

Notas de los efectos sinérgicos presentes entre varias toxinas de venenos de serpientes y sus posibles mecanismos de inter-relación

Notes of the synergic effects present amid various snake venom toxins and their possible mechanisms of inter-relationship

ALEXIS RODRÍGUEZ-ACOSTA

Resumen

Sinergismo entre toxinas es un importante hallazgo que existe en los venenos de serpiente. El sinergismo ocurre entre muchas de estas toxinas, donde las fosfolipasas A_2 (PLA₂s) (toxinas enteras o sus sub-unidades) son los activadores más importantes. Entre los representantes principales de las toxinas del veneno ofídico están: las metaloproteasas (SVMPs), las fosfolipasas A_2 (PLA₂s), las serina proteasas (SVSPs), las toxinas de tres dedos (3FTxs) y las L-amino oxidasas (L-AAOs), las cuales toman parte en la mayoría de los desarrollos sinérgicos. Estos eventos se expanden por los efectos de amplificación y acompañamiento.

Palabras clave: Mecanismos sinérgicos, sinergismo, serpientes, toxinas, venenos.

Abstract

Synergism is an important occurrence existing in snake venoms. Synergism occurs amid several toxins in most snake venoms, where phospholipase A_2 (PLA₂s) (toxins or subunits) are the most important activators. The principal representatives of snake venom toxins are the PLA₂s, the metalloproteases (SVMPs), the serine proteases (SVSPs), three-finger toxins (3FTxs), and L-AAOs toxins, which take part in the main synergistic developments. These events are widespread by the effects of amplification and escorting

Keywords: Snakes, synergic mechanism, synergism, toxins, venoms.

Introducción

Los venenos de serpiente son mezclas adquiridas durante los procesos evolutivos, que cambian de acuerdo con sus relaciones intergenéticas, alimentación y variables climáticas y geográficas (Pifano y Rodríguez-Acosta, 1996; Aird, 2002; Barlow y col., 2009), las cuales consisten en moléculas bioactivas que inmovilizan y digieren presas, actuando además como defensa contra competidores y

depredadores naturales.

Los venenos de serpiente son sistemas integrados, con variedad de componentes que presentan *per se* funcionalidades relevantes. La existencia de una combinación de toxinas en estos venenos forja un desafío para el estudio del sinergismo y de otras interacciones entre ellas. La evolución de los venenos de serpientes resultado de los mecanismos de adaptación al ambiente

1. Laboratorio de Inmunoquímica y Ultraestructura, Instituto Anatómico "Dr. José Izquierdo", Facultad de Medicina, Universidad Central de Venezuela, Caracas, República Bolivariana de Venezuela.
2. Biotecfar C.A., Facultad de Farmacia, Universidad Central de Venezuela. Caracas, República Bolivariana de Venezuela. Correspondencia: rodriguezacosta1946@yahoo.es ORCID: [0000-0003-1234-7522](https://orcid.org/0000-0003-1234-7522)

y a sus diferentes presas, ha demostrado que existen diferentes toxinas actuando separadamente o más probablemente con mecanismos sinérgicos, para llevar a cabo sus funciones digestivas y/o de defensa.

Los efectos sinérgicos, entre diferentes toxinas, son un espacio para discutir al delinear los anti-venenos de diferentes géneros y especies. Debemos seleccionar la probable subunidad o toxina del veneno, que no posea toxicidad, pero que pueda potenciar la toxicidad de una que, sí lo sea; induciendo el efecto sinérgico, bien como transporte o como anclaje para efectuar su acción (Laustsen, 2016).

El sinergismo es un fenómeno significativo presente en los venenos de serpientes que puede ser una adaptación estratégica para potenciar la acción de unas toxinas con otras. Como primer ejemplo, tenemos las fosfolipasas A_2 (PLA_2) (toxinas o subunidades) como principales facilitadores. Siguiendo con las metaloproteasas (SVMP), las serina proteasas (SVSP) y las toxinas de los tres dedos (3FTxs), las cuales juegan un papel esencial en los procesos sinérgicos.

Esta descripción general de los efectos sinérgicos ya descubiertos en varios venenos de serpiente y sus posibles mecanismos, junto con los métodos apropiados para evaluar el sinergismo, es importante para discernir los variados efectos fisiopatológicos y además como herramienta cognitiva en el desarrollo de anti-venenos o inhibidores más eficientes.

SINERGISMO ENTRE COMPONENTES TÓXICOS DE VENENOS OFÍDICOS

Los venenos de serpientes son sistemas multicomponentes integrados (Groten y col., 2001). El aislamiento y la caracterización de

toxinas individuales ha sido la conducta de investigación, sin embargo, la caracterización de los perfiles de toxicidad del veneno mediante la evaluación de sinergismos potenciales, que puedan existir entre sus diversos componentes, debería ser la norma, ya que el efecto conjunto es mayor que la suma de sus potencias individuales, originando el concepto que se describe como sinergia (Berenbaum, 1989; Groten y col., 2001), lo cual hace que los venenos alcancen una eficiencia significativa con solo una pequeña cantidad de ellos.

