



UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA
FACULTAD DE MEDICINA
COMISIÓN DE ESTUDIOS DE POSTGRADO
PROGRAMA DE ESTUDIOS INDIVIDUALIZADOS
DE MAESTRÍA Y DOCTORADO

**ESTUDIO BIOQUÍMICO Y PATOLÓGICO DE FRACCIONES CON ACTIVIDAD
FIBRINOLÍTICA DEL VENENO DE LA MAPANARE (*Bothrops colombiensis*).**

Tesis Doctoral presentada como requisito parcial para optar al título
de Doctora en Ciencias, mención Toxinología.

María Eugenia Girón Mendoza

Tutor: F.Alexis Rodríguez-Acosta

Caracas, Julio 2012



Comisión de Estudios de
Postgrado
de la Facultad de Medicina-
UCV

UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA
FACULTAD DE MEDICINA
COMISION DE ESTUDIOS DE POSTGRADO
PROGRAMA DE ESTUDIOS INDIVIDUALIZADOS DE MAESTRÍA Y DE
DOCTORADO

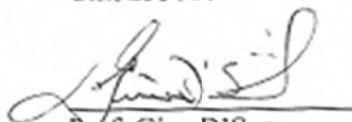
VEREDICTO

Quienes suscriben, miembros del Jurado Examinador, designado por el Consejo de la Facultad de Medicina de la Universidad Central de Venezuela, para examinar el Trabajo de Tesis Doctoral titulado : **“Estudio bioquímico y patológico de fracciones con actividad fibrinolítica del veneno de la mapanare (*Bothrops colombiensis*)”** presentado por: **María Eugenia Girón Mendoza**, titular de la CI: **V-5.044.166** a los fines de cumplir con el requisito legal para optar por el Título Universitario de: Doctor en Ciencias Básicas, Mención Toxinología, dejan constancia de lo siguiente: Leído como fue dicho trabajo por cada uno de los miembros del Jurado, éste fijó el día lunes 23 de julio de 2012 a las 10:00 a.m. para que la autora del mismo lo defendiera en forma pública, tal como está previsto en el reglamento de Estudios de Postgrado de la Universidad Central de Venezuela, lo que la aspirante hizo satisfactoriamente, mediante una exposición oral de su contenido durante 60 minutos, luego de lo cual respondió convenientemente a las preguntas que le fueron formuladas por los miembros del Jurado durante 60 minutos, habiendo concluido la defensa a las 12 m. Finalizada la defensa pública del Trabajo, el Jurado decidió por unanimidad, APROBARLO, por considerar, sin hacerse solidario de las ideas expuestas por la autora, que se ajusta a lo dispuesto y exigido en el Reglamento antes mencionado. Para dar este Veredicto el Jurado estimó que la obra examinada representa una importante contribución al campo de la Toxinología y a la Salud Pública. Con potencial aplicabilidad en el campo Biomédico.

El jurado acordó otorgarle MENCION HONORIFICA, por la alta calidad del trabajo presentado. En fe de lo cual se levanta y firma el presente Veredicto en Caracas a los Veintitrés días del mes de Julio del año 2.012.



Prof. Alexis Rodríguez Acosta
Coordinador
Jurado
C.I.3255684

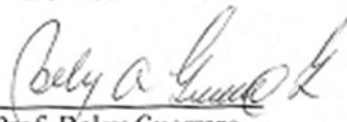


Prof. Gina D'Suze
Jurado
C.I. 4416519

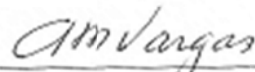


Prof. Elizabeth Merentes
Jurado

C.I. 3565514



Prof. Belsy Guerrero
Jurado
C.I. 5020460



Prof. Alba M. Vargas
Jurado

C.I.2964178

UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA
VICERRECTORADO ACADEMICO
SISTEMA DE INFORMACIÓN CIENTIFICA, HUMANISTICA Y TECNOLÓGICA (SICHT)
FECHA: 23/07/2012

AUTORIZACION PARA LA DIFUSION ELECTRONICA DE LOS TRABAJOS DE LICENCIATURA,
TRABAJO ESPECIAL DE GRADO, TRABAJO DE GRADO Y TESIS DOCTORAL DE LA
UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA

Yo, **María Eugenia Girón Mendoza** autora de la Tesis Doctoral **ESTUDIO BIOQUÍMICO Y PATOLÓGICO DE FRACCIONES CON ACTIVIDAD FIBRINOLÍTICA DEL VENENO DE LA MAPANARE (*Bothrops colombiensis*)**, presentada para optar al Título Universitario de **Doctor en Ciencias Básicas, Mención Toxinología**, autorizo a la Universidad Central de Venezuela, a difundir la versión electrónica de este trabajo, a través de los servicios de información que ofrece la institución, solo con fines académicos y de investigación, de acuerdo a lo previsto en la ley sobre derecho de autor, Artículo 18, 23 y 42 (Gaceta Oficial N° 4.638 Extraordinaria, 01-10-1993)

X	Si autorizo
	Autorizo después de 1 año
	No autorizo
	Autorizo difundir solo algunas partes del trabajo
Indique	

Firma(s) autor(es)



C.I. N° 5.044.166

e-mail: maria.giron@ucv.ve

En Caracas a los veintitrés días del mes de Julio de 2012

*A mi familia, mi tesoro más preciado, por su apoyo
incondicional,
oportuno y permanente.*

ESTUDIO BIOQUÍMICO Y PATOLÓGICO DE FRACCIONES CON ACTIVIDAD FIBRINOLÍTICA DEL VENENO DE LA MAPANARE (*Bothrops colombiensis*).

María Eugenia Girón Mendoza, C.I. 5.044.166. Sexo: Femenino. E-mail: megironm@gmail.com. Telf: 0416-3079295/0212-9457625. Dirección: Instituto Anatómico “José Izquierdo”. Sección de Inmunoquímica y Ultraestructura Toxinológica.

Tutor: **Alexis Rodríguez-Acosta**, C.I. 3.255.684. Sexo: Masculino. E-mail: rodriguezacosta1946@yahoo.es Telf: 0416-8366806/0212-2191761. Dirección: Instituto Anatómico “José Izquierdo”. Sección de Inmunoquímica y Ultraestructura Toxinológica.

RESUMEN

Introducción: Por muchos años las investigaciones con venenos de serpientes se han enfocado en algunas enzimas fibrinolíticas que incluyen metaloproteasas y enzimas coagulantes por su potencial aplicación clínica en el tratamiento de la enfermedad trombotica. En Venezuela, a pesar de su importancia médica, pues son las responsables del 80% de los accidentes ofídicos, hasta el presente son escasos los trabajos realizados con venenos bothrópicos.

Objetivo: Aislar y caracterizar fracciones con actividad fibrino(geno)lítica del veneno de *B.colombiensis*.

Método: El estudio comparativo de parámetros hemostáticos demostró importantes diferencias intra e inter específicas en los venenos de serpientes provenientes de distintas localidades geográficas de todo el país y nos permitió elegir el veneno de *B. colombiensis* de la localidad Caucagua, para proseguir el estudio con miras a aislar fracciones con potencial terapéutico, por presentar la mayor actividad fibrinolítica acompañada de las menores actividades coagulante y hemorrágica.

