para los ensayos de citotoxicidad. El efecto citolítico en dichas células se estimó luego de 3 H de incubación con distintas concentraciones de la toxina (20 µg y 40µg) en un volumen de 150 µl/ pozo, y se determinó la actividad de la enzima deshidrogenasa láctica (LDH) en el sobrenadante.

La actividad citolítica del veneno entero (*BnC*) se ensayó en dos líneas celulares una de tejido conectivo de ratón, L20B, y otra línea celular, RD, de origen muscular humano (rhabdomiosarcoma humano). Para el crecimiento y cosecha de ambos tipos de células se utilizó igual procedimiento que para las líneas celulares C2C12 y t-End, arriba descritas. Las células L20B y RD resuspendidas se sembraron en microplacas de 96 pocillos, a una densidad inicial de  $2.10^4$  células / pocillo, en el mismo medio. A las 24 H se utilizaron directamente para el ensayo de citotoxicidad. Tanto el veneno y la toxina aislada fueron diluidos en el medio de ensayo, MEM suplementado con 1% de SFB y fueron agregados a los cultivos celulares (150  $\mu$ l / pocillo). A su vez se realizaron controles en todas las líneas celulares, para ver el 0% y el 100% de toxicidad, con el medio de ensayo y 0,1% Triton X-100 respectivamente. Luego de 3 H de incubación, una alícuota de 100  $\mu$ l de sobrenadante se recogió para la determinación de la actividad enzimática de la lacto deshidrogenasa liberada por las células dañadas, usando un ensayo colorimétrico de punto final (Sigma N°500). En el caso del veneno crudo también se determinó la actividad enzimática LDH a los 4 días. El daño celular, citotoxicidad, se determinó midiendo la actividad de la LDH liberada y la observación microscópicamente de las células. Al final de la incubación, donde se evaluó las alteraciones morfológicas, se determinó cuál era la concentración de veneno que producían un efecto citotóxico del 50%, concentración citotóxica efectiva del 50% (CC50%), en cada una de las líneas celulares probadas, de acuerdo a la concentración inicial celular.

#### - **Actividad PLA<sub>2</sub>**

La actividad PLA<sub>2</sub> del veneno del *BnC* y de la toxina fueron determinados mediante el método de Dole (1956), utilizando como sustrato fosfolípidos de yema de huevo (10 ml) diluidos 1:5 en una solución buffer (0,1M Tris-ClH, 0,01M CaCl<sub>2</sub>, pH 8,5), en presencia de Triton X-100 al 1% (0,5ml). Distintas concentraciones de toxina 6,12, 25 y 50  $\mu$ g, se

incubaron con 1 ml de sustrato a 37°C durante 15 minutos. Se realizó la extracción de ácidos grasos con una mezcla de heptano, isopropanol y ácido sulfúrico. Luego de 15 minutos de incubación a 37°C, se extrajeron los ácidos grasos liberados por acción de la enzima y se titularon utilizando NaOH 0,018M y azul de bromotimol como indicador de punto final. El veneno entero fue utilizado como control positivo en las mismas concentraciones. La actividad se expresó en  $\mu\text{Eq}/\text{mg}$  de proteína /min.

#### - **Actividad Hemorrágica**

La actividad hemorrágica del veneno y la toxina, se evaluó en la piel de ratones, cepa NIH, inoculando por vía intradérmica 50  $\mu\text{l}$  de distintas concentraciones de veneno o toxina, desde 0,6 a 20 $\mu\text{g}$ . Luego de 2 H se sacrificaron los ratones mediante inhalación de CO<sub>2</sub>, según las normas internacionales (Public Health Service, 2002). Se removió la piel y se midió el área hemorrágica en la región interna de la misma. Se utilizó un grupo de ratones como control negativo inyectados con PBS. El diámetro de la lesión hemorrágica se determinó según el siguiente cálculo:

$$D = 2 \cdot \sqrt{a / \pi}$$

D: diámetro

a: área hemorrágica (graficada milimétricamente)

El resultado se obtuvo mediante la construcción de una curva de dosis – respuesta graficando  $\mu\text{g}$  de veneno en el eje de las abscisas (x) vs mm de diámetro de la lesión hemorrágica, en el eje de las ordenadas (y). La actividad se expresa como la Dosis Hemorrágica Mínima (DHM), que es la cantidad de veneno o toxina, que induce un área hemorrágica de 10 mm de diámetro 2H después de la inyección. (Theakston & Reid, 1983 ;Gutierrez *et al.* 1985; Gutierrez *et al.* 2005; WHO 2016).

- **Actividad Miotóxica**

La CK es una enzima que se encuentra en altas concentraciones en el citoplasma de células musculares, liberándose al fluido intersticial y a la sangre luego de que ocurre un daño celular. La actividad miotóxica se determinó cuantificando la actividad de la enzima CK en plasma de ratones previamente inyectados por vía intramuscular. Se prepararon concentraciones crecientes de veneno o toxina de 20, 40, 80 o 100 µg en buffer fosfato (PBS). Las diferentes diluciones de toxina o veneno se inyectaron, en un volumen de 40 µl, en grupos de 4 ratones NIH (18-20gr) en el músculo gastrocnemio derecho. Se inoculó un grupo de ratones con 40 µl de PBS como control negativo. Luego de 1, 3, 6, y 24 H se anestesió a los animales y se recolectó la sangre, obtenida del plexo venoso ocular, en capilares heparinizados, a los distintos tiempos. Luego se centrifugaron los mismos y se determinó en plasma la actividad de la enzima CK por un ensayo espectrofotométrico (Kit Sigma 520). La actividad de la enzima se expresó en U/ml, en donde una unidad corresponde a la fosforilación de 1 nmol de creatina por minuto a 25°C. Se graficó una curva dosis- respuesta, µg de veneno en el eje de las abscisas (x) vs actividad de la CK en plasma en el eje de las ordenadas (y), empleando una escala logarítmica para la dosis de veneno y una escala milimétrica para la actividad de la CK, con estos datos se determinó la dosis miotóxica, que se define como la cantidad de veneno que induce un incremento, en suero o plasma, de la actividad de la enzima CK cuatro veces más que la hallada en suero o plasma de ratones inyectados con solución fisiológica solamente (WHO, 2016).

Además de medir la liberación de la CK, se tomaron muestras del músculo gastrocnemio, luego de sacrificar los ratones mediante inhalación con CO<sub>2</sub>, que fueron fijadas y formolizadas a las 24 H para ser procesadas histológicamente y evaluar el daño muscular.

Para observar la necrosis muscular *in vivo* se utilizó la técnica de microscopía intravital, para ello se anestesió un ratón, al que se le realizó una cirugía exponiendo el músculo cremaster donde se aplicó, sólo por contacto, el veneno entero y la toxina y se procedió a la observación del efecto de ruptura de las fibras musculares.

- **Actividad Edematizante**

La actividad edematizante se evaluó inyectando 50 µl, por vía subcutánea, de una solución de 25 µg de toxina o veneno disuelta en PBS, a grupo de 4 ratones, en la almohadilla plantar derecha trasera del ratón (cepa NIH). En la otra pata se inyectó 50 µl de PBS como control negativo. Se midió el incremento de la inflamación con un calibre de baja presión a distintos tiempos: 1, 3, 6, 9, 12 y 24 H (Lomonte *et al.* 1993). La magnitud del edema se estimó haciendo una curva de dosis - respuesta donde se grafican los mm de inflamación, respecto del control, en eje de las ordenadas (y) en función del tiempo de medición en las abscisas (x) y determinando así los milímetros de inflamación en la pata tratada con respecto a la control. El resultado se expresa como % de edema inducido por el veneno y/o toxina con respecto al control, definiéndose la "Dosis Edematizante Mínima" (DEM), como la cantidad de veneno, o toxina, que induce un edema del 30% a un tiempo determinado (OPS, 2012; WHO, 2016).

- **Actividad Necrotizante**

La necrosis se determinó por inyección intradérmica de 50 µl de una solución de toxina o veneno en concentraciones desde 20 a 0,62 µg en grupos de 4 ratones cepa NIH por dilución. Se utilizó un grupo de ratones como control negativo inyectados con PBS. Luego de las 72 H se sacrificaron los animales mediante inhalación de CO<sub>2</sub>, y se removió la piel midiendo el área necrótica, al igual que en actividad hemorrágica. El resultado se obtuvo mediante la construcción de una curva de dosis – respuesta graficando µg de veneno en el eje de las abscisas (x) vs mm de diámetro de la lesión

necrótica en el eje de las ordenadas (y). El resultado se expresó en  $\mu\text{g}$  de veneno o toxina. La dosis necrotizante se define como la cantidad de veneno o toxina que inyectado intradérmicamente en ratones, induce una lesión necrótica de 5 mm de diámetro al cabo de 3 días (WHO, 2016).

- **Actividad Letal (Dosis letal 50%)**

La dosis letal de la toxina o veneno se determinó inoculando 0,5 ml, por vía endovenosa a grupos de 4 ratones cepa NIH con 5, 20 y 80  $\mu\text{g}$  de veneno cada grupo respectivamente. En este caso también se utilizó un grupo control que fue inoculado por la misma vía pero con PBS. Durante 96 H se registraron las muertes y la dosis letal 50% se calculó por el método estadístico de Spearman – Karber, definiéndose la DL50% como la mínima cantidad de veneno o toxina que causa la muerte del 50% de los ratones inyectados (WHO, 1981, WHO,2016 ).

- **Actividad Desfibrinogenante**

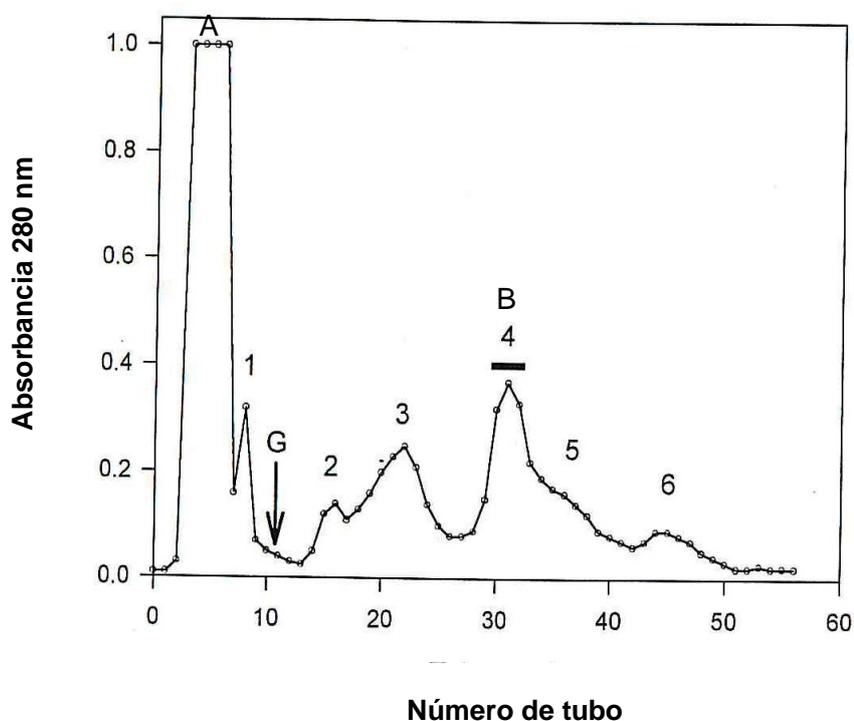
La dosis desfibrinogenante se determinó mediante la observación de la coagulabilidad o incoagulabilidad de la sangre, por el consumo del fibrinógeno. Para esto se inyectaron, por vía endovenosa, grupos de 4 ratones cepa NIH con concentraciones de 5 a 100  $\mu\text{g}$  de veneno y toxina, a cada uno se le inoculó 200  $\mu\text{l}$  de la dilución correspondiente. Luego de una hora de inoculados los animales se les extrajo sangre por punción cardíaca, previamente anestesiados. La sangre se incubó, en tubos vidrio, a temperatura ambiente (22 – 24°C), observando hasta las 2H si había o no formación de coágulo, cuando se inclinaba el tubo, y registrándose el tiempo en que éste se producía. Luego de ese tiempo si no se formaba el coágulo se definía a esa concentración como incoagulable.(Manual de Métodos de Laboratorio, OPS, 2012). La dosis desfibrinogenante mínima (DDM) se define como la menor cantidad de veneno o toxina que provoca la inhibición de la formación del coágulo sanguíneo (WHO,2016). Si

bien la actividad se denomina desfibrinogenante, cabe aclarar que hay venenos que producen anticoagulación por otros mecanismos que no involucran necesariamente la acción sobre el fibrinógeno.