Se ha demostrado también, que cuando se purifican fracciones de algunos venenos y se inyectan separadamente, éstas, a las dosis inyectadas, no son fatales para los animales experimentales, mientras que una concentración correspondiente de veneno crudo entero fue suficiente para matarlos en pocos minutos. Esto sugiere que las diferentes fracciones actuaron sinérgicamente (Strydom, 1976). Los efectos sinérgicos, también se describen en venenos arácnidos y escorpiónicos (Lazarovici y col., 1984; Wullschleger y col., 2005).

El mayor peso en la actividad de los venenos ofídicos descansa en un grupo de proteínas con actividad enzimática, pero con componentes muy activos sin dicha actividad, que actúan por activación de desarrollos fisiológicos, como proteínas nodrizas y a modo de inhibidores de otros procesos (Devi, 1968).

Dentro de fracciones con actividad enzimática, se circunscriben las fosfolipasas A_2 , metaloproteasas, serina proteasas, L-aminoácidos oxidasas, fosfodiesterasas, hialuronidasas, nucleasas y acetilcolinesterasas. Del grupo sin actividad enzimática, se incluyen toxinas de tres dedos, desintegrinas, inhibidores de serina

proteasa, proteínas secretoras ricas en cisteína y lectinas de tipo C (Brahma y col., 2015).

Durante los últimos años, ha habido un rápido aumento en el aislamiento y análisis molecular de las toxinas presentes en el veneno de serpientes. Esto ha contribuido a la comprensión y caracterización de los diversos componentes bioquímicos, actividades farmacológicas y toxicológicas de estas toxinas, así como la posible interacción entre ellas (Nawarak y col., 2003).

Las fosfolipasas A_2 (SVPLA₂), las metaloproteasas (SVMP), y las serina proteasas (SVSP) son los tres componentes enzimáticos principales de la familia de proteínas del veneno de serpiente.

Las toxinas de tres dedos (3FTxs), las desintegrinas, las lectinas de tipo C y una amplia variedad de neurotoxinas son polipéptidos no enzimáticos.

Las PLA₂ de veneno de serpiente (svPLA₂) catalizan específicamente la hidrólisis dependiente de Ca^{2+} del enlace acilo glicerofosfolípido sn-2 graso, que libera tanto lisofosfolípidos como ácidos grasos libres (Van Deenen y De Haas, 1983).

Las SVPLA₂ ejercen una impresionante variedad de efectos tóxicos y farmacológicos como componentes que actúan solos o en conjunto de forma sinérgica. Estos efectos incluyen neurotoxicidad, cardiotoxicidad, miotoxicidad, hemorragia, hemólisis, así como edema, convulsiones, hiperalgesia, inflamación, hipotensión, inhibición de la agregación plaquetaria y anticoagulación.

Se han descrito dos genes PLA₂ ancestrales divergentes que representan las bases de los grupos I y II. Los PLA₂ del

Grupo I fueron aisladas y expresadas en las secreciones de las glándulas de veneno de serpiente de Elapidae (kraits y cobras) e Hydrophidae (serpientes marinas) (Six y Dennis, 2000). Los PLA₂ del Grupo II existen principalmente en las familias Crotalidae (serpientes de cascabel norteamericanas) y Viperidae (Dennis y col., 2011).

Las metaloproteasas de veneno de serpiente (SVMP) son las principales toxinas en los venenos de la mayoría de Crotalidae y Viperidae (Bjarnason y Fox, 1994); junto con ADAM (una desintegrina y metaloproteinasa) y el ADAMTS relacionado: ADAM con motivo de trombospondina tipo 1, las SVMP constituyen la familia de reprotinas/adamalisinas con organización de dominio general compartida (Fox y Serrano, 2005).

Las SVMP son proteasas, en su mayoría dependientes de zinc que tienen masas moleculares entre ~20 y 110 kDa. Se clasifican en clases P-I a P-III según su estructura de dominio (Jia y col., 1996). Las SVMP P-I son la clase más sencilla, contienen solo un dominio de metaloproteasa (M); las SVMP P-II se componen de un dominio M y un dominio de desintegrina (D); las SVMP P-III contienen los dominios M y D más un dominio rico en cisteína (C). Hay una clase heterotrimérica de SVMP con dos lectinas de dominio tipo C adicionales (snaclec) (Clemetson, 2010; Zanotto y col., 2019), que también se incluyen en el grupo P-III como una subclase (P-III_d).

Las SVMP juegan un rol significativo en patologías relacionadas con las hemorragias locales y sistémicas, las mionecrosis, las flictenas, e incluso llevando a los pacientes a una hipovolemia y a procesos inflamatorios (Markland, 1998; Rengifo y Rodríguez-Acosta, 2019). Las SVMP, principalmente las

P-III, tienen una mayor actividad hemorrágica y mayor diversos efectos biológicos que las SVMP P-I (Bjarnason y Fox, 1994), degradando componentes que integran las membranas basales de las células endoteliales (laminina, nidógeno, fibronectina, colágeno tipo IV y proteoglicanos), rompiendo drásticamente la pared del vaso y produciendo hemorragias (Baramova y col., 1989); también pueden interferir con la hemostasia a través de actividades fibrinogenolíticas o fibrinolíticas (Salazar y col., 2007; Sánchez y col., 2014), activación de protrombina y/o factor X (Morita y Iwanaga, 1981; Yamada y col., 1996) e inhibición de agregación de plaquetas (Sánchez y col., 2009; Da Silva y col., 2009; Suntravat y col., 2016).