Resultados: Del veneno de *B. colombiensis* de Caucagua se aislaron dos metaloproteasas cuya caracterización bioquímica las asocia con metaloproteasas dependientes de zinc, particularmente α -fibrinogenasas. Estas Colombienasas no presentan actividades hemorrágica, coagulante, hemolítica, citotóxica, proteolítica sobre proteínas de matriz extracelular o que alteren la agregación plaquetaria.

Conclusiones: Debido a la elevada actividad fibrino(geno)lítica y las características biológicas que presentan, tienen un potencial terapéutico como agentes trombolíticos y/o desfibrinantes.

Palabras clave: *Bothrops colombiensis*; Colombienasas; actividad fibrinolítica; actividad fibrinogenolítica; metaloproteasas.

ABSTRACT

Introduction: for many years the snake venom research have focused on some enzyme fibrinolytic including Metalloproteinases and coagulating enzymes for its potential clinical application in the treatment of thrombotic disease. In Venezuela, despite its medical importance since are responsible for 80% of the ophidic accidents and only few works have been carried out with bothropic venoms.

Objective: Isolate and characterize fractions with fibrino (geno) lytic activity from *B.colombiensis* venom. **Methods:** Comparative study of haemostatic parameters showed important differences on snake venoms from different geographical locations around the country. Intra and interspecific differences allowed us to choose the venom of *B. colombiensis* from Caucagua town, to continue the study with the objective of isolating fractions with therapeutic potential, as a result of presenting the maximum fibrinolytic activity accompanied with minor coagulant and hemorrhagic activities. **Results:** from the venom of *B. colombiensis* (Caucagua) were isolated two Metalloproteinases whose biochemical characterization associated them with zinc, particularly α -fibrinogenases. These Colombienases do not have hemorrhagic, coagulant, hemolytic activity, cytotoxic, proteolytic on extracellular matrix proteins or alter the platelet aggregation. **Conclusions:** Due to the high fibrino(geno)lytic activity and biological characteristics presented, they may have therapeutic potential as thrombolytic and/or defibrinant agents.

Key words: *Bothrops colombiensis*; Colombienases; fibrinolytic activity; fibrino(geno)lytic activity; metalloproteinases.

INDICE GENERAL

I. INTRODUCCION	4
II. JUSTIFICACION E HIPOTESIS.....	34
III. OBJETIVOS	36
IV. METODOLOGÍA.....	37
V. RESULTADOS	59
VI. DISCUSIÓN	80
VII. CONCLUSIONES	117
VIII. AGRADECIMIENTOS.....	119
IX. BIBLIOGRAFIA	120
X. ANEXOS.....	148

I. INTRODUCCION

LAS SERPIENTES

Los organismos que pueden generar un envenenamiento están ampliamente distribuidos en el reino animal. Viven en permanente competencia por los recursos en cualquier hábitat de todo ecosistema. Comprenden más de 100.000 especies representadas en todos los *phyla* mayores tales como cordados (reptiles, peces, anfibios y mamíferos), equinodermos (estrellas de mar), moluscos (caracoles, pulpos), anélidos (sanguijuelas), nemertinos, artrópodos (arácnidos, insectos, miriápodos) y nidarios (anémonas marinas, corales).

La causa más común de envenenamiento por animales la constituye los accidentes por contacto con artrópodos (abejas, avispa, hormigas, arañas, escorpiones, orugas), sin embargo el 80% de las muertes se atribuye al accidente ofídico (1).

Los reptiles hicieron su aparición en el período carbonífero de la era Paleozoica, hace aproximadamente 280 millones de años; posteriormente en el Cretáceo, hace 135 millones de años, aparecen las primeras serpientes producto de la evolución biológica durante la cual sus antecesores, los lagartos, perdieron sus extremidades, adaptándose a todas las formas de vida, acuática, terrestre y arbórea hasta los 3.000 metros de altura (2). Dentro de los reptiles, las serpientes pertenecen al suborden Serpentes, orden Squamata, llamado así por la presencia de escamas en su piel e incluye cerca de 3.000 especies repartidas en aproximadamente 18 familias Acrochordidae, Aniliidae, Anomochilidae, Atractaspididae, Boidae, Bolyeriidae, Colubridae, Cylindrophiiidae, Elapidae, Loxocemidae, Pythonidae, Tropidophiidae, Uropeltidae, Viperidae, Xenopeltidae, Anomalepididae, Leptotyphlopidae y Typhlopidae, estas a su vez agrupadas en 400 géneros (3), de las cuales alrededor del 20% son venenosas. Las serpientes venenosas habitan todas las regiones excepto la Antártida y algunas islas del Atlántico y Pacífico. Sin embargo, se han descrito en otras islas remotas, lejos de las plataformas continentales. Están agrupadas en 4 familias Colubridae, Atractaspidae, Elapidae y Viperidae (4).

En Latinoamérica las serpientes venenosas están representadas predominantemente por especímenes pertenecientes a las familias Viperidae y

Elapidae, así como algunas especies de la familia Colubridae de dentadura opistoglifa (5,6).

Venezuela es considerada un país megadiverso, donde las serpientes juegan un papel importante ya que, de las aproximadamente 3.000 especies descritas en el mundo, 190 especies han sido encontradas hasta el momento en nuestro país y de estas, 38 especies y subespecies, son consideradas venenosas (Navarrete y col., 2006) y pertenecen a 2 grandes familias, Viperidae y Elapidae. La familia Elapidae, representada entre otros por el género *Micrurus*, corales de dentadura proteroglifa (colmillos supero-delanteros fijos, conectados a una glándula de veneno) con veneno muy potente, pero que raramente provocan accidentes, debido a que son poco agresivas, huidizas y de boca muy pequeña (6).

La familia Viperidae, grupo con dentadura solenoglifa (colmillos supero-delanteros móviles conectados a una glándula de veneno) es la causante de la mayoría de los accidentes ofídicos debido a su agresividad, a su frecuencia en las zonas rurales y urbanas, a la ignorancia de la población y a su alto grado de eficiencia en el momento de atacar. Comprende 6 géneros (*Crotalus*, *Bothrops*, *Bothriopsis*, *Bothriechis*, *Porthidium*, *Lachesis*) y 20 especies y subespecies (6). Estas en Venezuela son:

Bothriechis schlegelii BERTHOLD, 1846 (Mapanare cejuda o pudridora).

Bothiopsis bilineata bilineata WIED, 1821 (Mapanare verde).

Bothiopsis bilineata smaragdinus HOGE, 1966 (Mapanare verde).

Bothiopsis medusa STERNFELD, 1920 (Mapanare viejita).

Bothiopsis taeniata lichenosus ROZE, 1958 (Mapanare liquenosa).

Bothiopsis taeniata taeniata WAGLER, 1824 (Mapanare).

Bothrops asper GARMAN, "1883", 1884 (Mapanare del Occidente).

Bothrops atrox LINNAEUS, 1758 (Mapanare del sur, cuaima parda).

Bothrops brazili HOGE, 1953 (Mapanare de Amazonas).

Bothrops colombiensis HALLOWELL, 1845 (Mapanare).

Bothrops isabelae SANDNER MONTILLA, 1979 (Mapanare).

Bothrops venezuelensis SANDNER MONTILLA, 1952 (Tigra mariposa).