**RESULTADOS****ENSAYOS *in vitro***

- **Aislamiento y purificación de toxina del veneno del complejo *Bn*.**

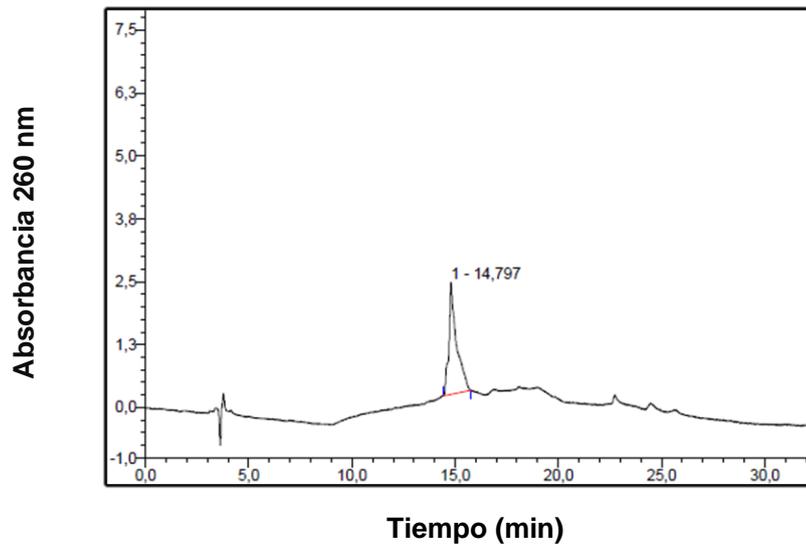
Inicialmente se realizó una corrida cromatográfica de intercambio iónico, utilizando una columna de CM-Sephadex con una pequeña cantidad de veneno del *BnC* (5 mg), para establecer las condiciones de corrida y ver el perfil cromatográfico de las proteínas. Luego se realizó una segunda corrida con una mayor cantidad de veneno (180 mg) para así obtener un mayor volumen de trabajo.



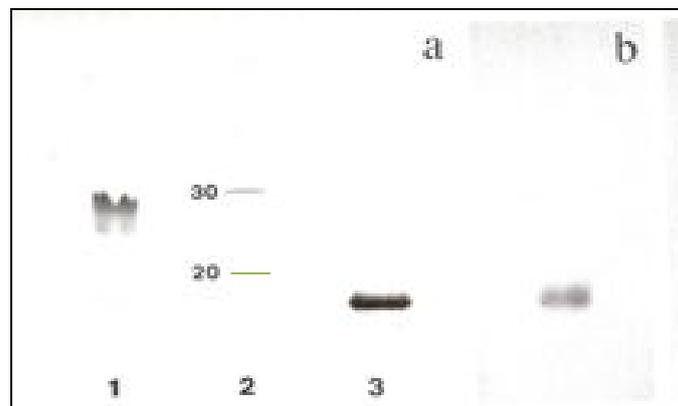
**Figura 5-** Cromatografía de intercambio iónico del veneno *BnC* con CM- Sephadex C-25. Se inyectó 180 mg. de veneno *BnC* en la columna equilibrada con buffer Tris-ClH 0.05M, pH 7.0. Luego de eluir la fracción ácida que no fue retenida por la columna (A), se eluyó la fracción básica (B) aplicando un gradiente (G) continuo de KCl 0.75M (indicado con flecha). El pico B-4, nombrado Miotoxina I del *BnC* fue recogido, recromatografiado en idénticas condiciones, dializado y liofilizado.

A partir del cromatograma obtenido se decidió trabajar con el pico de elusión B-4 que era el más significativo de las proteínas básicas del veneno (Fig.5). Este pico se sometió nuevamente a cromatografía de intercambio iónico con CM-Sephadex, en

idénticas condiciones, y a una cromatografía de alto desempeño en fase reversa (RP-HPLC) usando una columna C4, a un flujo de 1.0 ml/min con un gradiente de 0 a 60% de acetonitrilo en 0,1% de ácido trifluoracético (Fig.6), resultando una preparación proteica homogénea observada en el análisis electroforético con SDS-PAGE y urea-PAGE. En SDS-PAGE, la proteína migró como monómero de 15 kD bajo condiciones reductoras o como dímero de 30 kD bajo condiciones no reductoras, como muestra la (Fig.7).



**Figura 6-** Análisis por RP-HPLC del pico B-4, Miotoxina I del *BnC* (50 ug), en columna C4. Flujo 1 ml/min con un gradiente de acetonitrilo (0-60%) en 30 minutos. Buffer A 0,1% ácido trifluoracético y buffer B de 0,1% de ácido trifluoracético en 100% de acetonitrilo, aislado previamente por cromatografía de intercambio iónico.



**Figura 7-** Análisis electroforético de la Miotoxina I de *BnC*. (a) SDS-PAGE (gel 12%): Línea 1 y 3 corresponden a 10  $\mu$ g. de Miotoxina I de *BnC* en condiciones no reductoras y reductoras con 2- $\beta$  mercaptoetanol, respectivamente. Línea 2 corresponde a los marcadores de peso molecular. (b) UREA-PAGE (gel 12%) 10 $\mu$ g de la Miotoxina I de *BnC*.

- **Secuenciación de la Miotoxina I**

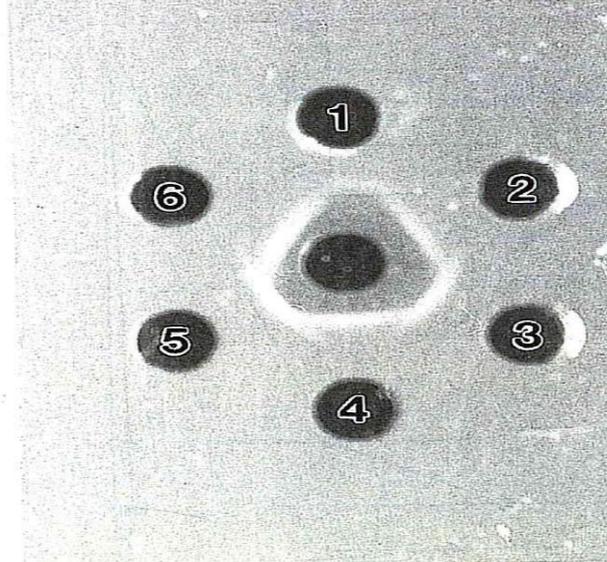
La secuencia N-terminal de la proteína se determinó parcialmente en un residuo de 40 aminoácidos (aa) (Fig.8).

	1	10	20	30	40	% identity
Bneu-I	SLVELGKMILOETG*KNPVTSYGAYGCNCGVLGRGKPKDAT					
Basp-IV	.....*					95.6
Basp-II	..F.....*..AK.....					92.5
Bjsu-I	..F.....*..AK.....					92.5
Bmoo-II	..F.....*..AK..V.....G.....					87.5
Batr	.....*.....L.....C.....GS.H.....D.					85.0
Acl-K49	..L.....*..AI...S.....WGH..Q.....					80.0
Bgod-II	.MYQ.W.....*..A.P...L.....GS.....					77.5
Abil PLA-II	..L.....*..IAI...S.....WGH..R.....					77.5
App-K49	.VL.....*..AI...S.....WGH..Q.....					77.5
Bsch-I	.MY.....L.....*..AA...I...					76.0
Tflv-bpI	...Q.W...F.....*..EAAKN..L.....GR.....					72.5
Vaxa-S49	.VI.F....QE..D*...L...SF...H..LGNK.....					65.0
Basp-III	..I.FA.....E..K*RL.FPY.TT...Y..WG.Q.Q.....					57.5
Bjsu-PLA	D.WQF.Q...K...*..L.FPY.TT...Y..WG.Q.Q.....					57.5
Bjsu-II	D.WQW.Q...K...*..L.FPY.TT...Y..WG.....V.P.					57.5
App-D49	N.FQFE.L.KKM...*..SGMLN.S...Y..WG.Q.R.....					50.0
Bneu-P3	N..QFETL.MKIA.					28.6

Figura 8- La secuencia N-amino terminal de la Miotoxina I de *BnC* se comparó con miotoxinas con actividad PLA2. Los aminoácidos idénticos en la secuencia de la Miotoxina I de *BnC* son representados con puntos. Se utilizó un secuenciador Beckman LF3000.

- **Reactividad cruzada de antígenos**

Al enfrentar la proteína en estudio, con antisuero contra una miotoxina de otra especie del género *Bothrops* (*B.asper*), utilizando la técnica de inmunodifusión radial en gel de agarosa, se observó a través de la formación de una banda de precipitación que existía identidad parcial entre la proteína purificada y la miotoxina de otra especie de *Bothrops* (Fig.9).



**Figura 9-** Inmunodifusión en gel de agarosa 1%. Pocillos 2,4 y 6 corresponden a 0.25, 0.5 y 1 mg/ml de Miotoxina I de *BnC* respectivamente, y pocillos 1,3 y 5 corresponden a 0.25, 0.5 y 1 mg/ml de la Miotoxina II de *B.asper* respectivamente. En el pocillo central se sembró el suero de conejo anti- miotoxina II de *Bothrops asper* (30  $\mu$ l) y se observó reacción de inmunoprecipitación.

- **Actividad Citolítica**

Al probar la toxicidad de la miotoxina aislada sobre células endoteliales t-End y de músculo esquelético de ratón C2C12, se observó un rápido efecto citolítico *in vitro* (Fig.10).

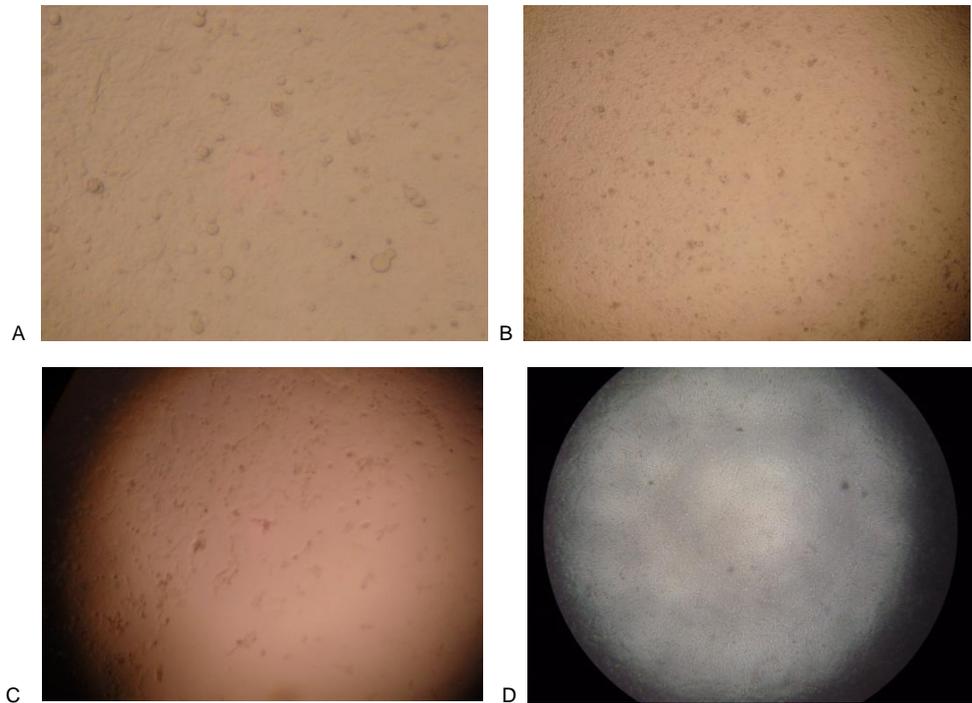
También se midió el efecto citolítico cuantificando la enzima LDH que se libera cuando se produce el daño celular. Luego de 3 Hs de exponer las células a la miotoxina en concentraciones de 20 y 80  $\mu$ g/pocillo a las células t-End y a las C2C12 se observó rápidamente el efecto citotóxico.