Otro grupo de toxinas de veneno de serpiente son las serina proteasas (SVSP), estas presentan masas moleculares que oscilan entre 26 y 67 kDa, catalizan la escisión del péptido covalente en el lado C-terminal de residuos de aminoácidos cargados positivamente (Di Cera, 2009). Los SVSP están presentes en los venenos de Viperidae, Elapidae y Colubridae. Las SVSP afectan la coagulación sanguínea, inducen agregación plaquetaria, fibrinólisis, actúan sobre sistema del complemento y el sistema inmunológico (Kini, 2005). Los SVSP similares a la trombina convierten el fibrinógeno en coágulos de fibrina, liberando fibrinopéptidos A y B de las cadenas $A\alpha$ y $B\beta$ del fibrinógeno, respectivamente. Además de la acción sobre el fibrinógeno; también participan en la estimulación de la cascada de coagulación mediante los factores de activación V, VIII y XIII (y posiblemente factor VII y XI), además, estimulan la fibrinólisis y activan la agregación plaquetaria (Castro y col., 2004; Sajevec y col., 2011).

Un diferente conjunto de importantes toxinas son las de tres dedos ("three fingers

toxins") (3FTxs), las cuales juegan un papel esencial en los procesos de sinergismo. Tanto induciendo la amplificación tóxica o sirviendo como acompañante. Las 3FTxs son polipéptidos no enzimáticos que contienen 60-74 residuos de aminoácidos (Fry y col., 2003a; Pahari y col., 2007a). Son abundantemente en los venenos de elapideos (cobras, kraits y mambas) (Fry y col., 2003a) y en Hydrophis (serpientes marinas) (Pahari y col., 2007b); también se han descrito en venenos de colúbridos (Fry y col., 2003b; Pawlak y col., 2006) y en transcriptomas de glándulas de veneno de vipéridos y crotálicos (Jiang y col., 1987; Pahari y col., 2007a, b). A pesar de la semejanza en su estructura, los 3FTx presentan distintas actividades biológicas. Los miembros de esta familia de toxinas incluyen α -neurotoxinas, κ -neurotoxinas (las más frecuentes), fasciculinas, calciseptina, toxinas muscarínicas, cardiotoxinas, citotoxinas, y dendroaspinas (Tsetlin, 1999).

Las cardiotoxinas/citotoxinas son el segundo grupo más grande de 3FTx y se encuentran abundantemente en el veneno de la mayoría de las serpientes elápidas, particularmente en las cobras (Tan, 1982), ejerciendo efectos citolíticos/hemolíticos mediante la formación de poros en las membranas lipídicas (Bilwes y col., 1994).

El índice de toxicidad es uno de los métodos cuantitativos para evaluar el sinergismo, ya que los venenos de serpientes exhiben una toxicidad considerable que puede resultar de la acumulación o los efectos sinérgicos de múltiples toxinas. Los constituyentes interactúan entre sí directamente o conducen indirectamente a una potencia toxicológica y farmacológica mejorada de los venenos. La mayoría de los sinergismos de toxinas se han identificado cuando las familias de proteínas

predominantes (PLA₂, 3FTx, SVMP y SVSP) se administraron conjuntamente. Además de estas acciones sinérgicas complejas, la interacción entre las proteínas de veneno de serpiente (principalmente complejos PLA₂) también contribuye significativamente hacia el incremento de la potencia de los componentes individuales del complejo. Esto agrega otra dimensión a la diversidad estructural y funcional de las toxinas del veneno.

A continuación, presentamos una síntesis de algunos ejemplos de acciones sinérgicas entre toxinas de veneno de serpiente, proporcionando una descripción general de algunas estrategias sinérgicas entre las toxinas, que pueden ayudar a entender los procesos fisiopatológicos y clínicos, así como dar información para permitir el desarrollo de mejores anti-venenos o inhibidores, conociendo las interacciones entre ellas.

Como vemos, ciertas proteínas forman complejos covalentes o no covalentes con otras proteínas o péptidos para inducir actividades farmacológicas más potentes. Estas interacciones sinérgicas entre la proteína del veneno y las subunidades complejas aumentan de manera posible, la potencia tóxica del veneno de serpiente, tal como la subunidad PLA₂, la cual participa en muchos complejos tóxicos, que son principalmente potentes neurotoxinas.

Entre las estrategias sinérgicas de los complejos de toxinas, los cuales existen como monómeros en el veneno, exhibiendo actividades farmacológicas por sí mismos, tal como la sub-unidad, PLA₂, la cual participa en muchos complejos de proteínas de veneno, que terminan siendo neurotoxinas muy potentes. La subunidad individual (PLA₂) contribuye

significativamente a la estructura integrada y a la función elevada de los complejos tóxicos del veneno.

La Crotoxina del veneno del cascabel (*Crotalus durissus terrificus*, *Crotalus durissus cumanensis*) es un heterodímero formado por una fracción ácida inactiva (crotapotina), no tóxica, que al unirse a una fracción básica tóxica (PLA₂), son capaces de potenciar la neurotoxicidad, donde la crotapotina actúa como acompañante para potenciar la unión específica (Bon, 1982; Faure y col., 1993; Hernández y col., 2007). Se ha observado un sinergismo entre la crotoxina y la crotamina, un polipéptido miotóxico con propiedades de penetración celular (Sánchez y col., 2018), que puede facilitar la internalización (Sribar y col., 2014) de las subunidades B del complejo de crotoxina y así potenciar su toxicidad neuronal.