Porthidium lansbergii lansbergii SCHLEGEL, 1841 (Mapanare).

Porthidium lansbergii houtmanni SANDNER MONTILLA, 1989 (Mapanare).

Porthidium lansbergii rozei PETERS, 1968 (Mapanare).

Crotalus durissus cumanensis HUMBOLDT, 1833 (Cascabel común).

Crotalus durissus ruruima HOGE, 1966 (Cascabel de Gran Sabana).

Crotalus pifanorum SANDNER MONTILLA, 1980 (Cascabel negra).

Crotalus vegrandis KLAUBER, 1941 (Cascabel de Uracoa).

Lachesis muta LINNAEUS, 1766 (Cuaima piña).

Las serpientes en el país pueden ser ubicadas más específicamente en nueve regiones biogeográficas: región del Lago de Maracaibo, región de Los Andes, región Falcón-Lara (Coriano), región Cordillera Central, región Cordillera Oriental, región de Los Llanos, región Guayana (sur del Orinoco), región Delta del Orinoco (Sistema Deltaico), y región Insular. Estas áreas, ya de por sí, constituyen una referencia en cuanto a la distribución geográfica de algunas especies, debido a que las condiciones ecológicas de cada región son particulares y en algunos casos, únicas (5).

Anualmente en el mundo ocurren alrededor de 5.400.000 accidentes con ofidios, de los cuales 2.682.500 producen envenenamiento con 125.345 muertes (7, 8). Cifras más conservadoras estiman globalmente, al menos, 421.000 envenenamientos y 20.000 muertes al año; con una morbilidad y mortalidad considerablemente muy altas en el sur y sudeste de Asia y en el África sub-

Sahariana (9). Para Latinoamérica, Chippaux 2008 indicó 175.000 mordeduras con cerca de 100.000 envenenamientos y unos 3.000 decesos (10). Cifras reportadas por Kasturiratne y col.2008 señalaron para Suramérica, en el año 2007, más de 30.000 envenenamientos ofídicos (14,97/100.000 habitantes) con más de 100 muertes (0,051/100.000 habitantes (9). En la región suramericana, Brasil registra la mayor frecuencia de casos, con unos 25.000 por año (11).

En Venezuela el accidente ofídico es considerado un problema de Salud Colectiva debido a la mortalidad ocasionada por la toxicidad de los venenos. En el ámbito nacional, el Anuario de Mortalidad publicado por el Ministerio del Poder Popular para la Salud, correspondiente al año 2009, publicado en noviembre 2011, reporta 27 muertes (12).

El estudio de los venenos de *Bothrops* reviste gran importancia ya que el 85% de los accidentes ofídicos, así como el mayor número de muertes por envenenamientos en Venezuela, son causados por serpientes de este género (4).

El género *Bothrops* (Wagler 1824) comprende aproximadamente unas 36 especies cuya distribución se restringe a América del Sur, exceptuando a *B. asper* que se distribuye en América Central y México. Al mismo tiempo presenta 2 especies en las Antillas. Las especies que componen este género poseen un rango de hábitats húmedos así como también xerófilos, llegando incluso a estar presente en la Patagonia extrandina hasta el norte de la provincia de Santa Cruz, Argentina (13).

Debido a que la taxonomía es dinámica y compleja, en Venezuela el grupo de las mapanares fue separado en los géneros *Bothrops*, *Bothriopsis*, *Bothriechis* y *Porthidium*, siendo los géneros *Bothriopsis* y *Bothriechis* poco frecuentes y con escasa distribución geográfica, razón por la cual su estudio, tanto en sistemática como el de sus toxinas, es bastante limitado. Actualmente existe una dificultad inherente en la separación taxonómica de las distintas especies, que ha causado numerosas controversias y discusiones entre diferentes autores que aun no han sido del todo resueltas. El género *Bothrops*, es particularmente complejo, y con seguridad se irán describiendo nuevas especies en el país (14). Las especies de mayor interés médico son:

Bothrops isabelae

Constituye una de las especies más agresivas. Distribuida en todos los estados de Venezuela que se encuentran al pie del monte andino, en sus áreas selváticas. Es color canela con marcas dorsales transversales dobles de color más oscuro, unidas por un interespacio mas claro. Se le llama comúnmente mapanare (4,13).

Bothrops venezuelensis

De carácter agresivo y con un veneno muy potente. Distribuida en toda las regiones selváticas de las cordilleras al norte de Venezuela, en la selvas nubladas de la cordillera de la Costa, abarcando en el Distrito Capital el Ávila y el estado Miranda hasta los estados Carabobo y Aragua; también se encuentra en la cordillera de Mérida en los estados andinos (Figura 1). Se le llama comúnmente tигра mariposa (4,13).

Bothrops atrox

Es una especie muy agresiva y de veneno potente. Distribuida al sur del río Orinoco en los estados Amazonas y Bolívar. Es de color verde oliva a marrón oscuro con marcas dorsales triangulares negras, que hacen ángulo de 90° con el eje del cuerpo. Se le llama mapanare del sur y es la responsable de la mayoría de las muertes en la zona selvática (Figura 1). Indígenas y mineros son sus principales víctimas (4,13).

Bothrops colombiensis.

Distribuida al norte del río Orinoco en todas las áreas selváticas desde el nivel del mar hasta 2.500 m de altitud (Figura 1). Se caracteriza por tener la cabeza triangular, cola corta a mediana y puntiaguda. Con talla promedio de 1,80 m de largo, las hembras son más grandes y robustas. Su coloración es variable, aunque en la mayoría de los ejemplares es básicamente parda negruzca, gris claro o amarillento, con diseños más oscuros en formas de rectángulos o medio trapezoidales. El vientre es claro inmaculado o poco manchado (13).

ACCIDENTE BOTHRÓPICO.

Los envenenamientos provocados por las serpientes del género *Bothrops*, son múltiples y severos, caracterizados por efectos locales inmediatos y con manifestaciones sistémicas diversas.

La secuencia de síntomas es muy similar para todos los pacientes que han sufrido un accidente bothrópico, variando la intensidad del proceso en función de varios factores, entre ellos: la cantidad de veneno inoculado, el sitio anatómico de la mordedura; el peso y talla (p.ej. en niños las mordeduras se complican con frecuencia), y el estado fisiológico del individuo (4; 15).

Efectos locales:

Los principales efectos locales son hemorragia, edema, mionecrosis. La primera manifestación en un paciente, víctima del accidente bothrópico es dolor de rápida aparición y de variable intensidad, similar a una sensación de quemadura. Paralelamente se produce edema con cianosis que progresa con rapidez por la extremidad afectada durante las primeras horas. Pasado este tiempo hay manifestación de peso local en los miembros con imposibilidad de movilizarlos por artralgia o dolor en las articulaciones (15).

El sangrado se produce como consecuencia de la acción de toxinas del veneno conocidas como "hemorraginas" sobre los vasos sanguíneos. Las hemorraginas son metaloproteasas dependientes de zinc, las cuales degradan los componentes de la lámina basal de los capilares y vénulas, ocasionando colapso de los capilares y extravasación. Puede haber necrosis muscular local a causa de la isquemia, por bloqueo de la irrigación sanguínea (15).