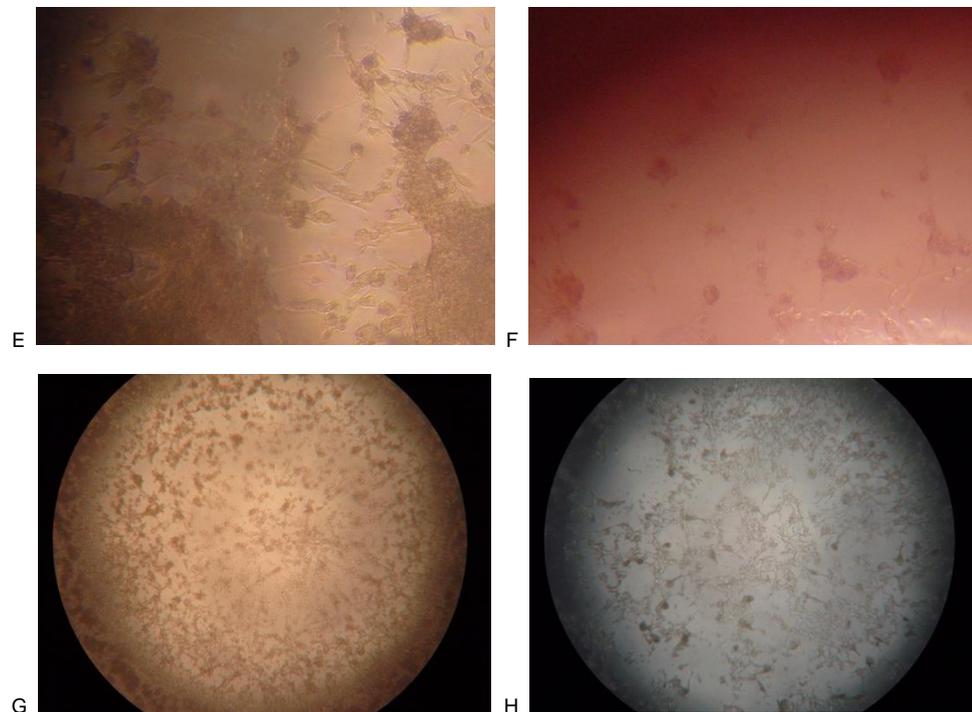
**Figura 10-** Alteraciones sobre las fibras musculares de las células C2C12 *“in vitro”* causada por la Miotoxina I de *BnC*. (A) Control de células C2C12 sin toxina. (B) Efecto de la Miotoxina I de *BnC* (20 ug/ pocillo). Magnificación 200 x. La citotoxicidad fue estimada por medición de la enzima lactato deshidrogenasa en el sobrenadante luego de 3 H de exposición.

La toxicidad del veneno entero del complejo *Bn* se probó sobre las células L20B y RD en concentraciones entre 0,4 y 10  $\mu\text{g}$  y se observó al cuarto día de incubación el efecto citolítico *in vitro*. Este efecto se midió cuantificando la enzima LDH a las 3H de

incubación como se hizo con la toxina, y al cuarto día cuando observó el efecto citolítico. (Fig.11 y 12).



**Figura 11-** Control monocapa de células L20B (A y B) y de células RD (C y D). Control negativo, sin veneno del *BnC*.



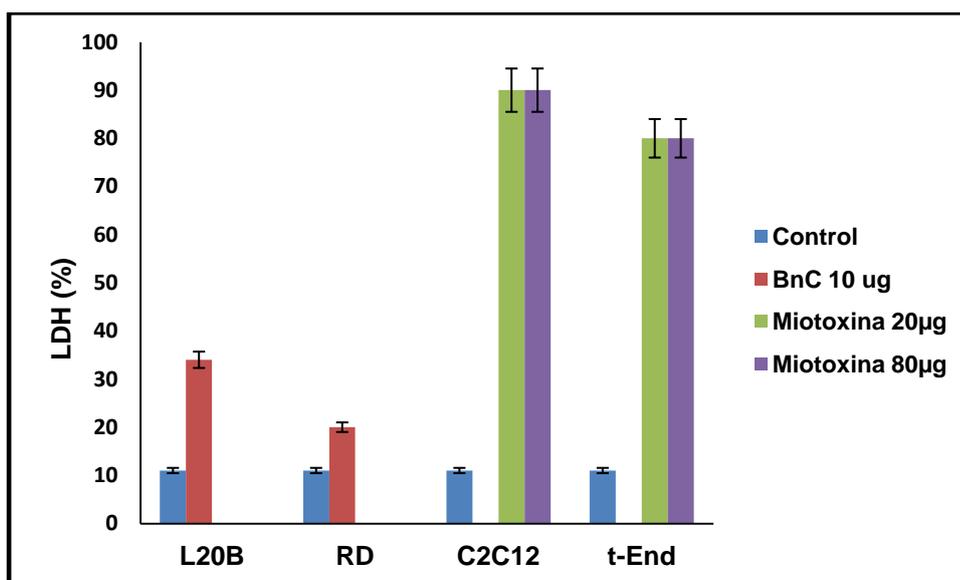
**Figura 12-** Efecto citotóxico del veneno del *BnC*. al 4to día de la inoculación sobre las células L20B (E y F) y sobre las células RD (G y H).

Al medir los niveles de LDH liberado en el sobrenadante, el porcentaje fue mayor en las líneas celulares tratadas con la miotoxina con respecto al veneno entero (Fig.13). Este resultado es sólo orientativo ya que a pesar de usar iguales tipos de células (musculares y endoteliales) no se usaron las mismas líneas celulares para tratar ambas (Tabla 2).

**Tabla 2-** Niveles de LDH en distintos tipos celulares

Lineas Celulares	<i>B.neuwiedii</i>	Miotoxina I
tEnd	N/T*	90 %
C2C12	N/T*	80 %
L20B	34 %	N/T*
RD	20 %	N/T*

\*N/T: no tratadas- Porcentaje de la liberación de LDH en las células tratadas con el *BnC* y la Miotoxina I con respecto a las células Control.

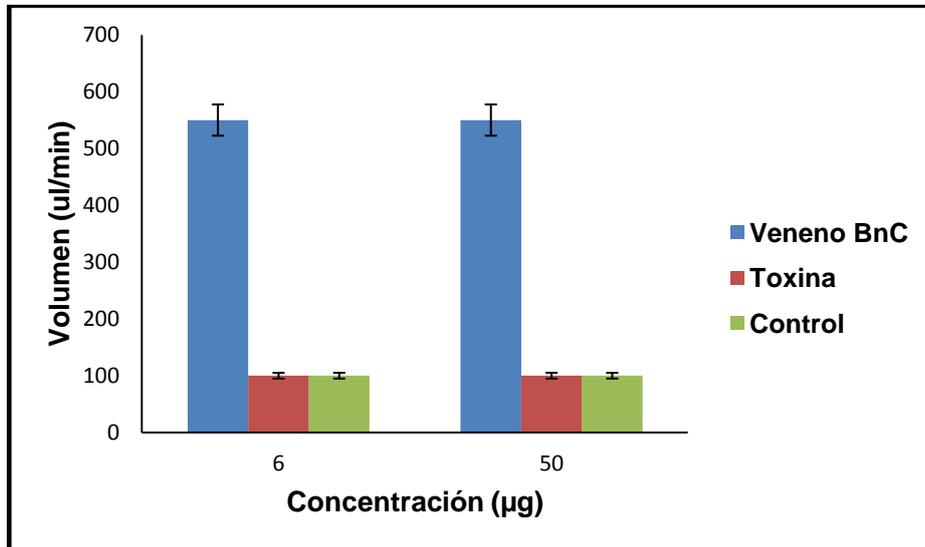


**Figura 13-** Actividad citotóxica del veneno *BnC* y de la Miotoxina I. Citotoxicidad estimada por la liberación de la enzima LDH en el sobrenadante de cultivos celulares. Cada barra representa la media  $\pm$  SD de dos determinaciones.

En el caso de la Miotoxina I de *BnC*, no se puede concluir que hay una dependencia entre la concentración inoculada y el efecto debido a que sólo se probaron solo dos concentraciones de veneno y no se determinó la EC50% citotóxica de la toxina.

- **Actividad Fosfolipasa A2**

Se observó que la Miotoxina I de *BnC* carece de actividad PLA<sub>2</sub> cuando fue probada, sobre los fosfolípidos de la yema de huevo, (solución de 10 ml), en concentraciones entre 6 y 50 µg (6,12, 25 y 50 µg) de la misma (Fig.14).

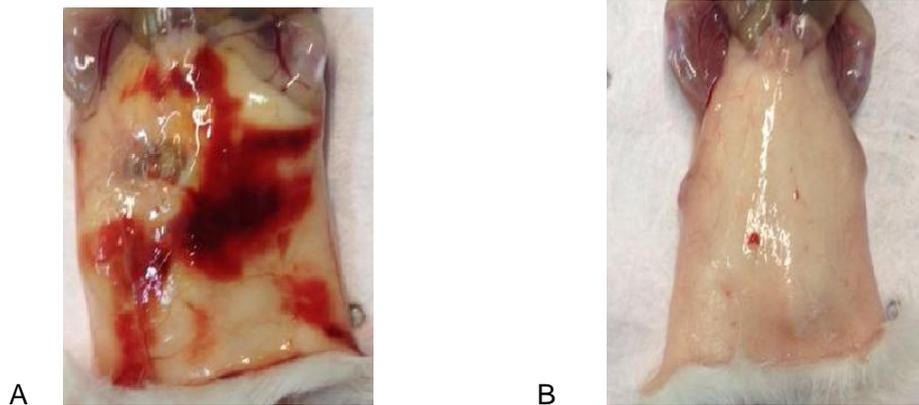


**Figura 14-** Actividad PLA<sub>2</sub>. Comparación de la actividad enzimática del veneno *BnC* y la Miotoxina.I Medición de ácidos grasos libres valorados mediante titulación con NaOH 0,018M.

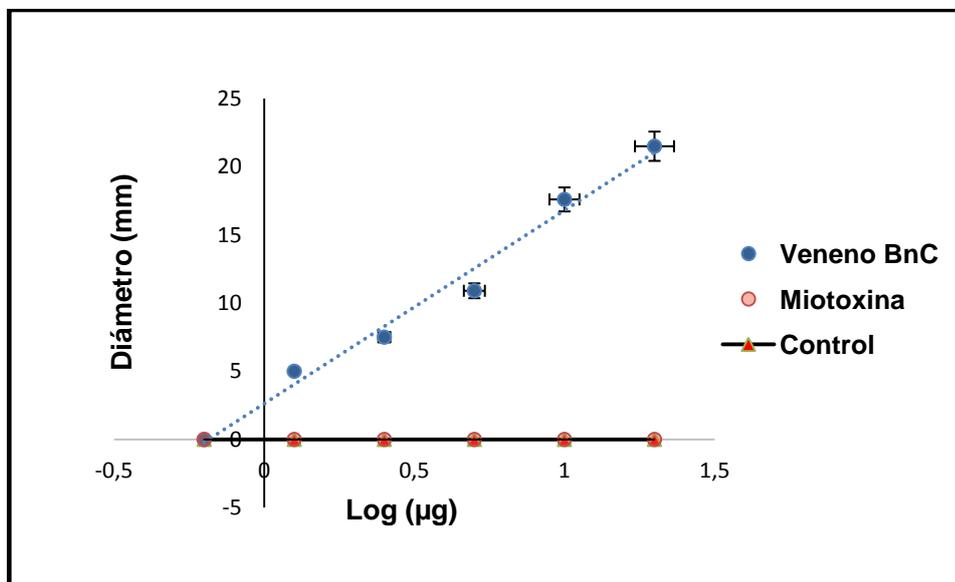
## ENSAYOS *in vivo*

- **Actividad Hemorrágica**

Al probar la actividad hemorrágica de la Miotoxina I, inyectándola en forma intradérmica en ratones a distintas concentraciones, no se obtuvo respuesta a la mayor dosis inoculada (20 µg), a diferencia de lo que se obtuvo cuando se inyectó el veneno crudo de *BnC* en concentraciones entre 0,6 y 20 µg donde la DHM fue de 3,3 µg (Fig.15 y 16).