La β-Bungarotoxina (*Bungarus multicinctus*), también heterodimérica, con un componente tóxico (PLA₂) unido a un péptido similar a BPTI2, donde el péptido similar a BPTI ayuda a la PLA₂ a unirse al sitio pre-sináptico y potencia la neurotoxicidad (Kondo y col., 1978). Las β-bungarotoxinas, que se comportan como neurotoxinas presinápticas, se sinergizan con α-bungarotoxina y κ-bungarotoxina (3FTxs) post-sinápticas para bloquear la transmisión neuromuscular y producir insuficiencia respiratoria después de un envenenamiento letal por kraits (Ziganshin y col., 2015).

La toxina del cascabel Mojave (*Crotalus s. scutulatus*), otro heterodímero con un componente ácido inactivo (PLA₂) no tóxico, unido a un elemento tóxico básico activo (PLA₂), que potencian la neurotoxicidad y la miotoxicidad sistémica, donde el

componente ácido inactivo actúa como acompañante (Cate y Bieber, 1978).

La viperotoxina F (*Vipera russelli formosensis*), un heterodímero formado por una fracción ácida (PLA₂) no tóxica de baja actividad y una básica tóxica activa (PLA₂), las cuales juntas potencian la neurotoxicidad, donde la fracción ácida actúa como inhibidor y acompañante (Perbandt y col., 2003).

La proteína CB aislada del veneno de la serpiente *Pseudocerastes fieldi*, un heterodímero integrado por una fracción ácida (PLA₂), activa no tóxica y una básica (PLA₂), activa, poco tóxica, que juntas aumentan alrededor de 4 veces la neurotoxicidad, donde la fracción básica actúa como acompañante, aumentando la unión específica (Bdolah y col., 1985).

La fosfolipasa PLA₂-I aislada del veneno de la víbora *Vipera aspis zinnikeri* es un heterodímero, con una fracción ácida (PLA₂) inactiva y no tóxica, unida a una proteína básica tóxica y activa, que potencian la neurotoxicidad; la subunidad inactiva actúa como acompañante (Komori y col., 1996).

La toxina taipoxin derivada del veneno de la serpiente *Oxyuranus s. scutellatus* es un trímero con un componente α -PLA₂ básico muy tóxico, unido a otro componente β -PLA₂ no tóxico y un tercer componente de baja toxicidad γ -PLA₂. Después de unidas todas las sub-unidades hay una máxima neurotoxicidad, donde la subunidad γ actúa como acompañante para potenciar la toxicidad de la subunidad α (Fohlman y col., 1977).

Últimamente, autores (Venkatesh y Gowda, 2013) han reconocido e identificado en el veneno de la serpiente *Daboia russelii*,

un complejo hemorrágico (DR-HC-I) que contenía una PLA₂ y un péptido no enzimático (DNTx-II). Aisladamente, PLA₂ y DNTx-II no producían efectos hemorrágicos, mientras que la combinación produjo una interacción sinérgica, que generó una intensa hemorragia. La DNTx-II tenía una función de chaperona, que le permitía a las fosfolipasas, adherirse selectivamente a la membrana.

La paradoxina aislada del veneno de *Oxyuranus microlepidotus* (Hodgson y col., 2007) y Cannitoxina aislada del veneno de *Oxyuranus scutellatus canni* (Kuruppu y col., 2005) son homólogos de taipoxina. Estructuralmente, tienen subunidades similares y funcionalmente, sus subunidades tienen el mismo mecanismo sinérgico.

La vipoxina es un complejo neurotóxico post-sináptico heterodimérico aislado del veneno de *Vipera ammodytes meridionalis* (serpiente búlgara) (Tchorbanov y col., 1978). Tiene un efecto catalítico, no tóxico en su sub-unidad ácida inerte (INH) que provoca una disminución de 5 veces, en los efectos letales de la PLA₂ de su sub-unidad fuertemente tóxica. La subunidad PLA₂ tiene acción pre-sináptica, pero, cuando se combina con INH, este complejo es "encaminado" al sitio post-sináptico.

Existen variados sinergismos relacionados con svPLA₂s; para los venenos hemorrágicos, las PLA₂ con acción anti-plaquetaria pueden sinergizar con desintegrinas y diversas proteínas de unión de tipo lectina C, que inducen trombocitopenia (Niewiarowski y col., 1994). Las PLA₂ altamente catalíticos liberan lisofosfolípidos, que podrían afectar la membrana y activar la agregación plaquetaria.

Las PLA₂ también se interrelacionan con las L-aminoácidos oxidasas (LAAOs), las cuales comprenden del 1 al 9% de la proteína total del veneno de las familias de serpiente de Viperidae, Crotalidae y Elapidae (Pineda y Rodríguez-Acosta, 2020), generando H₂O₂ para provocar intensos efectos antiplaquetarios y sinergizar con anti-plaquetarios PLA₂ en el mismo veneno (Izidoro y col., 2006).