En la fase inicial, por donde penetran los colmillos en la piel (impronta), hay sangramiento que se detiene espontáneamente, pero a partir de los 30 minutos se alteran los mecanismos de la coagulación apareciendo hemorragias en forma de goteo continuo o de finos hilos de sangre por los orificios de impronta; en casos graves puede haber sangramiento espontáneo por encías, mucosa nasal y digestiva

con hematemesis. Luego, pueden aparecer flictenas, equimosis y necrosis tisular que pueden provocar limitación funcional y pérdida de regiones anatómicas de la zona afectada (4).

El edema es un efecto multifactorial, que se desarrolla como parte de una respuesta inflamatoria aguda provocada por el veneno, el cual puede 1)- afectar directamente el endotelio, originando la exudación del plasma, ó 2)- por liberación de mediadores como histamina, cininas, prostaglandinas y anafilatoxinas. Además, el aumento en el volumen de líquido intersticial puede llevar a un síndrome compartimental (16).

La necrosis se produce en el tejido muscular donde se inyecta el veneno. Generalmente es de aparición rápida y se debe fundamentalmente a dos factores:

1) Por la acción directa de miotoxinas, fosfolipasas A2 que lesionan directamente la membrana plasmática de las células musculares, ocasionando con esto una entrada masiva de calcio al citoplasma; y a consecuencia de esto, alteraciones intracelulares irreversibles. 2) Por isquemia causada por la hemorragia y el edema.

Esta necrosis puede conducir a manifestaciones de intoxicación general por el veneno y detritus tisulares y en consecuencia, a alteraciones de la función renal, hepática y elevación de la temperatura (16).

Frecuentemente, estos accidentes cursan con infecciones, ya que se han encontrado venenos contaminados con bacterias, razón por la cual los abscesos son comunes en estas mordeduras (16).

Si el accidente es provocado por ejemplares juveniles muchas de estas manifestaciones locales pudieran estar ausentes, siendo más importantes en este caso las manifestaciones relacionadas con desórdenes de la coagulación (4,15,16).

Efectos sistémicos:

En envenenamientos por *Bothrops*, desde el punto de vista sistémico predomina el consumo de fibrinógeno, probablemente debido a la presencia de

enzimas semejantes a trombina, formándose monómeros de fibrina poco estables incapaces de polimerizar y formar coágulos. Además hay disminución de los niveles de protrombina, Factor V y Factor VIII, trombocitopenia moderada y activación del sistema fibrinolítico, con consumo de α 2- antiplasmina e incremento de productos de degradación de fibrin(ógeno) y D-dímeros. Estos hallazgos confirman que además de enzimas semejantes a trombina también están presentes activadores de la protrombina y del Factor X que pueden conducir a coagulación intravascular diseminada como consecuencia de la formación de trombina (17,18).

El sangrado y la exudación ocasionados tanto a nivel local como sistémico originan un cuadro hipovolémico que puede llegar hasta un choque cardiovascular.

También puede presentarse Insuficiencia renal a causa de la acción directa de toxinas en las células de los túbulos renales o de un problema de perfusión a nivel renal. En estos casos se observa oliguria (secreción escasa de orina) o anuria (supresión o disminución de la secreción urinaria) y se elevan las concentraciones séricas de urea y creatinina. Las evaluaciones anatomopatológicas han demostrado nefrosis de nefrona distal, necrosis tubular aguda y necrosis cortical (16).

COMPOSICIÓN DE LOS VENENOS DE SERPIENTES.

Los venenos son secreciones de glándulas salivales altamente especializadas, que las serpientes inyectan a la presa a través del aparato inoculador. Tienen múltiples funciones que incluyen inmovilización, parálisis, muerte y digestión de la presa. En general, consisten en mezclas extremadamente complejas de moléculas farmacológicamente activas que incluyen componentes orgánicos de bajo peso molecular, componentes inorgánicos (histamina y otros alérgenos, poliaminas, alcaloides), pequeños péptidos, proteínas, y componentes no proteicos, tales como carbohidratos (en forma de glicoproteínas), lípidos (principalmente fosfolípidos), aminas, nucleótidos, restos insolubles de tejido, dadas sus características de secreción glandular y muy probablemente compuestos aún no identificados a pesar de los grandes avances tecnológicos usados en su estudio (1,17,19,20).

Adicionalmente, los constituyentes inorgánicos incluyen calcio, cobre, hierro, potasio, magnesio, manganeso, sodio, fósforo, cobalto, y zinc. La presencia y cantidad de éstos varía de acuerdo a la especie, lo cual ha permitido sugerir que tales constituyentes están relacionados, bien sea con la estabilidad de las estructuras proteicas, o involucrados en mecanismos de catálisis de reacciones enzimáticas (19; 20).

Los efectos biológicos de los venenos son muy complejos debido a que los distintos componentes pueden actuar individual- o sinérgicamente. La acción sinérgica puede potenciar sus actividades o contribuir a la propagación de sus toxinas en el organismo (1).

Atendiendo a su acción biológica primaria, los venenos pueden clasificarse en neuro-/miotóxicos o hemorrágicos/citotóxicos. En el primer grupo se encuentran los venenos de la familia Elapidae, ricos en neurotoxinas (bloquean canales iónicos dependientes de voltaje presentes en el cerebro y en las uniones neuromusculares, produciendo una parálisis de la presa) y fosfolipasas A2 de tipo I, cuyos efectos abarcan miotoxicidad, cardiotoxicidad, actividad pro- y anti-coagulante, así como neurotoxicidad pre y post-sináptica. La mayoría de las serpientes australianas pertenecen a esta familia y son reconocidas como las más tóxicas del planeta. (21).

Por otro lado, los venenos de serpientes de la familia Viperidae contienen numerosas proteínas capaces de degradar la matriz extracelular e interferir con la cascada de coagulación, el sistema hemostático y la reparación de tejidos de la víctima de envenenamiento (1).

A pesar de la aparente complejidad de los venenos de vipéridos, evidenciada mediante técnicas de separación de proteínas como cromatografía de fase reversa y electroforesis bidimensional, análisis detallados de los proteomas y transcriptomas de un número creciente de serpientes de esta familia se ha evidenciado que las proteínas de estos venenos pertenecen tan solo a unas 10-12 familias que incluyen enzimas (metaloproteasas dependientes de Zn^{2+} , fosfolipasas A₂ de tipo II, serinoproteasas, L-amino ácido oxidasa) y proteínas sin actividad enzimática (péptidos natriuréticos, desintegrinas, inhibidores de proteasas tipo Kunitz, cistatinas, lectinas específicas de galactosa, lectinas tipo C, factores de crecimiento vascular y

proteínas CRISP (Cysteine-Rich Secretory Proteins). Sin embargo, el perfil proteico y la abundancia relativa de los diferentes grupos de proteínas varían ampliamente de una especie a otra conduciendo a una gran variabilidad individual, ontogénica y geográfica (1).

Hasta el presente se conocen más de 100 venenos de serpientes capaces de afectar el sistema hemostático y/o fibrinolítico por diversos mecanismos (22). Estudiar estos mecanismos de acción reviste gran interés por diversas razones, entre ellas comprender e interpretar cuadros clínicos y de esta manera ayudar con la conducta terapéutica, para fines diagnósticos, explorar su potencial terapéutico como posibles agentes trombolíticos, anticoagulantes, antiplaquetarios entre otras.