**Fig.15** Hemorragia observada en la parte interna de la dermis de ratón inyectando con: A) Veneno *BnC* B) Miotoxina I.

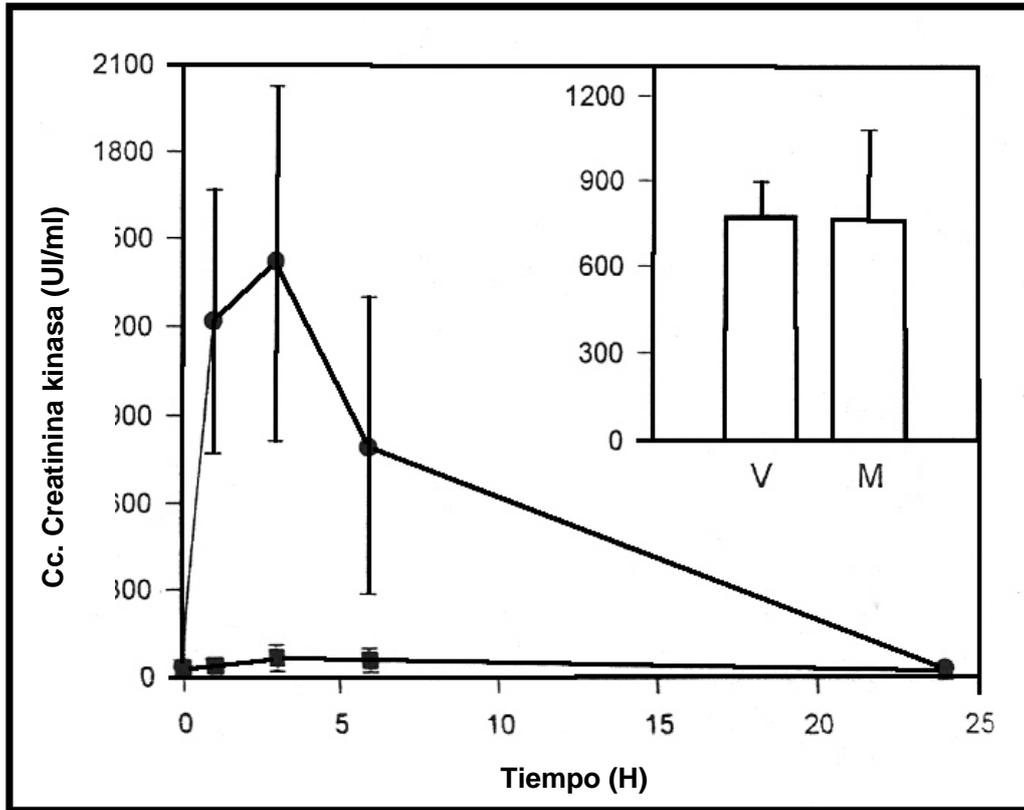


**Figura 16-** Actividad Hemorrágica. Medición de actividad hemorrágica del veneno y de la Miotoxina. (●) Veneno *BnC*, (●) Miotoxina, (▲) Control. DHM del veneno *BnC* = 3,3µg

- **Actividad Miotóxica**

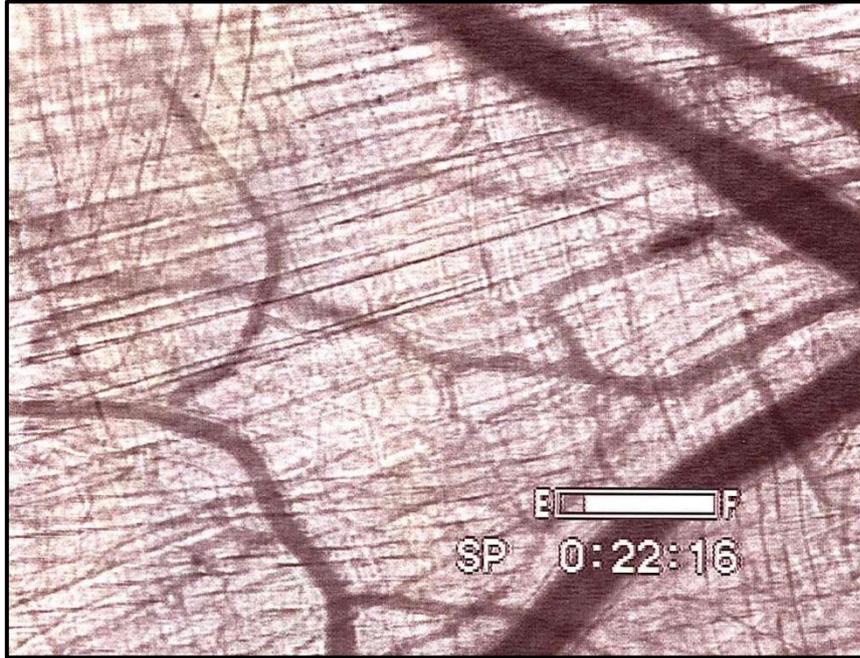
El veneno entero del *BnC* y la proteína aislada fueron inyectados en ratones, por vía intramuscular, observándose que ambos inducen el incremento máximo de la enzima CK en el plasma luego de las 3 H de inoculado el animal (Fig.17) y daño en el tejido muscular. Por este motivo, la proteína en estudio fue denominada "Miotoxina I" de *BnC*. Durante este experimento se observó un incremento drástico de la actividad de la CK

durante la primera hora, alcanzando el nivel máximo a las 3 H luego de la inoculación con 80 µg de Miotoxina I. Posteriormente, los niveles de la enzima fueron descendiendo hasta retornar a los niveles normales.

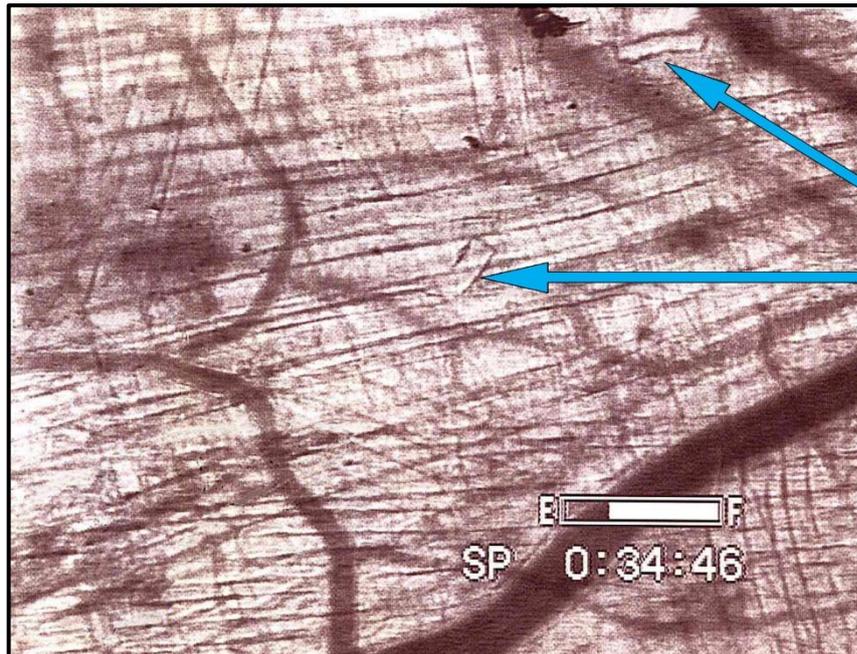


**Figura. 17-** Actividad miotóxica del veneno entero de *BnC* y de la Miotoxina I de *BnC*. *in vivo*. La Miotoxina I (80 µg) fue Inyectada i.m. en el músculo gastrocnemio de ratón representada (●) y se determinó los niveles de CK en plasma a distintos tiempos. Se incluyeron ratones inyectados con solución salina como control negativo (■). El gráfico de barras inserto muestra los niveles de creatinina kinasa en plasma cuando los ratones recibieron por vía i.m. una inyección de 50 µg de veneno entero (V) o de Miotoxina (M) luego de 3 H. Todos los puntos representan la media +/- SD de cuatro animales inoculados.

A su vez se observó *in vivo* el daño de las fibras musculares cuando se realizó la microscopia intravital inoculando directamente la Miotoxina I sobre el tejido muscular y también se realizó con el veneno crudo (Figs 18,19 y 20).

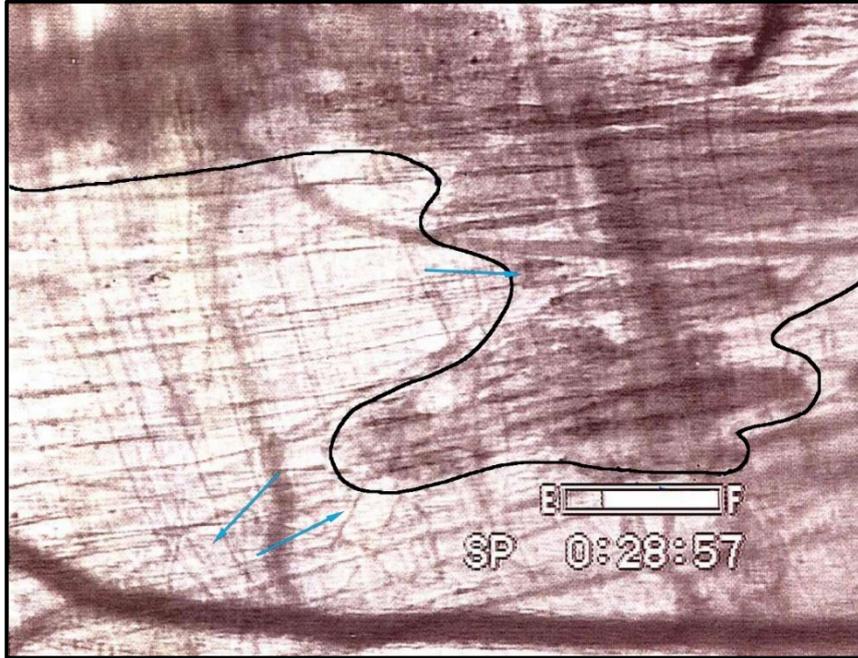


**Figura 18-** Microscopia intravital (100X). Vista de tejido muscular, (músculo cremaster) de ratón sin veneno ni toxina. Control de tejido.



**Figura 19-** Microscopia intravital (100X). Tejido muscular, músculo cremaster, de ratón expuesto a Miotoxina I. Se visualiza ruptura de fibras musculares (flechas).

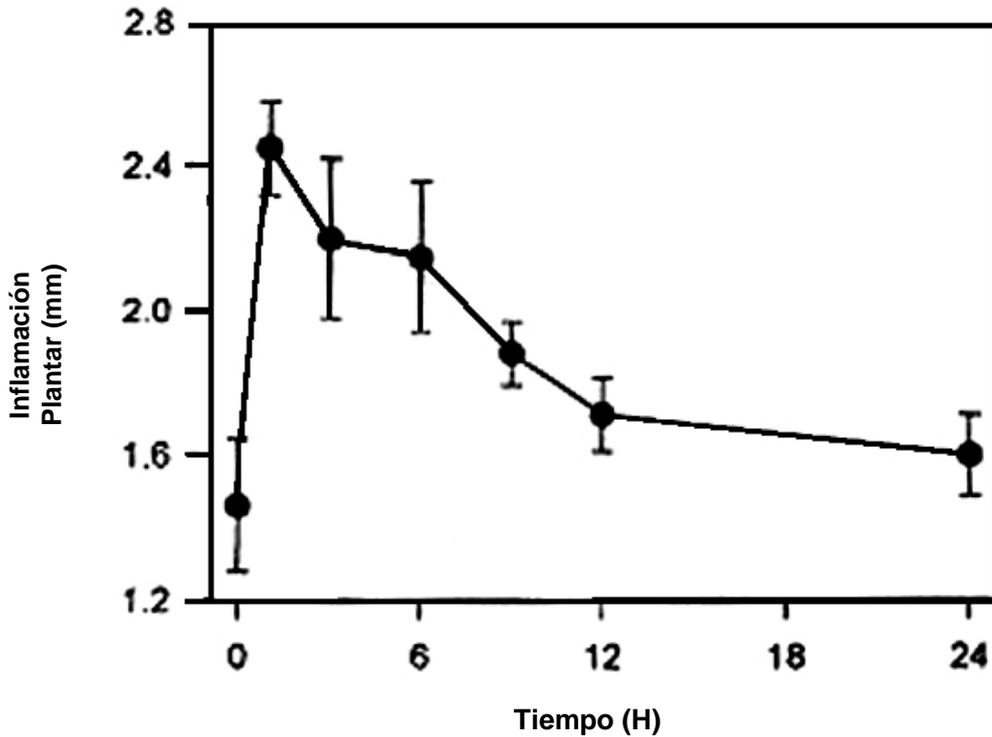
la



**Figura 20-** Microscopía intravital (100X). Tejido muscular , músculo cremaster, de ratón expuesto al veneno del complejo *BnC* se observa región con hemorragia intensa y ruptura de fibras musculares (indicadas con las flechas).