En el análisis de los complejos sinérgicos 3FTxs, también se han descrito efectos sinérgicos similares. En un anticoagulante aislado y caracterizado del veneno de *Hemachatus haemachatus* (cobra africana de Ringhals), la cual contiene dos anticoagulantes sinérgicos de la familia 3FTx, las proteínas, hemextina A y hemextina B. Solo la hemextina A individualmente exhibió leve actividad anticoagulante. Sin embargo, la hemextina B forma un complejo heterotetramérico 1: 1 con la hemextina A, y mejora sinérgicamente la potencia anticoagulante de la hemextina A; también inhibiendo de forma enérgica la actividad proteolítica del factor de coagulación sanguínea VIIa, sobre el factor tisular soluble recién expuesto, en ausencia de factor Xa (Banerjee y col., 2005; Banerjee y col., 2007).

Algunas 3FTx de veneno de serpiente mamba potencian la toxicidad de otras toxinas. Por ejemplo, S2C4 aislado del veneno de *Dendroaspis jamesoni kaimosae* (mamba de Jameson) interactúa con toxinas de tipo angusticeps para producir un efecto sinérgico marcado, que supera en exceso las toxicidades individuales (Joubert y Taljaard, 1979). La base molecular exacta de los sinergismos y si estas toxinas interactúan entre sí para formar un complejo proteico dentro del veneno, que aún no se conoce con exactitud.

En el estudio de los complejos sinérgicos de las SVMP, solo algunas de clase P-III (P-IIIId) forman complejos, ya que tienen un sub-unidad covalente o no covalente. Uno de estos complejos, RVV-X, tiene sub-unidades adicionales, compuesta por dos dominios lectina de tipo C, unidas a la cadena principal de proteasa, por puentes disulfuro, que activa el factor X aislado del veneno de la víbora de Russell (Jayanthi y Gowda, 1990); TI-I y TI-II son dos inhibidores de tripsina del mismo veneno. Estas tres toxinas administradas individualmente, no fueron letales para los animales experimentales. Sin embargo, cuando se mezclaron, TI-II y RVV-X, estas se sinergizaron y potenciaron la toxicidad de la otra. Concretamente, la actividad inductora de edema de RVV-X aumentó notablemente en presencia de dosis de TI-I y TI-II, las cuales individualmente no inducían edema (Jayanthi y Gowda, 1990).

Se ha descrito una toxina snacles no enzimática (Lectina tipo C) en el veneno del cascabel de Uraoa (*Crotalus vegrandis*) con actividad coagulante. La proteína purificada (uracolectin) con las secuencias N-terminal DLPSGWSSYEGH y DGPSGWSSYEGH se relacionaban con lectinas de tipo C con actividad coagulante, aisladas del veneno de serpientes *Crotalus oreganus helleri*, *C. adamanteus rattlesnakes* y *Habu Protrobothrops flavoviridis* (Girón y col., 2020). Estas subunidades lectina tipo C, no enzimáticas imparten propiedades distintas, actuando junto con enzimas proteolíticas; en consecuencia, desempeñan un papel fundamental en el reconocimiento y la selectividad del sustrato, lo que permite que la proteasa acompañante ejerza su actividad proteolítica (Kini, 1996). Estas proteínas coagulantes forman una combinación de metaloproteasa-lectina que se une a la

protrombina o al factor X de coagulación (Girón y col., 2020).

Finalmente, existe un elevado número de métodos cuantitativos para evaluar el sinergismo de toxinas. La presencia de sinergismo entre las toxinas del veneno generalmente se evalúa determinando si la administración concomitante de diferentes componentes de veneno crudo, que aumentan significativamente la potencia letal, o los efectos patológicos de las toxinas individuales *in vitro* o *in vivo*. El uso de tecnologías proteómicas y transcriptómicas ha permitido una determinación general de la presencia de sinergismo entre venenos de serpientes mediante el índice de toxicidad.

En conclusión, las toxinas de los venenos de serpiente no son moléculas ubicadas en espacios estancos, sino que necesitan acompañantes para ejercer la mayoría de sus funciones tóxicas.