GENERALIDADES DE LA HEMOSTASIA.

Antes de describir las actividades de los venenos sobre el sistema hemostático es necesario hacer un breve resumen de este sistema.

La hemostasia permite controlar la pérdida de sangre producida como consecuencia de una lesión vascular, que en el caso concreto de toxinas, es la acción de venenos de diversos animales (serpientes, arañas, orugas, bacterias, virus, entre otros) mediante la activación local, y casi secuencial de diferentes mecanismos que involucran: a) reacciones vasculares que producen modificaciones del tono vascular; b) respuestas plaquetarias que desencadenan fenómenos de adhesión y agregación para formar un tapón de plaquetas y cumplir así con una primera etapa de este proceso denominada convencionalmente “hemostasia primaria”; c) activación de la coagulación plasmática que consolida el coágulo primario y lo transforma en un tapón definitivo, dando así fin a la llamada “hemostasia secundaria”; y d) activación de la fibrinólisis para permitir la degradación del coágulo y la recanalización del vaso lesionado una vez cumplida su función e iniciado el proceso de cicatrización y regeneración del mismo (Figura 2) (23).

La función hemostática del **endotelio vascular** es ejercida principalmente por la pared más interna que lo conforma (hacia la luz del vaso), es decir la capa íntima, la cual está constituida por una monocapa de células endoteliales que tienen una altísima capacidad metabólica. Sintetizan y segregan membranas basales y matriz

extracelular la cual contiene proteínas adhesivas, colágeno, fibronectina, laminina, vitronectina y factor de Von Willebrandt (VWF) (23).

El endotelio vascular normal tiene las funciones de: a) mantener la fluidez de la sangre a través de la síntesis y expresión o secreción de inhibidores de la coagulación (trombomodulina, antitrombina III y heparán sulfato) sobre su superficie; b) inhibir la agregación plaquetaria por la liberación de prostaglandinas (PGI₂) y óxido nítrico (NO); c) regular el tono vascular y la permeabilidad por la síntesis de endotelinas, las cuales inducen vasoconstricción y las PGI₂ y NO liberados producen vasodilatación; d) modular la fibrinólisis por la síntesis y secreción de activadores del plasminógeno tipo tisular (tPA) y uroquinasa(uPA) e inhibidores de los activadores del plasminógeno y e) constituir la barrera que separa los componentes sanguíneos hemostáticos de las estructuras reactivas subendoteliales (23).

Las **plaquetas** o trombocitos son fragmentos celulares anucleados en forma de disco, producidos por los megacariocitos en la médula ósea, desde donde son liberadas a la circulación. El 67% de ellas permanecen circulantes ($2 \text{ a } 4 \times 10^5 / \text{mm}^3$) y el 33% restante son almacenadas en el bazo. Tienen una vida media de 8 a 10 días (25).

En general las plaquetas están vinculadas a funciones de: integridad vascular, hemostasia primaria, coagulación, transporte (serotonina, etc.), trombosis, aterogénesis, fagocitosis, inflamación, procesos inmunológicos y posible participación en procesos metastásicos (25).

En el proceso hemostático las plaquetas participan en las reacciones de: 1) adhesión a la pared o a la zona lesionada del vaso; 2) extensión de la plaqueta sobre la superficie endotelial expuesta; 3) secreción del contenido granular (ADP, epinefrina, y serotonina); 4) formación de un agregado o masas de plaquetas; 5) participan en el proceso de la coagulación, al servir sus membranas como superficie para el ensamblaje de los complejos enzimáticos que aseguran la propagación y amplificación de la coagulación, asegurando una generación de trombina adecuada que garantice la formación de un coágulo de fibrina estable (23).

Simultáneamente a la formación del tapón hemostático primario, se activa el **sistema de la coagulación sanguínea** o hemostasia secundaria. Según el modelo

celular de la coagulación, esta se inicia a nivel de células que expresan el factor tisular (FT), tales como fibroblastos, células mononucleares, macrófagos y células endoteliales activadas. El FT forma con el factor VII activado (FT/FVIIa) el complejo tenasa-extrínseco, en presencia de fosfolípidos y calcio, que circula y activa al factor X (FX) y IX (FIX). El factor X activado generado es capaz de formar pequeñas cantidades de trombina, siendo esta la enzima responsable de amplificar la cascada de eventos que ocurren en el sistema de la coagulación, sobre las plaquetas adheridas al sitio de la lesión con la consecuente liberación del FV (contenido en los gránulos alfa de esas plaquetas) parcialmente activado (26,27).

Las plaquetas activadas exponen una superficie rica en fosfolípidos y en receptores del factor Va, necesarios para el ensamblaje de complejos enzimáticos, que aseguran la generación de más trombina que participa en la fase de propagación al activar los factores VIII, V y XI, para formar complejos procoagulantes en la superficie de las plaquetas activadas, tenasa intrínseca: IXa/VIIIa y protrombinasa: Xa/Va; ambos en presencia de calcio y fosfolípidos, garantizando así la generación de la trombina necesaria para la formación de una malla de fibrina, que se estabiliza por acción del factor XIII activado, en el sitio específico del daño tisular, asegurando así la formación de un coágulo estable, capaz de cubrir las necesidades hemostáticas (23,26,27). Estas fases del modelo celular de coagulación se muestran en la Figura 3.

Durante el ensamblaje de la malla de fibrina, el factor XIII activado (FXIIIa, transglutaminasa) cataliza la formación de uniones covalentes entre cadenas α vecinas, formando los polímeros de α , entre cadenas γ , formando los dímeros γ y entre residuos de las cadenas α y γ , formando heteropolímeros α y γ , resultando en un coágulo estable y resistente a la lisis, lo cual limita la pérdida de sangre ante una lesión en el lecho vascular (26,27).

El fibrinógeno es una glicoproteína plasmática sintetizada en el hígado, con una masa molecular aproximada de 340 kDa y una concentración plasmática de 2-3 g/L; estructuralmente es una molécula dimérica que consiste en tres pares de cadenas polipeptídicas llamadas $A\alpha$, $B\beta$ y γ unidas por puentes disulfuro. La trombina

generada durante la activación de la coagulación induce la conversión de fibrinógeno en fibrina, en un complejo proceso que se resume en tres pasos: (a) comienza con la liberación de los fibrinopéptidos por la trombina. Por ruptura de uniones específicas Arg-Gly de las cadenas A α y B β , son liberados dos moles de fibrinopéptidos A (FPA) y B (FPB) por molécula, lo que forma los monómeros de fibrina, los cuales una vez separados de los fibrinopéptidos, (b) polimerizan por uniones tipo puentes de hidrógeno de manera terminoterminal y terminolateral y (c) la estabilización covalente de la fibrina catalizada por el factor XIII activado (28).