- **Actividad Edematizante**

La inyección subcutánea de la toxina (25 µg) en la zona plantar de la pata indujo rápidamente un importante edema al cabo de 1 H después de la inoculación y el mismo fue decayendo entre las 12 y 24 H posteriores a la misma, al igual de lo que sucedió cuando se inyectó el veneno entero del *BnC* (Fig.21).



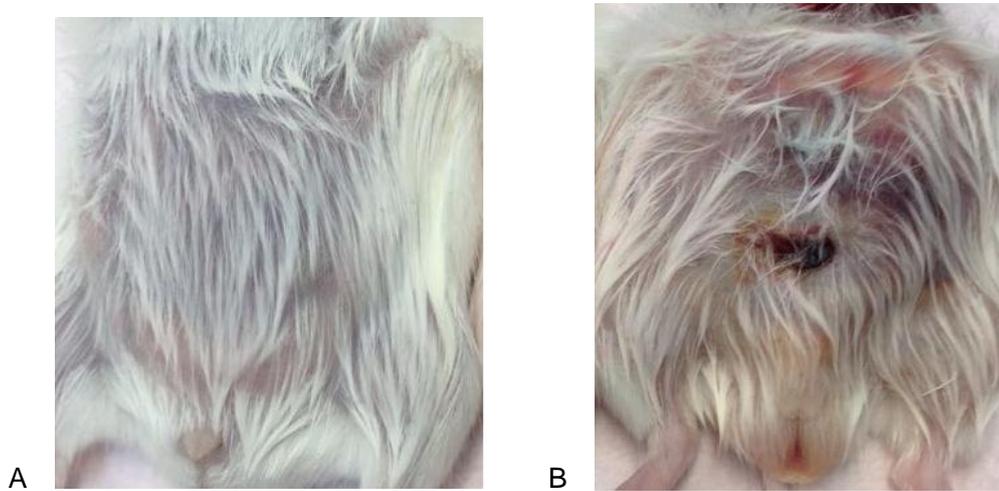
**Figura 21-** Actividad Edematizante de la Miotoxina I de *BnC* *in vivo*. Se inyectó 25  $\mu\text{g}$  por vía subcutánea en la almohadilla plantar de la pata de ratón la Miotoxina I a un grupo de animales y a otro grupo de ratones se le inyectó, del mismo modo, el veneno entero, al cabo de una hora se observó el pico máximo de inflamación de la pata del animal en ambos grupos y la actividad inflamatoria fue descendiendo a las 24 H. Cada punto representa la media  $\pm$  SD de 4 animales. La inflamación plantar medida en la pata control inyectado con solución salina, fue por debajo de 1,65mm (no se muestra).

La Dosis Edematizante Mínima del *BnC* fue de 20 $\mu\text{g}$ ; el edema que se obtuvo con esta concentración es del mismo orden que el que se produjo cuando se inyectó 25  $\mu\text{g}$  de la Miotoxina I por lo que se puede decir que se necesita mayor cantidad de toxina para provocar el mismo efecto edematizante que provoca el veneno entero.

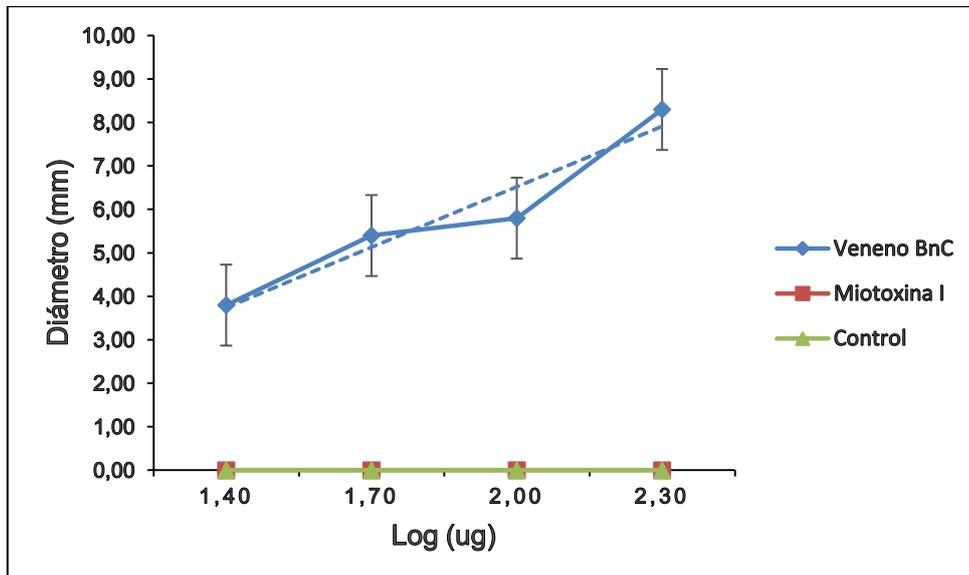
- **Actividad Necrotizante**

Al probar la actividad necrotizante de la Miotoxina I, inyectándola en forma intradérmica en ratones a distintas concentraciones entre 25 - 80  $\mu\text{g}$ , no se obtuvo respuesta

alguna, a diferencia de lo que se obtuvo cuando se inyectó el veneno entero del *BnC* donde la DMN fue aproximadamente de 46  $\mu\text{g}$  (Fig.22 y 23).



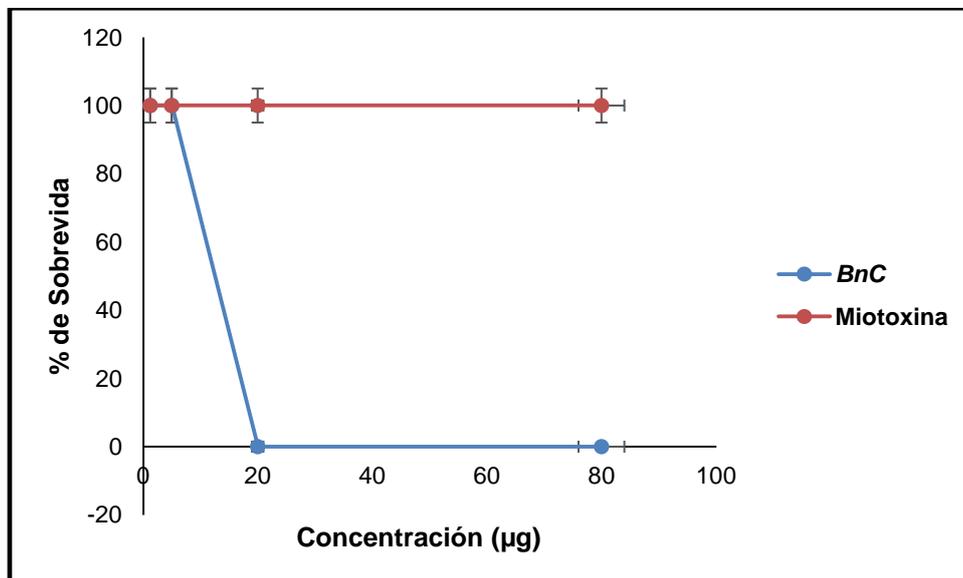
**Fig.22-** Lesión necrótica producida en la dermis del ratón cuando se inyecta veneno del *BnC* (B), En la foto (A) no se observa lesión necrótica, animal inyectado con la Miotoxina I de *BnC*.



**Figura 23.** Representación de DMN del veneno *BnC* y de la Miotoxina I aislada. Cada punto representa la media  $\pm$  SD de cuatro animales.

- **Dosis Letal 50%**

Para determinar la DL 50% de la Miotoxina I diferentes dosis de la misma, en un rango entre 1 - 80  $\mu\text{g}$  / ratón, fueron inyectadas en ratones y observados los mismos durante 96H, obteniéndose resultados negativos ya que no indujo ni muerte ni anomalías evidentes. A diferencia del veneno entero que indujo muerte en una DL50% de 10  $\mu\text{g}$ / ratón, el valor fue obtenido por el método estadístico Spearman - Karber, donde se evaluó el número de animales muertos y sobre los vivos inyectados para cada concentración. (Fig.24)



**Figura 24-** Representación de la DL50% de veneno en ratones y de la Miotoxina I después de 96H de observación. Se inyectaron concentraciones hasta 80  $\mu\text{g}$ /ratón en ambos casos. Cada punto representa la media  $\pm$  SD de cuatro animales. Se inyectó con PBS un grupo control de animales ( $n=4$ ) que tuvieron una supervivencia del 100% al cabo de 96 H (no se graficó)

- **Dosis Desfibrinogenante**

Para determinar la dosis desfibrinogenante, se inocularon grupos de 4 ratones con concentraciones de veneno entero de *BnC* y de la Miotoxina I en el rango entre 5 - 100  $\mu\text{g}$  para ambas muestras. A la hora de su inoculación fueron sangrados y se registró el tiempo y concentración al cual las muestras se tornaban incoagulables. La DDM de la

toxina se observó a partir de los 62 µg y la del veneno entero a partir de los 8 µg. Por lo que se concluyó que era necesario inyectar una concentración mayor de la Miotoxina I para que provoque el mismo efecto que el veneno entero.

A modo de resumen se presenta la siguiente tabla 3 donde se compara los resultados obtenidos de las actividades probadas para ambas muestras, la Miotoxina I y el veneno entero de *BnC*.

**Tabla 3.-** Comparación de resultados biológicos entre el veneno entero del complejo *Bothrops neuwiedi* y la Miotoxina I de *BnC*.

Actividades	Veneno entero <i>BnC</i>	Miotoxina I
Citotóxica	+	+
Fosfolipasa A2	+	-
Hemorrágica	+	-
Miotóxica	+	+
Edematizante	+	+
Necrotizante	+	-
Letal	+	-
Desfibrinogenante	+	+

## **DISCUSIÓN**

---

Las miotoxinas básicas con actividad PLA<sub>2</sub> están ampliamente distribuidas en los venenos de las especies del género *Bothrops*, aunque en algunas especies pueden estar ausentes (Lomonte *et al.* 1990; Moura da Silva *et al.* 1991a). Las miotoxinas del género *Bothrops* pertenecientes a la familia de las PLA<sub>2</sub> clase II, se encuentran en los venenos Viperidae y Crotalinae, y pueden ser clasificadas generalmente, según la secuencia aminoacídica, como las isoformas Asp-49 o Lys-49. (Gutierrez & Lomonte, 1997; Nuñez, *et al.* 2004). Este último tipo de proteínas son conocidas como “PLA<sub>2s</sub> homólogas” ya que no tienen, actividad catalítica aunque son muy potentes induciendo necrosis local en el músculo esquelético de ratón (Lomonte, 2009).

Este tipo de proteínas homólogas no ejercen actividad catalítica debido a una mutación en un aminoácido del sitio activo; pero aunque estas toxinas carecen de acción lipolítica, producen efectos biológicos similares a los de sus homólogas catalíticamente activas, entre los cuales se destacan la miotoxicidad y la inflamación (Lomonte, 2003).