Referencias bibliográficas

- Aird SD. 2002. Ophidian envenomation strategies and the role of purines. *Toxicon* 40(4): 335–393.
- Banerjee Y, Mizuguchi J, Iwanaga S, Kini RM. 2005. Hemextin AB complex, a unique anticoagulant protein complex from *Hemachatus haemachatus* (African Ringers cobra) venom that inhibits clot initiation and factors VIIa activity. *J Biol Chem* 280(52): 42601–42611.
- Banerjee Y, Lakshminarayanan R, Vivekanandan S, Anand GS, Valiyaveetil S, Kini RM. 2007. Biophysical characterization of anticoagulant hemextin AB complex from the venom of snake *Hemachatus haemachatus*. *Biophys J* 93(11): 3963–3976.
- Baramova EN, Shannon JD, Bjarnason JB, Fox JW. 1989. Degradation of extracellular matrix proteins by hemorrhagic metalloproteinases. *Arch Biochem Biophys* 275(1): 63–71.
- Barlow A, Pook CE, Harrison RA, Wuster W. 2009. Coevolution of diet and prey-specific venom activity supports the role of selection in snake venom evolution. *Proc Biol Sci* 276(1666): 2443–2449.
- Bdolah A, Kinamon S, Batzri-Izraeli R. 1985. The neurotoxic complex from the venom of *Pseudocerastes fieldi*. Contribution of the nontoxic subunit. *Biochem Int* 11(4): 627–636.
- Berenbaum MC. 1989. What is synergy? *Pharmacol Rev* 41(2): 93–141.
- Bilwes A, Rees B, Moras D, Menez R, Menez A. 1994. X-ray structure at 1.55 Å of toxin gamma, a cardiotoxin from *Naja nigricollis* venom. Crystal packing reveals a model for insertion into membranes. *J Mol Biol* 239(1): 122–136.
- Bjarnason JB, Fox JW. 1994. Hemorrhagic metalloproteinases from snake venoms. *Pharmacol Therap* 62(3): 325–372.
- Bon C. 1982. Synergism of the two subunits of crotoxin. *Toxicon* 20(1): 105–109.
- Brahma RK, McCleary RJR, Kini RM, Doley R. 2015. Venom gland transcriptomics for identifying, cataloging, and characterizing venom proteins in snakes. *Toxicon* 93: 1–10.
- Castro HC, Zingali RB, Albuquerque MG, Pujol-Luz M, Rodrigues CR. 2004. Snake venom thrombin-like enzymes: from reptilase to now. *Cell Mol Life Sci* 61(7): 843–856.
- Cate RL, Bieber AL. 1978. Purification and characterization of Mojave (*Crotalus scutulatus scutulatus*) toxin and its subunits. *Arch Biochem Biophys* 189(2): 397–408.
- Clemetson KJ. 2010. Snaclecs (snake C-type lectins) that inhibit or activate platelets by binding to receptors. *Toxicon* 56:1236–1246.
- Da Silva M, Lucena S, Aguilar I, Rodríguez-Acosta A, Salazar AM, Sánchez EE, Girón M E, Arocha-Piñango CL, Guerrero B. 2009. Anti-platelet effect of cumanastatin 1, a disintegrin isolated from South American *Crotalus rattlesnake*. *Thromb Res* 123:731–739.
- Dennis EA, Cao J, Hsu YH, Magrioti V, Kokotos G. 2011. Phospholipase A(2) Enzymes: Physical Structure, Biological Function, Disease Implication, Chemical Inhibition, and Therapeutic Intervention. *Chem Rev* 111(10): 6130–6185.
- Devi A. 1968. The protein and non-protein constituents of snake venoms: Venomous animals and their venoms. Vol. II. Venomous vertebrates. Bucherl W, Buckley EE, Deulofen V (Eds). Academic Press, New York, 119–160.

- Di Cera E. 2009. Serine Proteases. IUBMB life 61(5): 510–515.
- Faure G, Harvey AL, Thomson E, Saliou B, Radvanyi F, Bon C. 1993. Comparison of crotoxin isoforms reveals that stability of the complex plays a major role in its pharmacological action. Eur J Biochem 214(2): 491–496.
- Fohlman J, Lind P, Eaker D. 1977. Taipoxin, an extremely potent presynaptic snake venom neurotoxin. Elucidation of the primary structure of the acidic carbohydrate-containing taipoxin-subunit, a phospholipase homolog. FEBS Letters 84(2): 367–371.
- Fox JW, Serrano SMT. 2005. Structural considerations of the snake venom metalloproteinases, key members of the M12 reprotolysin family of metalloproteinases. Toxicon 45(8): 969–985.
- Fry BG, Wuster W, Kini RM, Brusich V, Khan A, Venkataraman D, Rooney AP. 2003a. Molecular evolution and phylogeny of elapid snake venom three-finger toxins. J Mol Evol 57(1): 110–129.
- Fry BG, Lumsden NG, Wuster W, Wickramaratna JC, Hodgson WC, Kini RM. 2003b. Isolation of a neurotoxin (alpha-colubritoxin) from a nonvenomous colubrid: evidence for early origin of venom in snakes. J Mol Evol 57(4): 446–452.
- Girón ME, Ramos MI, Cantillo AC, Oramas JA, Sánchez EE, Jiménez JC, Suntravat M, Navarrete LF, Rodríguez-Acosta A. 2020. Haemostatic and biological activities of the uracoan rattlesnake (*Crotalus vegrandis*) venom: isolation of a new snake-like uracolectin with coagulant activity. SABER UDO 32:22–33.
- Groten JP, Feron VJ, Suhnel J. 2001. Toxicology of simple and complex mixtures. Trends Pharmacol Sci 22(6): 316–322.
- Hernández M, Scannone H, Finol HJ, Pineda ME, Fernández I, Vargas AM, Girón ME, Aguilar I, Rodríguez-Acosta A. 2007. Alterations in the ultrastructure of cardiac autonomic nervous system triggered by crotoxin from rattlesnake (*Crotalus durissus cumanensis*) venom. Exp Toxicol Pathol 59(2):129–137.
- Hodgson WC, Dal Belo CA, Rowan EG. 2007. The neuromuscular activity of paradoxin: a presynaptic neurotoxin from the venom of the inland taipan (*Oxyuranus microlepidotus*). Neuropharmacol 52(5): 1229–1236.
- Izidoro LFM, Ribeiro MC, Souza GRL, Sant'Ana CD, Hamaguchi A, Homsí-Brandeburgo MI, Goulart L.R, Belebóni RO, Nomizo A, Sampaio SV, Soares AM, Rodrigues VM. 2006. Biochemical and functional characterization of an L-amino acid oxidase isolated from *Bothrops pirajai* snake venom. Bioorg Med Chem 14(20): 7034–7043.
- Jayanthi GP, Gowda TV. 1990. Synergistic interaction of a protease and protease inhibitors from Russell's viper (*Vipera russelli*) venom. Toxicon 28(1): 65–74.
- Jia LG, Shimokawa K, Bjarnason JB, Fox JW. 1996. Snake venom metalloproteinases: structure, function, and relationship to the ADAMs family of proteins. Toxicon 34(11-12): 1269–1276.
- Jiang M, Haggblad J, Heilbronn E. 1987. Isolation and pharmacological characterization of a new alpha-neurotoxin (alpha-AgTx) from venom of the viper *Agkistrodon halys* (Pallas). Toxicon 25(9): 1019–1022.
- Joubert FJ, Taljaard N. 1979. Snake venoms. The amino-acid sequence of protein S2C4 from *Dendroaspis jamesoni kaimosae* (Jameson's mamba) venom. Hoppe-Seyler's Zeitschrift Physiol Chem 360(4): 571–580.
- Kini RM. 1996. Are C-type lectin-related proteins derived by proteolysis of metalloproteinase/disintegrin precursor proteins? Toxicon 34(11-12):1287–1294.
- Kini RM. 2005. Serine proteases affecting blood coagulation and fibrinolysis from snake venoms. Pathophysiol Haemost Thromb 34(4-5): 200-204.
- Komori Y, Masuda K, Nikai T, Sugihara H. 1996. Complete primary structure of the subunits of heterodimeric phospholipase A2 from *Vipera a. zinnikeri* venom. Arch Biochem Biophys 327(2): 303–307.
- Kondo K, Toda H, Narita K. 1978. Characterization of phospholipase A activity of beta1-bungarotoxin from *Bungarus multicinctus* venom. Its enzymatic properties and modification with p-bromophenacyl bromide. J Biochem 84(5): 1291–1300.
- Kuruppu S, Reeve S, Banerjee Y, Kini RM, Smith AI, Hodgson WC. 2005. Isolation and pharmacological characterization of cannitoxin, a presynaptic neurotoxin from the venom of the Papuan Taipan (*Oxyuranus scutellatus canni*). J Pharmacol Exp Therap 315(3): 1196–1202.
- Laustsen AH. 2016. Toxin synergism in snake venoms. Toxin Rev 35(3-4): 165–170.
- Lazarovici P, Menashe M, Zlotkin E. 1984. Toxicity to crustacea due to polypeptide-phospholipase interaction in the venom of a chactoid scorpion.