El sistema de la **coagulación** está regulado por numerosos mecanismos que controlan la formación de fibrina, entre los cuales se encuentran: el sistema formado por la antitrombina III y heparán sulfato, que actúa principalmente sobre la trombina y otras serino proteasas involucradas en proceso de la coagulación como el FXa, FIXa, FXIa.; el sistema formado por la trombomodulina-trombina-proteína C/proteína S que degrada los factores Va y VIIIa, los cuales actúan como cofactores del proceso de la coagulación; el sistema formado por el inhibidor de la vía del factor tisular conocido como TFPI y el Factor Xa, que inhibe el complejo FT-FVIIa y al FT/FVIIa/FXa y el inhibidor del componente C1 del complemento que inhibe las proteasas que se generan en la vía de contacto. Ocurre además la eliminación de la circulación de componentes activos, especialmente por receptores hepáticos (26, 27,29).

La fibrina no es una estructura permanente en la hemostasia normal, una vez cumplida su función hemostática e iniciado el proceso de regeneración del vaso lesionado, esta matriz es degradada por acción del **sistema fibrinolítico**, el cual actúa como principal defensa hemostática contra los depósitos de fibrina a nivel de los vasos. Además juega un papel importante en diversas situaciones en las que se produce proteólisis tisular, tales como inflamación, angiogénesis y metástasis (30).

El sistema fibrinolítico envuelve la enzima central, la plasmina, una serino proteasa que circula como zimógeno, el plasminógeno. De manera auto regulatoria, la fibrina funciona como cofactor para la activación del plasminógeno y como sustrato para la plasmina (30).

El mecanismo fisiológico de la fibrinólisis, es activado simultáneamente con la formación de la fibrina, a la cual se unen diversas proteínas, entre las cuales se encuentran el plasminógeno y su principal activador, el t-PA. Esta unión es mediada por interacciones específicas entre los residuos de lisina C-terminal de la fibrina y los sitios de unión de lisina presentes en las estructuras tipo bucles “kringles”, de las moléculas de plasminógeno y del t-PA. Cuando ambas proteínas (plasminógeno y t-PA) se unen a la superficie de la fibrina, se forma un complejo terciario fibrina/t-PA/plasminógeno, que asegura la acción del t-PA con una eficiencia catalítica adecuada, para la activación del plasminógeno y subsiguiente generación de plasmina, la cual transforma a la fibrina insoluble en productos de degradación solubles (Figura 4) (31, 32, 33).

La activación del sistema fibrinolítico es esencial para eliminar depósitos intravasculares de fibrina, que resultan de la activación del sistema de coagulación; cualquier alteración en el funcionamiento de este complejo proceso puede predisponer a eventos hemorrágicos o trombóticos (23, 34).

Muchas enzimas del sistema fibrinolítico son serino proteasas, su sitio activo está representado por una triada catalítica compuesta por Ser-Asp-His. Este sitio activo se localiza en el dominio serino proteasa del extremo C-terminal. La región N-terminal contiene uno o más dominios funcionales tales como: una región homóloga a la de la fibronectina denominada dominio “finger”, dominio similar a factor de crecimiento epidérmico (EGF), y estructuras similares a bucles llamadas dominios “kringles” (32).

Los componentes del sistema fibrinolítico han sido agrupados en: *Plasminógeno*: Se sintetiza principalmente en el hígado, pero puede ser encontrado en espacios extravasculares de distintos tejidos. Es una glicoproteína de cadena simple con un peso molecular de 92 kDa que contiene 791 aminoácidos, 24 enlaces disulfuro y cinco “kringles” homólogos. Todos los activadores del plasminógeno convierten el plasminógeno a plasmina por la ruptura del enlace Arg561–Val562. La molécula de plasmina de cadena doble está compuesta por una cadena pesada que contiene cinco “kringles” y una cadena liviana que contiene la triada catalítica His603,

Asp646 and Ser741 En los “kringles” de la región N-terminal se sitúan los lugares de unión de lisina (LBS, “lysine binding sites”) por los cuales el plasminógeno se une específicamente a la fibrina. También median la interacción del plasminógeno con la 2-antiplasmina y, en consecuencia, juegan un papel fundamental en la regulación de la fibrinólisis (34).

En su forma nativa el plasminógeno contiene ácido glutámico en posición amino-terminal (Glu-plasminógeno), que puede ser convertido por pequeñas cantidades de plasmina, a formas con Lisina, Valina o Metionina en dicha posición, entre estas formas la más probable es la denominada Lis-plasminógeno, la cual posee mayor afinidad por la fibrina y se activa más fácilmente por los activadores fibrinolíticos (30).

Activadores del plasminógeno (PA): Existen dos activadores fisiológicos del plasminógeno que son serino proteasas similares a tripsina, el tipo tisular (t-PA) y el tipo uroquinasa (u-PA). Estas dos enzimas difieren principalmente en la organización de sus dominios y en la función de sus regiones no catalíticas (30).

El t-PA es sintetizado y liberado en las células endoteliales como una molécula de una cadena que tiene gran especificidad por la fibrina donde forma un complejo con su sustrato principal, el plasminógeno al cual activa por ruptura del enlace Arg561–Val562. El t-PA es transformado a una forma de dos cadenas por acción de la plasmina que hidroliza el enlace Arg275–Ile276. La cadena pesada A (1-278aa) contiene dominios homólogos a los encontrados en otras proteínas: dominio “finger”, dominio-EGF, y dos “kringles” similares a los del plasminógeno. El centro activo está localizado en la cadena ligera B (279-530aa) y contiene los aminoácidos Ser, His y Asp, de forma semejante a otras proteasas como trombina, plasmina y elastasa.

Cada una de las estructuras anteriores está involucrada en algunas funciones de la enzima: la fijación del t-PA a la fibrina se hace a través de los dominios “finger” y “kringle” 2; la formación de complejos inactivos entre el t-PA y su inhibidor específico es debida a una interacción con el centro activo y la eliminación del t-PA de la circulación a través del hígado, requiere del reconocimiento por parte del

receptor hepático del dominio EGF (32). Este activador tiene una eficiencia catalítica pobre en ausencia de fibrina; en contraste, en su presencia se potencia la activación del plasminógeno y la formación de plasmina. Esto se ha explicado por la formación de un complejo ternario entre el t-PA y el plasminógeno a nivel de la superficie de la fibrina, que induce un cambio conformacional de la enzima y el sustrato, lo cual favorece la formación local de plasmina y la degradación de la fibrina “in situ”. Además de enlazarse a la fibrina, también lo hace a la anexina II y otros receptores sobre la superficie de células endoteliales y plaquetas.

Un segundo activador endógeno del plasminógeno, la uPA o pro-uroquinasa, es una glicoproteína de una sola cadena compuesta por 411 aminoácidos y una masa molecular de 54 kDa. La porción amino-terminal contiene una región homóloga al factor de crecimiento epidérmico y otra similar a los “kringles” del plasminógeno, pero a diferencia del t-PA no posee un dominio “finger”, lo que quizás pudiera explicar su falta de afinidad por la fibrina. En la región carboxi-terminal se encuentra el centro activo serino proteasa (His204, Asp255, Ser356). La ruptura del enlace Lys158-Ile159 por la plasmina o la calicreína convierte la u-PA monocatenaria a la forma de doble cadena unidas por un enlace disulfuro (35). La u-PA fue aislada inicialmente a partir de orina humana y cultivo de células embrionarias de riñón humano. Es un activador directo del plasminógeno mediante escisión de un enlace Arg561-Val562 con formación de Glu-plasmina pero, a diferencia del t-PA, carece de afinidad específica por la fibrina; la forma de dos cadenas activa indiscriminadamente tanto al plasminógeno circulante como al unido a la fibrina (23).