A pesar de los estudios realizados no se ha establecido cuál es el mecanismo de acción de este tipo de miotoxinas PLA<sub>2</sub> clase II. La caracterización bioquímica de las miotoxinas ha demostrado que existen variaciones en su estructura primaria, las cuales pueden proporcionar sus determinantes moleculares de toxicidad (Romero-Vargas *et al.* 2010). Por lo tanto, la investigación de nuevas variantes de miotoxinas en la biodiversidad natural y su caracterización, en cuanto a su estructura y su acción farmacológica, son de interés a fin de entender mejor el mecanismo de acción de los venenos en el estudio de la fisiopatología de los envenenamientos, así como también orientar en la búsqueda de inhibidores de esas toxinas que puedan ser utilizados en el tratamiento de los pacientes mordidos por esta especie de ofidios, y eventualmente contribuir en el mejoramiento de la producción de antivenenos.

En este trabajo fue aislada y purificada una miotoxina básica del veneno del complejo *Bothrops neuweidi*. Esta proteína constituye el pico mayor de acuerdo al cromatograma obtenido, aproximadamente el 20%, de los componentes básicos del veneno aislados por cromatografía de intercambio iónico y purificada por RP-HPLC, la cual presentó a) actividad miotóxica local, con un rápido aumento de los niveles de la enzima creatina quinasa en suero y cambios en las fibras musculares, alterando la integridad de la membrana plasmática seguido por hipercontracción de los miofilamentos, cambiando su apariencia; b) actividad edematizante, rápido aumento de volumen en la almohadilla plantar de los ratones, pudiéndose deber a la inflamación y al edema y c) alteraciones en la coagulación, extendiendo el tiempo de coagulación, cuando fue ensayada en ratón. Estos efectos han sido descritos en los envenenamientos humanos causados por la especie *Bothrops neuwiedi* (Nishioka & Silveira,1992) como así también experimentalmente cuando se ha inyectado veneno crudo en ratón ( Moura da Silva *et al.* 1991a; Acosta *et al.*1998). Si bien se observó una inhibición de la coagulación, nuestro ensayo *in vivo*, por si solo, no nos permite concluir que la misma se deba al consumo del fibrinógeno directamente, ya que la alteración en el mecanismo de coagulación podría deberse a la alteración de alguno de los pasos de la cascada de coagulación actuando sobre algunos de los factores que participan en la misma.

Además de estas actividades biológicas se observó que la Miotoxina I es capaz de lisar cultivos de células endoteliales y de músculo esquelético, ésta es una característica común que se observó con otras miotoxinas PLA<sub>2</sub> del grupo II de otros venenos de la familia Viperidae (Lomonte *et al.*1999). La actividad citotóxica es una propiedad común de las proteínas aisladas con actividad PLA<sub>2</sub> de venenos de la familia Viperidae. (Lomonte,1999). Las células musculares en cultivo constituyen un modelo para estudiar el mecanismo miotóxico de las PLA<sub>2</sub>, por el tipo de mionecrosis que inducen estas miotoxinas. La diferenciación de mioblastos C2C12 aumentan la sensibilidad citotóxica

de estas proteínas siendo esto una característica específica para el grupo de miotoxinas, produciendo una disrupción rápida de la membrana plasmática, por la presencia de “lesiones delta”, hipercontracción y aglomeración de miofilamentos y necrosis de las células musculares. En nuestro estudio, las células musculares fueron significativamente más sensibles que las células endoteliales tratadas ambas en las mismas condiciones. Estos últimos resultados sugieren que, *in vitro*, cultivo de miotúbulos de músculo esquelético representan un modelo celular adecuado para el estudio de las miotoxinas PLA<sub>2</sub> con estructura del grupo II encontradas en venenos de vipéridos.

Por otra parte, esta miotoxina no muestra toxicidad sistémica significativa cuando se inyectó por vía endovenosa a dosis superiores a 4,4 mg/ kg ratón. Esta baja toxicidad sistémica está de acuerdo con la noción de que las miotoxinas de *Bothrops* no son los principales factores en la acción letal ejercida por sus correspondientes venenos crudos (Gutierrez & Lomonte ,1997).

Los ensayos electroforéticos muestran que la Miotoxina I se encuentra como una proteína homodimérica, con una subunidad que tiene un peso molecular de 15 kD. La estructura de dímero parece ser común en las miotoxinas Lys-49 aisladas de los venenos del género *Bothrops*. La inmunodifusión radial en gel de agarosa muestra que anticuerpos policlonales producidos contra las miotoxinas de *B.asper* reconocen fácilmente a la Miotoxina I de *BnC*, demostrando de esta manera que existen determinantes antigénicos similares entre ambas proteínas.

La secuencia N-amino ácido terminal de la Miotoxina I en estudio, muestra un alto porcentaje de identidad con otras miotoxinas aisladas de la especie *B.asper* (miotoxina IV y II) y la especie *Bothrops jararacussu*, más de 98 % y 92% respectivamente cuando se compara la secuencia aminoacídica. En contraste, se encontró una similitud muy

baja (28% de identidad) en comparación con los primeros 14 residuos de una PLA2 ácida (Bneu-P3) previamente aislada del veneno de la misma especie (Daniele *et al.* 1997). Esta observación apoya el concepto de un proceso evolutivo divergente temprano que separa las PLA2 básicas y ácidas en los venenos ofídicos.

Si bien el aminoácido en la posición 49 de la Miotoxina I de *BnC* debe ser determinado, la alta homología de su parcial secuencia aminoacídica con las PLA2 Lys-49 de otras variantes de venenos de la subfamilia Crotalinae, el eluir como dímero, la ausencia de su actividad catalítica y la acción miotóxica entre sus características, sugiere que ésta pertenece a este grupo de PLA2s. A su vez, las variantes Lys-49 de las PLA2s, además de la sustitución en la posición 49 del aspartato (Asp) conservado catalíticamente activo, tienen una típica secuencia que también está conservada en la Miotoxina I de *BnC*. esta incluye Leu-5, Lys-7, Glu-12, Thr-13, Lys-16, Asn-17, Asn-28 y Leu-32 (Renetseder *et al.*, 1985). Por lo tanto, se infiere que la Miotoxina I de *Bn* es una variante Lys-49 con actividad miotóxica, citolítica e inductora de edema, principalmente.

Pese a que se han dilucidado algunos aspectos importantes en el tema a lo largo de los años, los venenos de vipéridos siguen constituyendo una fuente inagotable de sorpresa y asombro, por su complejidad bioquímica y farmacológica, por su enorme variabilidad y su impacto en la salud pública, y por ser importantes para el desarrollo de nuevas proteínas y sustancias peptídicas de importancia terapéutica.

---

## CONCLUSIONES

- La metodología de estudio empleada permitió aislar una proteína relevante del Complejo *Bothrops neuwiedi*, la cual fue denominada Miotoxina I del complejo *Bothrops neuwiedi*, que se presenta como una proteína básica, homodimérica, con una subunidad de masa molecular de 15 kD, perteneciente al grupo de las PLA<sub>2</sub> Lys-49 por no poseer actividad catalítica, eluir como dímero y por su acción miotóxica.
- El estudio de su secuencia aminoacídica, primeros 40 residuos de aa analizados, muestran un alto porcentaje de identidad con otras proteínas de esta familia PLA<sub>2</sub> Lys-49, halladas en venenos de otras especies del género *Bothrops*, *Agkistrodom* y *Trimeresurus*.
- La Miotoxina I del complejo *Bothrops neuwiedi* induce una serie compleja de eventos degenerativos asociados con sus actividades biológicas que incluyen citotoxicidad *in vitro*, miotoxicidad e inducción de edema *in vivo* y alteraciones en la coagulación sanguínea como la incoagulabilidad .
- Dado que estos son algunos de los daños que provoca el veneno cuando es inoculado a las personas, por los resultados bioquímicos y funcionales obtenidos, y por encontrarse esta toxina en alrededor de un 20% del veneno crudo, se concluye que esta Miotoxina I tiene un papel relevante en el envenenamiento por esta especie ofídica.

## **BIBLIOGRAFIA**

- Acosta de Perez,O.,Koscinczuk P, Teibler P, Sánchez Negrette M, Ruiz R, Maruñak S, Bogarín G.(1998) Hemorrhagic and edema-forming activity and histologic changes in the mouse footpad induced by venoms from Argentinian Bothrops and Crotalus genuses. *Toxicon* Agus 36(8): 1165-72
- Angulo,Y, Gutiérrez JM, Soares AM, Cho W, Lomonte B (2005). Myotoxic and cytolytic activities of dimeric Lys49 phospholipase A2 homologues are reduced, but not abolished, by a pH-induced dissociation. *Toxicon* Sep 1;**46**(3):291-6
- Baker,B., Utaisincharoen, P., Tu, A.T.,(1991) Structure-function relationship of myotoxin a using peptide fragments. *Archs.Biochem.Biophys.***298**, 325-331.
- Baker,B., Tu, A.T., Middlebrook, J.L.(1993) Binding of myotoxin a to cultured muscle cells. *Toxicon* **31**,271-284.
- Bjarnason JB, Hamilton D, Fox JW. (1988). Studies on the mechanism of hemorrhage production by five proteolytic hemorrhagic toxins from *Crotalus atrox* venom. *Biol Chem Hoppe Seyler*.369 Suppl: 121-9.
- Bjarnason JB, Fox JW. (1994) Hemorrhagic metalloproteinases from snake venoms. *Pharmacol Ther.* **62**(3):325-72.
- Bonta, I.L., Vargaftig, B.B., Bohm, G.M.,(1979) Snake venoms as an experimental tool to induce and study models of microvessel damage. In: *Handbook of experimental pharmacology*, vol .**52**, *Snake venoms* (Lee,C.Y., Ed.), pp.629-683. Berlin Springer-Verlag.
- Brusés, J.L., Capaso,J., Katz,E., Pilar,G.(1993) Specific in vitro biological activity of snake venom myotoxins. *J.Neurochem.* **60**,1030-1042.
- Bultrón,E., Gutierrez,J.M., Thelestam, M., (1993a) Effects of *Bothrops asper* (terciopelo) myotoxin III, a basic phospholipase A2, on liposomes and mouse gastrocnemius muscle. *Toxicon* **31**,217-222.

- Bultrón, E., Thelestam, M., Gutierrez, J.M. (1993b) Effects on cultured mammalian cells of myotoxin III, a phospholipase A2 isolated from *Bothrops asper* (terciopelo) venom. *Biochim. Biophys. Acta* **1179**, 253-259.
- Calvete, J.J., Fasoli, E., Sanz, L., Boschetti, E., Righetti, P.G. (2009) Exploring the venom proteome of the western diamondback rattlesnake, *Crotalus atrox*, via snake venomomics and combinatorial peptide ligand library approaches. *Journal of Proteome Research*, 8 (6).
- Cardoso, J.C., Franca, F.O.S., Wen, F.H., Malaque, C.M.S., Haddad, V. (2009). Animais Peconhentos no Brasil. Biologia, Clínica e Terapêutica dos Acidentes. Sarvier. Sao Paulo.
- Chaves, F., Gutierrez, J.M., Lomonte, B., Cerdas, L. (1989) Histopathological and biochemical alterations induced by intramuscular injection of *Bothrops asper* (terciopelo) venom in mice. *Toxicon* **27**, 1085-1093.
- Chavez F, Barboza M, Gutierrez JM (1995) Pharmacological study of edema induced by venom of the *Bothrops asper* (Terciopelo). *Toxicon* **33**, 331-339.
- Chen, S.F., Li, S.H., Fei, X., Wu, Z.L., (1990) Phospholipase A2- induced lung edema and its mechanism in isolated perfused guinea pig lung. *Inflammation* 14, 267-273.
- Cintra AC, Marangoni S, Oliveira B, Giglio JR. (1993) Bothropstoxin-I: amino acid sequence and function. *J Protein Chem.* 1993 Feb;12(1):57-64.
- Costa de Oliveira, V., Lanari, L.C., Hajos, S.E, de Roodt, A.R. (2011). Toxicity of *Bothrops neuwiedi complex* ("yará chica") venom from different regions of Argentina (Serpentes, Viperidae). *Toxicon* **57**: 680–685.
- Diaz, C., Gutierrez, J.M., Lomonte, B., Genè, J.A. (1991) The effect of myotoxins isolated from *Bothrops* snake venoms on multilamellar liposomes: relationship to phospholipase A2, anticoagulant and myotoxic activities. *Biochim. Biophys. Acta* **1070**, 455-460.
- Diaz, C., Gutierrez, J.M., Lomonte, B. (1992) Isolation and characterization of basic myotoxic phospholipases A2 from *Bothrops godmani* (Godman's pit viper) snake venom

*Archs.Biochem.Biophys.***298**,135-142.