- Arch Biochem Biophys 229(1): 270–286.
- Markland FS. 1998. Snake venoms and the hemostatic system. *Toxicon* 36(12):1749–1800.
- Morita T, Iwanaga S. 1981. Prothrombin activator from *Echis carinatus* venom. In: *Methods in Enzymology*. Academic Press, New York, pp. 303–311.
- Nawarak J, Sinchaikul S, Wu CY, Liao MY, Phutrakul S, Chen ST. 2003. Proteomics of snake venoms from Elapidae and Viperidae families by multidimensional chromatographic methods. *Electrophoresis* 24(16): 2838–2854.
- Niewiarowski S, McLane MA, Kloczewiak M, Stewart GJ. 1994. Disintegrins and other naturally occurring antagonists of platelet fibrinogen receptors. *Sem Hematol* 31(4): 289–300.
- Pahari S, Bickford D, Fry BG, Kini RM. 2007a. Expression pattern of three-finger toxin and phospholipase A2 genes in the venom glands of two sea snakes, *Lapemis curtus* and *Acalyptophis peronii*: comparison of evolution of these toxins in land snakes, sea kraits and sea snakes. *BMC Evol Biol* 7: 175.
- Pahari S, Mackessy SP, Kini RM. 2007b. The venom gland transcriptome of the Desert Massasauga rattlesnake (*Sistrurus catenatus edwardsii*): towards an understanding of venom composition among advanced snakes (Superfamily Colubroidea). *BMC Mol Biol* 8: 115.
- Pawlak J, Mackessy SP, Fry BG, Bhatia M, Mourier G, Fruchart-Gaillard C, Servent D, Menez R, Stura E, Menez A, Kini RM. 2006. Denmotoxin, a three-finger toxin from the colubrid snake *Boiga dendrophila* (Mangrove Catsnake) with bird-specific activity. *J Biol Chem* 281(39): 29030–29041.
- Perbandt M, Tsai IH, Fuchs A, Banumathi S, Rajashankar KR, Georgieva D, Kalkura N, Singh TP, Genov N, Betzel C. 2003. Structure of the heterodimeric neurotoxic complex viperotoxin F (RV-4/RV-7) from the venom of *Vipera russelli formosensis* at 1.9 Å resolution. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 59(Pt 10): 1679–1687.
- Pifano F, Rodríguez-Acosta A. 1996. Ecological Niche and redescription of *Crotalus vegrandis* (Serpentes: Crotalidae) in Venezuela. *BRENESIA* 45–46: 169–175.
- Pineda ME, Rodríguez-Acosta A. 2020. The report of some basic L-amino-acid oxidases peptides isolated from the Neotropical Lansberg's hognose viper (*Porthidium lansbergii hutmanni* snake venom from Margarita Island (Venezuela). *Saber UDO* 32:213–221.
- Rengifo C, Rodríguez-Acosta A. *Serpientes, Veneno y Tratamiento Médico en Venezuela*. Caracas: Universidad Central de Venezuela. 2019.
- Sajevic T, Leonardi A, Krizaj I. 2011. Haemostatically active proteins in snake venoms. *Toxicon* 57(5): 627–45.
- Salazar AM, Rodríguez-Acosta A, Girón ME, Aguilar I, Guerrero B. 2007. A comparative analysis of the clotting and fibrinolytic activities of the snake venom (*Bothrops atrox*) from different geographical areas in Venezuela. *Thromb Res* 120:95–104.
- Sánchez EE, Gonzalez R, Lucena S, Garcia S, Finol HJ, Suntravat M, Girón ME, Fernandez I, Rodríguez-Acosta A. 2018. Crotoamine-like from Southern Pacific rattlesnake (*Crotalus oreganus helleri*) venom acts on human leukemia (K-562) cell lines and produces ultrastructural changes on mice adrenal gland. *Ultrast Pathol* 42(2): 116–123.
- Sánchez EE, Rodríguez-Acosta A, Palomar R, Lucena S, Bashir S, Soto JG, Pérez JC. 2009. Colombistatin: a disintegrin isolated from the venom of the South American snake (*Bothrops colombiensis*) that effectively inhibits platelet aggregation and SK-Mel-28 cell adhesion. *Arch Toxicol* 83(3):271–279.
- Sánchez EE, Girón ME, Uzcátegui NL, Guerrero B, Saucedo M, Cuevas E, Rodríguez-Acosta A. 2014. Biochemical and biological characterisation of lancehead (*Bothrops venezuelensis* Sandner 1952) snake venom from the Venezuelan Central Coastal range. *Bol Malariol Sal Amb* 54: 138–149.
- Six DA, Dennis EA. 2000. The expanding superfamily of phospholipase A2 enzymes: classification and characterization. *Biochim Biophys Acta (BBA) - Mol Cell Biol Lip* 1488(1–2): 1–19.
- Sribar J, Oberckal J, Krizaj I. 2014. Understanding the molecular mechanism underlying the presynaptic toxicity of secreted phospholipases A2: An update. *Toxicon* 89(1): 9–16.
- Strydom DJ. 1976. Snake venom toxins. Purification and properties of low-molecular-weight polypeptides of *Dendroaspis polylepis polylepiss* (black mamba) venom. *Eur J Biochem* 69(1):169–176.
- Suntravat M, Helmke TJ, Atpaisit C, Cuevas E, Lucena SE, Uzcátegui NL, Sánchez EE, Rodríguez-Acosta A. 2016. Expression, purification, and