La reacción de activación de la u-PA sobre la superficie celular, se realiza a través de receptores u-PA (uPAR). Estas reacciones se asocian principalmente a proteólisis durante la remodelación y reparación del tejido, adhesión o migración celular y representan la relación fibrinólisis-cáncer (23, 32,34).

En el mecanismo fisiológico de la lisis de un coágulo de fibrina inducida por t-PA se han descrito dos fases. La primera es lenta y ocurre cuando el t-PA de una cadena (sct-PA) se une a los residuos de lisina de la fibrina intacta, a la cual está unido el plasminógeno formado el complejo t-PA/fibrina/Pg. La segunda fase ocurre cuando la fibrina parcialmente degradada por la plasmina, expone residuos

adicionales de lisina internos para la unión de nuevas moléculas de plasminógeno y de t-PA (32). Las interacciones moleculares que ocurren en la primera fase, sugieren que existen sitios de unión de baja afinidad para moléculas de plasminógeno y del sct-PA, localizados en la región D de la fibrina, siendo los residuos γ 312-324 para la unión del t-PA y los residuos $A\alpha$ 148-160 para la unión del plasminógeno. El dominio α C también está involucrado en la activación del plasminógeno por el t-PA, con una unión de alta afinidad. La degradación inicial de la fibrina ocurre mediante proteólisis en el dominio α C, orientado en la superficie de la fibrina, seguido por múltiples rupturas en las regiones D y E. Estas proteólisis exponen nuevos residuos de lisina C-terminal que estimulan la adición de otras moléculas de plasminógeno y la acción de la pro-uroquinasa o scu-PA, propagándose la fibrinólisis, para así lograr una eficiente lisis de fibrina y restauración de la luz del vaso y por ende del flujo sanguíneo (31,32).

También existe la activación del plasminógeno a través de la activación del factor XII (FXIIa) que conduce a la generación de calicreína que permite la conversión del plasminógeno a plasmina (30).

La plasmina tiene una acción preferente hacia los radicales ricos en lisina en ciertas proteínas. Además de degradar fibrina, degrada otras proteínas tales como factores V y VIII de la coagulación, así como el fibrinógeno y componentes de matriz extracelular.

La regulación del sistema fibrinolítico es realizada por inhibidores de los activadores del plasminógeno (PAIs), por acción de los inhibidores de la plasmina, especialmente de la α 2-antiplasmina y por una proteína activable por trombina, conocida como TAFI (32).

Varios pasos en las vías del sistema hemostático son regulados por inhibidores específicos, siendo los más importantes las serpinas o inhibidores de serino proteasas. Diferentes inhibidores controlan y modulan la actividad del sistema fibrinolítico, estos pueden actuar a nivel de la activación del plasminógeno o directamente sobre la plasmina.

Entre los inhibidores directos de plasmina se encuentran la α 2-antiplasmina y la α 2-macroglobulina. Entre los inhibidores de los activadores del plasminógeno se encuentran los PAIs (**P**lasminogen **A**ctivator **I**nhibitors) (32).

✓ *Inhibidor del activador del plasminógeno tipo 1 (PAI-1):* Es considerado el principal inhibidor de la activación del plasminógeno. Es una glicoproteína de 72 kDa y 379 aminoácidos, sintetizada principalmente por las células endoteliales y plaquetas, aunque estas últimas secretan PAI-1 en forma inactiva. Su liberación es controlada por citoquinas, factores de crecimiento y lipoproteínas. Es un miembro de la familia de la serpinas y forma un complejo con la vitronectina, lo que estabiliza su actividad. Actúa sobre el t-PA (de ambas formas: simple y doble cadena) y sobre la tcu-PA (33,35).

El PAI-1 también puede inhibir la proteína C activada (APC) y la trombina en presencia de vitronectina y/o heparina. El complejo vitronectina-PAI regula la actividad funcional del PAI y su eliminación de la circulación (33,35).

✓ *Inhibidor del activador del plasminógeno tipo 2 (PAI-2):* Pertenece a la familia de las serpinas, de 392 aminoácidos. Inhibe tanto al tct-PA como a la tcu-PA; es menos efectivo sobre el sct-PA y no actúa sobre la scu-PA. Es sintetizado en grandes cantidades a nivel de células inflamatorias (33,35).

Inhibidores de la plasmina:

✓ *α 2-Antiplasmina:* Es el inhibidor fisiológico primario de la plasmina. Es una glicoproteína de cadena simple de 70 kDa y 452 aminoácidos, sintetizada en el hígado, con una concentración plasmática de 70 mg/L, aproximadamente la mitad de la concentración del plasminógeno. Tiene una vida media de 2 a 4 días, pertenece la familia de las serpinas. Actúa sobre la plasmina al formar un complejo estequiométrico 1:1. Todas las serpinas forman un complejo irreversible con la proteasa, causando una ruptura proteolítica de la misma, lo que conduce a la pérdida de actividad del complejo inhibitorio (33,35).

✓ *α 2-macroglobulina:* Es una glicoproteína de 725 kDa de 4 cadenas polipeptídicas de 160 KDa cada una, sintetizada por las células endoteliales y macrófagos, se encuentra en los gránulos α de las plaquetas. No pertenece a la

familia de las serpinas, forma complejos no covalentes con la plasmina e inhibe su actividad con menor eficiencia (10%) que la α 2-Antiplasmina. Es un inhibidor de amplia especificidad que reacciona con las 4 clases de proteasas existentes: tipo serina, cisteína, ácido aspártico y metaloproteasas. Este inhibidor actúa sobre la plasmina, cuando la α 2-antiplasmina está saturada, formando un complejo estequiométrico 1:1 (33,35).

TAFI: Otra glicoproteína plasmática que participa en la regulación de la fibrinólisis es el inhibidor de fibrinólisis activable por trombina (TAFI). Es una glicoproteína de 55 kDa y 423 aminoácidos, sintetizada en el hígado, que circula en el plasma como zimógeno. Es una carboxipeptidasa B, enzima dependiente de zinc que inhibe la fibrinólisis y cuya activación es mediada por el complejo trombina-trombomodulina. También es activado por tripsina y plasmina (35).

El TAFI activado (TAFIa) es una carboxipeptidasa de 35 kDa con especificidad por los residuos Arg y Lys carboxi-terminal. La remoción de los residuos Lys carboxi-terminal de la fibrina parcialmente degradada inhibe la unión de nuevas moléculas de plasminógeno y tPA a esta y en consecuencia regula negativamente la fibrinólisis (35).

El complejo trombina-trombomodulina representa la conexión molecular entre las cascadas de la coagulación y fibrinolítica, ya que la trombomodulina sirve como cofactor de la trombina, para la activación tanto del TAFI, así como de la proteína C, por lo que este complejo (trombina/trombomodulina) juega un rol central en la regulación de la coagulación y la fibrinólisis (36).