- Daniele,J.J., Bianco,I.D., Fidelio,G.D.(1995) Kinetic and Pharmacologic characterization of phospholipases A<sub>2</sub> from *Bothrops neuwiedii* venom. *Arch.of Bioch.and Bioph.* **318**, 65 –70.
- Daniele, J.J., Bianco,I.D., Delgado,C., Briones Carrillo, D., Fidelio, G.D.(1997) A new phospholipase A<sub>2</sub> isoform isolated from *Bothrops neuwiedii* venom with novel kinetic and chromatographic properties. *Toxicon* **35**, 1205 –1215.
- Dole, V.P.(1956) A relation between non –esterified fatty acids in plasma and the metabolism of glucose.*J.Clin.Invest.* **35**, 150-154.
- Dufton, M.J.(1993) Kill and cure: the promising future for venom research. *Endeavour.* Sep;17(3):138-40.
- Ferreira,L.A.,F.,Henriques,O.B.,Lebrun,I.,Batista,M.B.C.,Prezoto,B.C.,Andreoni,A.S. S., Zelnik,R., Habermehl, G.(1992) Biologically active peptides from *Bothrops jararacussu* venom. In:*Contributions to Autocoid Pharmacology*, pp.209-214. Basel, Birkhauser Verlag.
- Fernandes CA, Borges RJ, Lomonte B, Fontes MR. (2014) A structure-based proposal for a comprehensive myotoxic mechanism of phospholipase A<sub>2</sub>-like proteins from viperid snake venoms. *Biochim Biophys Acta.*1844(12):2265-76
- Gay CC, Leiva LC, Maruñak S, Teibler P, Acosta de Pérez O (2005) Proteolytic, edematogenic and myotoxic activities of a hemorrhagic metalloproteinase isolated from *Bothrops alternatus* venom. *Toxicon.* 46(5):546-54
- Geoghegan,P.; Angulo,Y.; Cangelosi,A.; Diaz,M.; Lomonte,B.(1999) Characterization of a basic phospholipase A<sub>2</sub>-homologue myotoxin isolated from venom of the snake *Bothrops neuwiedii* (yarárá chica) from Argentina. *Toxicon* **37**:1735-1746.
- Gutierrez, J.M., Cerdas,L.(1984) Mecanismo de acción de miotoxinas aisladas de venenos de serpientes. *Rev.Biol.Trop.* **32**, 213-222.

- Gutierrez, J.M., Arroyo,O., Bolaños,R. (1980) Myonecrosis, hemorrhagia, y edema inducidos por el veneno de *Bothrops asper* en ratón blanco. *Toxicon* **18**, 603-610.
- Gutierrez, J.M., Chaves,F., Bolaños,R., Cerdas,L., Rojas,E.,Arroyo, O., Portilla,E. (1981) Neutralización de los efectos locales del veneno de *Bothrops asper* por un antiveneno polivalente. *Toxicon* **19**, 493-500.
- Gutierrez, J.M., Gene,J.A, Rojas , G., Cerdas,L. (1985) Neutralization of proteolytic and hemorrhagic activities of Costa Rican snake venoms by a polyvalent antivenom. *Toxicon* **23**, 887-893.
- Gutierrez, J.M., Chaves,F., Mata, E., Cerdas,L. (1986d) Skeletal muscle regeneration after myonecrosis induced by *Bothrops asper* (terciopelo) venom. *Toxicon* **24**, 223-231.
- Gutierrez, J.M., Chaves,F., Gene, J.A. Lomonte,B.,Camacho,Z., Schosinsky., K. (1989) Myonecrosis induced by a basic myotoxin isolated from the venom of the snake *Bothrops nummifer* (Jumping viper) from Costa Rica. *Toxicon* **27**, 735-746.
- Gutierrez,J.M., Arce,V., Brenes,F., Chaves,F.(1990b) Changes in myofibrillar components after skeletal muscle necrosis induced by a myotoxin isolated from the venom of the snake *Bothrops asper*. *Exp.Mol.Pathol.* **52**, 25-36.
- Gutierrez, J.M., R.Theakston, Warrel, D. (2006) Enfrentando el problema de los envenenamientos por mordedura de serpiente: necesidad de una alianza global. Esta es una publicación de acceso libre distribuida bajo los términos del *Creative Commons Attribution License*.
- Gutierrez, J.M., Lomonte,B.(1997) Phospholipase A2 myotoxins from *Bothrops* snake venoms.In *Venom Phospholipase A2 enzyme: structure, function, and mechanism*,ed R.M.Kini, pp 321-352 John Wiley and Sons, England.
- Gutierrez,J.M., Ownby, C.L., Odell, G.V. (1984) Pathogenesis of myonecrosis induced bby crude venom and a myotoxin of *Bothrops asper*. *Exp.Mol.Pathol.***40**, 367-370.

- Gutierrez,J.M. and Chavez, F.(1980) Efecto proteolítico, hemorrágico mionecrótico de los venenos de los venenos de serpientes costarricenses de los géneros *Bothrops*,*Crotalus* y *Lachesis*. *Toxicon* **18**, 315-321.
- Gutierrez, J.M., Lomonte,B. (1989).Local tissue damage induced by Bothrops snake venoms. A review.*Mem Inst.Butantan* **51**, 211-223.
- Gutierrez,J.M.(1990) Local pathological effects induced by Bothrops snake venoms. *Mem.Inst.Butantan* **52** (supl.), 37 –38.
- Gutierrez,J.M; Nuñez,J.; Diaz,C.; Cintra,A.C.; Homsí-Brandeburgo,M.I.; Giglio, J.R. Skeletal muscle degeneration and regeneration after injection of bothropstoxin-II, a phospholipase A2 isolated from the venom of the snake *Bothrops jararacussu*. *Exp Mol Pathol. Dec*;**55**(3):217-29.
- Gutierrez, J.M., Lomonte,B.(1995) Phospholipase A2 myotoxins from Bothrops snake venoms. *Toxicon* **33**,:1405-24.
- Gutierrez,JM., Rucavado,A. (2000) Snake venom metalloproteinases: their role in the pathogenesis of local tissue damage. *Biochimie* **82** (9-10):841-50.
- Gutierrez,J.M., Rucavado,A., Escalante ,T., Diaz, C., (2005) Hemorrhage induced by snake venom metalloproteinases: biochemical and biophysical mechanisms involved in microvessel damage. *Toxicon* **45**, 997-1011
- Gutierrez,J.M (2016) Understanding and confronting snake envenoming:The harvest of cooperation. *Toxicon* 109, 51-62
- Gutiérrez, JM, Escalante T, Rucavado A, Herrera C (2016) Hemorrhage Caused by Snake Venom Metalloproteinases: A Journey of Discovery and Understanding. *Toxins (Basel)*. **26**;8(4):93.
- Harris,J.B., Cullen,M.J.(1990) Muscle necrosis caused by snake venoms and toxins, *Electron Microsc.Rev.* **3**, 183-211.
- Ho,M., Warrell, D.A., Looreesuwan,S., Phillips, R.E., Chanthavanich,P., Karbwang,J., Supanaranond,W., Viravan, C., Hutton,R.A., Vejcho,S. (1086b) Clinical

significance of venom antigen levels in patients envenomed by Malayan pit viper (*Calloselasma rhodostoma*). *Am.J.Trop.Med.Hyg.* **35**, 579-587.

- Homsí-Brandeburgo, M.I., Queiroz, L.S., Santo-Neto, H., Rodrigues-Simioni, L., Giglio, J.R. (1988) Fractionation of *Bothrops jararacussu* snake venom: partial chemical characterization and biological activity of bothropstoxin. *Toxicon* **26**, 615-627.

- Johnson, E.K., Ownby, C.L. (1993) Isolation of a myotoxin from the venom of *Agkistrodon contortrix laticinctus* (broad-banded copperhead) and pathogenesis of myonecrosis induced by it in mice. *Toxicon* **31**, 243-255.

- Kaiser, E., Michl, H. (1971) Chemistry and Pharmacology of the venoms of *Bothrops* and *Lachesis*. In *Venomous Animals and their venoms*, **cap.2** ed. W. Bucherly, E. Buckley, vol. II. Venomous Vertebrates, pp. 307–318. Academic Press, NY.

- Kerrigan, K.R. (1991) Venomous snakebite in Eastern Ecuador. *Am.J.Trop.Med.Hyg.* **44**, 93-99.

- Kihara, H., Uchikawa, R., Hattori, S., Ohno, M. (1992) Myotoxicity and physiological effects of three *Trimeresurus flavoviridis* phospholipase A<sub>2</sub>. *Biochem.Int.* **28**, 895-903.

- Kini, R.M., Evans, H.J. (1987) Structure-function relationships of phospholipases. The anticoagulant region of phospholipases A<sub>2</sub>. *J.Biol.Chem.* **262**, 14402-14407.

- Kini, R.M., Evans, H.J. (1989b) A model to explain the pharmacological effects of snake venom phospholipases A<sub>2</sub>. *Toxicon* **27**, 613-635.

- Kondo, H.; Kondo, S.; Ikezawa, H.; Murata, R. (1960) Studies on the quantitative method for determination of hemorrhagic activity of Habu snake venom. *Jpn J Med Sci Biol.* **13**:43-52.

- Krizaj, I., Bieber, A.L., Ritonja, A., Gubensek, F. (1991) The primary structure of ammodytin L, a myotoxin phospholipase A<sub>2</sub> homologue from *Vipera ammodytes* venom. *Eur.J.Biochem.* **202**, 1165-1168.

- Lam, B.K., Austen K.F., (1992) Leukotrienes: biosynthesis, release, and actions. In:

Inflammation: *Basic Principles and Clinical Correlates* (Gallin,J.L., Goldstein,I.M., Snyderman, R.Eds.), pp 139-147.NY.Raven Press.

- Laemmli, U.K. (1970) *Nature* **227**, 680-685.
- Laure,C (1975) The primary structure of crotonamine. *Hopper-Seyler 's Z.Physiol.Chem.***356**, 213-215.
- Lomonte ,B., Gutierrez,J.M. (1989) A new muscle damaging toxin , myotoxin II, from the venom of snake *Bothrops asper* (terciopelo). *Toxicon* **27**, 725-733.
- Lomonte,B , Lundgren J, Johansson B, Bagge U.(1994) The dynamics of local tissue damage induced by *Bothrops asper* snake venom and myotoxin II on the mouse cremaster muscle: an intravital and electron microscopic study. *Toxicon*. **32**(1):41-55
- Lomonte, B., Gutierrez,J.M., Furtado,M.F., Otero,R., Rosso, J.P., Vargas,O., Carmona, E., Rovira,M.E. (1990a) Isolation of basic myotoxins from *Bothrops moojeni* and *Bothrops atrox* snake venoms. *Toxicon* **28**, 1137-1146.
- Lomonte,B., Gutierrez,J.M., Ramirez, M., Diaz, C. (1992) Neutralization of myotoxic phospholipases A<sub>2</sub> from the venom of the snake *Bothrops asper* by monoclonal antibodies. *Toxicon* **30**, 239-245.
- Lomonte,B. Tarkowski, A., Hanson,L.A. (1993) Host response to *Bothrops asper* snake venom. Analysis of edema formation, inflammatory cells and cytokines release in a mouse model. *Inflammation* **17**, 93-105.
- Lomonte, B.,Angulo, Y., Rufini,S., Cho,W., Giglio,J.R.,Ohno,M., Daniele, J.J.,Geoghegan, P.A., Gutierrez,J.M.(1999) Comparative study of the cytolytic activity of myotoxic phospholipases A<sub>2</sub> on mouse endothelial (tEnd) and skeletal muscle (C2C12) cells *in vitro*.*Toxicon* **37**, 145-158.
- Lomonte B, Angulo Y, Calderon L. An overview of lysine-49 phospholipase A<sub>2</sub> myotoxins from crotalid snake venoms and their structural determinants of myotoxic action (2003) *Toxicon*. **42** (8): 885-901.
- Lomonte,B., León,G., Angulo,Y.,Rucavado,A.,NuñezV. (2009).Neutralization of

Bothrops asper venom by antibodies, natural products and synthetic drugs: contributions to understanding snakebite envenomings and their treatment. *Toxicon* **54**(7):1012-28

- Mackessy S.(2010) *Toxins and Hemostasis.Trombin-like enzymes in the snake venoms*.Chapter 30.