- analysis of three recombinant ECD-disintegrins (colombistatins), from a P-III class snake venom metalloproteinase containing disintegrin-like domains, which in effect inhibit platelet aggregation and SK-Mel-28 cell adhesion. *Toxicon* 122(1): 43–49.
- Tan NH. 1982. Cardiotoxins from the venom of Malayan Cobra (*Naja naja sputatrix*). *Arch Biochem Biophys* 218(1): 51–58.
- Tchorbanov B, Grishin E, Aleksiev B, Ovchinnikov Y. 1978. A neurotoxic complex from the venom of the Bulgarian viper (*Vipera ammodytes ammodytes*) and a partial amino acid sequence of the toxic phospholipase A₂. *Toxicon* 16(1): 37–44.
- Tsetlin V. 1999. Snake venom alpha-neurotoxins and other 'three-finger' proteins. *Eur J Biochem* 264(2): 281–286.
- Van Deenen LLM, De Haas GH. 1963. The substrate specificity of phospholipase A. *Biochim Biophys Acta* 1963. 70(Sup C): 538–553.
- Venkatesh M, Gowda V. 2013. Synergistically acting PLA₂: Peptide hemorrhagic complex from *Daboia russelii* venom. *Toxicon* 73(2): 111–120.
- Wullschlegel B, Nentwig W, Kuhn-Nentwig L. 2005. Spider venom: enhancement of venom efficacy mediated by different synergistic strategies in *Cupiennius salei*. *J Exp Biol* 208(11): 2115–2121.
- Yamada D, Sekiya F, Morita T. 1996. Isolation and characterization of carinactivase, a novel prothrombin activator in *Echis carinatus* venom with a unique catalytic mechanism. *J Biol Chem* 271(9): 5200–5207.
- Zanotty Y, Álvarez M, Perdomo L, Sánchez EE, Girón ME, Suntravat M, Montero Y, Medina R, Navarrete L F, Rodríguez-Acosta A. 2019. Mutacytin-1, a New C-Type Lectin-Like Protein from the Venezuelan Cuaima (*Lachesis muta muta* Linnaeus, 1766) (Serpentes: Viperidae) Snake Venom Inducing Cardiotoxicity in Developing Zebrafish (*Danio rerio*) Embryos. *Zebrafish* 16(4): 379–387.
- Ziganshin RH, Kovalchuk SI, Arapidi GP, Starkov VG, Hoang AN, Thi Nguyen TT, Nguyen KC, Shoibonov BB, Tsetlin VI, Utkin YN. 2015. Quantitative proteomic analysis of Vietnamese krait venoms: Neurotoxins are the major components in *Bungarus multicinctus* and phospholipases A₂ in *Bungarus fasciatus*. *Toxicon* 107(Part B): 197–209.

Recibido: 29/03/2021
Aceptado: 19/04/2021