- Mamede CC, de Sousa BB, Pereira DF, Matias MS, de Queiroz MR, de Moraes NC, Vieira SA, Stanziola L, de Oliveira F.(2016) Comparative analysis of local effects caused by *Bothrops alternatus* and *Bothrops moojeni* snake venoms: enzymatic contributions and inflammatory modulations. *Toxicon*. **117**:37-45.

- Mandelbaum,F.R., Assakura ,M.T., Reichl, A.P.(1984).Characterization of two hemorrhagic factors isolated from the venom of *Bothrops neuwiedii*. *Toxicon*.**22**,193-206.

- Mandelbaum,F.R., Serrano, S., Sakurada, J.K., Rangel, H.A., Assakura,M.T.(1989). Immunological comparison of hemorrhagic principles present in venoms of the *Crotalinae* and *Viperinae* subfamilies. *Toxicon* **27**,169-177.

- Manual de Actividades Bioquímicas de venenos (2000). Instituto Clodomiro Picado Costa Rica. – OPS.

- Mebs,D., Ownby, C.L.(1990) Myotoxic components of snake venoms:their biochemical and biological activities. *Pharmac.Ther*.**48**, 223-236.

- Mebs,D., Ehrenfeld,M., Samejima,Y.(1983) Local necrotizing effect of snake venoms on skin and muscle:relationship to serum creatine kinase. *Toxicon* **21**, 393-404.

- Ministerio de Salud de la Nación. *Guía de Centros antiponzoñosos de la República Argentina*. Edición 2011.

- Ministerio de Salud de la Nación República Argentina- Orduna,T., Lloveras,S.,de Roodt, A., Costa de Oliveira, V., Garcia,S., Haas, A. (2014) *Guía de prevención, diagnóstico, tratamiento y vigilancia epidemiológica de los envenenamientos ofídicos*.

- Moreira,L.Borkow,G., Ovadia,M., Gutierrez, J.M.(1994) Pathological changes

induced by BaH1, a hemorrhagic proteinase isolated from *Bothrops asper* (terciopelo) snake venom, on mouse capillary blood vessels. *Toxicon* **32**, 976-987

- Mora-Obando D, Fernández J, Montecucco C, Gutiérrez JM, Lomonte B. (2014) Synergism between basic Asp49 and Lys49 phospholipase A2 myotoxins of viperid snake venom in vitro and in vivo. *PLoS One*. Oct 7;9(10):
- Moura-da-Silva, A.M. et.all (1990) Antigenic cross reactivity of venoms obtained from snakes of Genus *Bothrops*. *Toxicon* **28**, 181- 188.
- Moura-da-Silva AM, Cardoso DF, Tanizaki MM, Mota I.(1991a)Neutralization of myotoxic activity of *Bothrops* venoms by antisera to purified myotoxins and to crude venoms. *Toxicon* **29**, 713-723.
- Moura-da-Silva,A.M., Desmond,H.,Laing,G., Theakston,R.(1991) Isolation and comparison of myotoxins isolated from venoms of different species of *Bothrops* snake. *Toxicon* **29**, 713-723.
- Nishioka S., Silveira PV.(1992) A clinical and epidemiologic study of 292 cases of lance-headed viper bite in a Brazilian teaching hospital. *Am.J.Trop.Med.Hyg* **47**, 805-810.
- Núñez V, Arce V, Gutiérrez JM, Lomonte B. (2004) Structural and functional characterization of myotoxin I, a Lys49 phospholipase A2 homologue from the venom of the snake *Bothrops atrox*. *Toxicon*. **44**, 91-101.
- Organización Panamericana de la Salud -Universidad de Costa Rica, Instituto Clodomiro Picado (2012) Determinación de actividades toxicas de venenos de serpientes y su neutralización por antivenenos- *Manual de Métodos de laboratorio-OPS*.
- Ouchterlony, O., Nilsson,LA. (1978) Immunodiffusion and immunoelectrophoresis. Handbook of Experimental Immunology. *Blackwell Scientific Publications*, Oxford, pp.19.1-19.44.
- Ownby,C.L.,(1990) Locally acting agents: myotoxins, hemorrhagic toxins and

dermonecrotic factors. In: *Handbook of toxinology* (Shier,W.T.& Mebs,D.,Eds.)pp.602-654.NY.Marcel Dekker.

- Ownby,C.L, Bjarnason, J.W., and Tu, A.T., (1978) Hemorrhagic toxins from rattlesnake (*Crotalus atrox*) venom. Pathogenesis of hemorrhage induced by three purified toxins. *Am.J.Pathol.* **93**,201-218.

- Ownby,C.L., Gutierrez,J.M., Colberg,T.R., Odell,G.V. (1982) Quantitation of myonecrosis induced by myotoxin a from prairie rattlesnake (*Crotalus viridis viridis*) venom. *Toxicon* **20**, 877-885.

- Ownby,C.L, and Gere, C.R., (1987) Pathogenesis of hemorrhage induced by hemorrhagic proteinase IV from timber rattlesnake (*Crotalus horridus horridus*) venom. *Toxicon* **25**, 517-526.

- Ownby,C.L.,Fletcher,J.E.,Colberg,T.(1993) Cardiotoxin 1 from cobra (*Naja naja atra*) venom causes necrosis of skeletal muscle *in vivo*. *Toxicon* **31**, 697-709.

- Perkins, JR; Parker,CE; Tomer,KB.(1993) The characterization of snake venoms using capillary electrophoresis in conjunction with electrospray mass spectrometry: Black Mambas. *Electrophoresis.***14**(5-6):458-68.

- Ponce-Soto LA, Lomonte B, Gutiérrez JM, Rodrigues-Simioni L, Novello JC, Marangoni S.(2007) Structural and functional properties of BaTX, a new Lys49 phospholipase A2 homologue isolated from the venom of the snake *Bothrops alternatus*. *Biochim Biophys Acta*. 2007 Apr;1770(4):585-93. Epub 2006 Dec 15.

- Preston SA, Davis CE, Harris JB.(1990) The assessment of muscle fibre loss after the injection of the venom of *Notechis scutatus* (*Australian tiger snake*) *Toxicon* **28**(2):201-14.

- Public Health Service Policy on Humane Care and Use of Laboratory Animals.(2002)  
Health Research Extension Act of 1985.In: US Department of Health and Human Services Public Law. DHHS, Washington DC.99-158.

- Queiroz, L.S. and Petta, C.A.(1984) Histopathological changes caused by venom of urutu snake (*Bothrops alternatus*)in mouse skeletal muscle.*Rev.Inst.Med.Trop. Sao Paulo* **26**, 247-253.
- Queiroz,L.S., Santo-Neto,H., Brandeburgo,M.I.H., Simioni,L.R. and Giglio, J.R. (1985).Histopathological changes caused by myotoxin from *Bothrops jararacussu* snake venom. Comparison with the effects of whole venom. *Toxicon* **23**, 36.
- Renetseder,R.,Bruine,S., Dijkstra,B.W., Drenth,J., Sigler, P.B.,(1985) A comparison of the crystal structures of phospholipase A2 from bovine pancreas and *Crotalus atrox* venom. *J.Biol.Chem.* **260**, 11627-11634.
- Rojas G, Gutiérrez JM, Gené JA, Gómez M, Cerdas L.(1987) Neutralization of toxic and enzyme activities of 4 venoms from snakes of Guatemala and Honduras by the polyvalent antivenin produced in Costa Rica. *Rev Biol Trop.* Jun;**35** (1):59-67.
- Romero-Vargas FF, Ponce-Soto LA, Martins-de-Souza D, Marangoni S. (2010) Biological and biochemical characterization of two new PLA2 isoforms Cdc-9 and Cdc-10 from *Crotalus durissus cumanensis* snake venom. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol.***51**:66-74.
- Rosenfeld,G.(1971). Symptomatology, pathology and treatment of snake bites in South America. In: *Venomous Animals and their Venoms.* **Vol 2**,pp-345-384.NY, Academic Press.
- Scott DL, Achari A, Vidal JC, Sigler PB (1992) Crystallographic and biochemical studies of the (inactive) Lys-49 phospholipase A2 from the venom of *Agkistrodon piscivorus piscivorus*. *J Biol Chem.* Nov **5**, 267(31):22645-57.
- Shively, J.E.,(1986).In: *Methods of Protein Microcharacterization.*Humana Press, Clifton, p.456.
- Selistre HS, Queiroz LS, Cunha OA, De Souza GE, Giglio JR. (1990) Isolation and characterization of hemorrhagic, myonecrotic and edema-inducing toxins from *Bothrops insularis* (jararaca ilhoa) snake venom. *Toxicon.* **28**(3):261-73.
- Silva,V.X (2008). Taxonomic revision of the *Bothrops neuwiedi* complex (Serpentes,

Viperidae) with description of a new species. *Phyllomedusa* **7**:45-90.

- Theakston RD, Reid HA (1983) Development of simple standard assay procedures for the characterization of snake venom. *Bull World Health Organ.* **61**(6):949-56.
- Traub, P., Mizushima, S., Lowry, C.V., Nomura, M. (1971) Reconstitution of ribosomes from subribosomal components. *Meth. Enzimol.* **20**, 391-404-
- Trebien HA, Calixto JB (1989) Pharmacological evaluation of rat paw oedema induced by Bothrops jararaca venom. *Agents Actions.* Mar; **26**(3-4):292-300.
- Valeriano-Zapana JA, Segovia-Cruz FS, Rojas-Hualpa JM, Martins-de-Souza D, Ponce-Soto LA, Marangoni S. (2012) Functional and structural characterization of a new serine protease with thrombin-like activity TLBan from Bothrops andianus (Andean Lancehead) snake venom. *Toxicon.* **59**(2):231-40.
- van den Bergh CJ, Slotboom AJ, Verheij HM, de Haas GH. (1989) The role of Asp-49 and other conserved amino acids in phospholipases A2 and their importance for enzymatic activity. *J Cell Biochem.* Apr; **39** (4):379-90.
- Volpe P, Damiani E, Maurer A, Tu AT. (1986) Interaction of myotoxin a with the Ca<sup>2+</sup>-ATPase of skeletal muscle sarcoplasmic reticulum. *Arch Biochem Biophys.* Apr; **246**(1):90-7.
- Wang JP, Teng CM. (1990) Rat paw oedema and mast cell degranulation caused by two phospholipase A2 enzymes isolated from Trimeresurus mucrosquamatus venom. *J Pharm Pharmacol.* Dec; **42**(12):846-50.
- Wang JP, Peng HC, Teng CM (1991) Rat hind-paw swelling effect of an edema-producing protein isolated from Trimeresurus mucrosquamatus snake venom. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* Apr; **343**(4):399-404.
- Warrell D.A. (1993) Snake bite and snake venoms. *Q J Med.* Jun; **86**(6):351-3.
- Warrell, D.A. (2004) Snakebites in Central and South America: Epidemiology, clinical features, and clinical management. In Cambell, J.A. Lamar, W.W (Eds). *The venomous reptiles of the Western Hemisphere*, Vol. I 709-761.

- World Health Organization (1981). Progress in the Characterization of Venoms and Standardization of Antivenoms, WHO, Ginebra.
  
- World Health Organization (1990). The biological potency assay of antivenom preparations. Expert Committee on Biological Standardization. WHO, Ginebra.
  
- World Health Organization (2010). Guidelines for the Production Control and Regulation of Snake Antivenom Immunoglobulins. WHO, Ginebra.
  
- World Health Organization (2016). Guidelines for the Production Control and Regulation of Snake Antivenom Immunoglobulins, WHO, Ginebra.
  
- Yoshizumi K<sup>1</sup>, Liu SY, Miyata T, Saita S, Ohno M, Iwanaga S, Kihara H. (1990) Purification and amino acid sequence of basic protein I, a lysine-49-phospholipase A2 with low activity, from the venom of *Trimeresurus flavoviridis* (Habu snake). *Toxicon*.**28**(1):43-54.