Diversos procesos patológicos tales como infección, inflamación, así como el contacto con virus, bacterias, secreciones de animales, entre estos los venenos de serpientes, pueden alterar el equilibrio del sistema hemostático, pudiendo inducir complicaciones hemorrágicas y/o trombóticas que modifican el funcionamiento normal del individuo, lo cual hace relevante estudiar las alteraciones de este sistema, en particular en este trabajo, aquellas inducidas por venenos de serpientes

VENENOS DE SERPIENTES Y HEMOSTASIA

Se han descrito muchas metaloproteasas y serinoproteasas provenientes de venenos de serpientes que afectan la hemostasia, algunas de ellas degradan factores de la coagulación o proteínas de membranas celulares o activan células endoteliales. En otros casos las proteasas actúan selectivamente de forma similar a las enzimas fisiológicas activando o inactivando funciones plaquetarias, un factor específico de la coagulación o de la fibrinólisis (22,37).

Los venenos de serpientes especialmente de la familia Viperidae contienen una gran variedad de proteínas y péptidos que afectan el sistema hemostático. Estas proteínas pueden ser clasificadas en cuatro grandes grupos de acuerdo a su acción: a) Las proteínas que interfieren con la coagulación que comprenden proteasas procoagulantes (activadoras de la protrombina, enzimas trombino-similares, activadoras del factor X y factor V) y proteínas con acción anticoagulante, entre estas inhibidor del factor IXa y Xa y de la trombina, así como proteasas activadoras de la proteína C y fosfolipasas A₂ con acción anticoagulante; b) Las hemorraginas, las cuales promueven desórdenes de la permeabilidad capilar; c) Las proteínas que alteran la hemostasia primaria, al activar o inhibir la actividad plaquetaria. Estas incluyen: fosfolipasas A₂, serino proteasas, metaloproteasas, L-amino-ácido oxidasas, fosfodiesterasas, desintegrinas, lectinas tipo C, dendropeptinas; d) Las proteasas que interfieren con las fibrinólisis (22, 38,39).

Particularmente en cuanto a venenos bothrópicos tenemos:

a. Enzimas que interactúan con la pared de los vasos.

La actividad hemorrágica a nivel local es causada principalmente por metaloproteasas del veneno que degradan las membranas basales de los capilares sanguíneos. Esta acción conduce a la pérdida de la integridad capilar y la consecuente hemorragia en el sitio. Numerosos estudios bioquímicos han demostrado claramente que las toxinas hemorrágicas aisladas de venenos de serpientes son en su mayoría, metaloproteasas (MPVS) dependientes de zinc, que degradan enzimáticamente componentes de matriz extracelular y/o membranas

basales (colágeno IV, laminina, entactina y fibronectina) produciendo hemorragia local, inflamación y a menudo, necrosis (40, 41).

Las MPVS forman junto con las ADAM's (**A** Disintegrin **A**nd **M**etalloprotease), la subfamilia de las "Reprolisinas" debido a que comparten la misma organización estructural de dominios, aún cuando las ADAM's posean otros dominios ausentes en las MPVS. A su vez, la reprotisinas forman parte de la familia de las "Metzincinas", que se caracterizan por ser metaloproteasas dependientes de Zn^{+2} , junto con la metaloproteasas de matriz, las astacinas y las serralisinas, las cuales presentan dominios de unión de Zn^{+2} similares con secuencias consenso idénticas HEXXHXXGXXH y un residuo de "vuelta de metionina" (42).

El análisis de las secuencias de los ácidos nucleicos que codifican para las MPVS indica que son sintetizadas *in vivo*, en las glándulas salivales de las serpientes, como zimógenos inactivos (43). Poseen un dominio propeptídico rico en cisteínas, capaz de plegarse e interactuar con el Zn^{++} del dominio catalítico, lo cual impide su actividad enzimática. Para su activación enzimática, es necesaria la ruptura del enlace cisteína-zinc, mediante un cambio conformacional de la proteína o la proteólisis del pro péptido. Puede alcanzarse a través de actividad auto catalítica residual o por acción de otras proteasas del veneno. Este mecanismo de "cysteine-switch" o interruptor de cisteína es el propuesto para las metaloproteasas de matriz (44).

Estudios estructurales de las MPVS han sugerido, que las toxinas hemorrágicas son enzimas multimodulares, que se organizan en cuatro clases de acuerdo al número de dominios presentes en su estructura. Las MPVS de clase PI (20-30 kDa) contienen únicamente el dominio de metaloproteasa. Las MPVS de clase PII (30-60 kDa) contienen además un dominio desintegrina C-terminal al dominio catalítico. Las MPVS de clase PIII (60-90 kDa) son similares a las de clase II pero contienen un dominio C-terminal rico en cisteínas, tienden a ser más hemorrágicas que las clase P-I y P-II (42). Por último, las MPVS PIV se diferencian de las PIII en que contienen dominios de lectina tipo C unidos mediante enlaces disulfuro entre si y al dominio rico en cisteínas (40). Éstas últimas son relativamente raras, la unión del dominio de

lectina tipo C al dominio rico en cisteínas es un proceso post traduccional que requiere la existencia de una cisteína libre no conservada en las MPVS PIII (41). Las metaloproteasas han sido recientemente reclasificadas como P-I, P-II y P-III. Cada una de estas categorías incluye subclases, Las antiguas P-IV han pasado a ser una categoría dentro de las P-III, ya que hasta la fecha no se ha observado el ARNm del transcrito (45).

En Venezuela en 2001 se describió y aisló la primera metaloproteasa hemorrágica crotálica a partir del veneno de *Crotalus vegrandis* (46).

En el caso de los venenos bothrópicos son varias las metaloproteasas hemorrágicas descritas hasta el presente, siendo las más importantes:

La jararagina y las jararafibrasas I, II, III y IV obtenidas a partir del veneno de *B. jararaca* (47, 48,49), una metaloproteasa básica llamada MPB, a partir del veneno de *B. moojeni* (50); las metaloproteasas BaH1, BH2 y BH3, BaP1a y BaH4 purificadas y caracterizadas a partir del veneno de *B. asper* (51, 52,53) y la atroxina, a partir de veneno de *B. atrox* (54).

Recientemente se han descrito la “alternagina”, metaloproteasa de 55 kDa a partir del veneno de *B. alternatus* (55), Bjussu-MP-I e 60 kDa de *B. jararacussu*, (56); la BlaH1 una metaloproteasa muy pequeña con solo dominio proteasa de 28 kDa, procedente del veneno de *B. lanceolatus*. (57) y la leucurolysin-B aislada a partir del veneno de *B. leucurus* (58).

b. Componentes de venenos de serpientes que interactúan con las plaquetas.

Se han descrito gran número de componentes de venenos de serpientes, que inducen o inhiben la agregación plaquetaria. De los venenos de serpientes suramericanas se han aislado activadores de plaquetas que presentan actividad enzimática y activadores que carecen de esta actividad (59).

Entre los activadores de plaquetas con actividad enzimática, un ejemplo clásico es la Trombocitina, aislada del veneno de *B. atrox* (18). Esta proteína induce agregación plaquetaria. Se han aislado proteínas similares a Trombocitina de *B.*

neuwiedi, *B. cotiara*, *B. alternatus*, *B. medusa*, *B. moojeni*, *B. numnifer* y *B. jararacussu* (18).

Los activadores de plaquetas no enzimáticos lo hacen por mecanismos diferentes, entre ellos tenemos:

✓ *Actividad similar a la lectina:* Se han descrito la Trombolectina (TL) y la lectina “bushmaster” (LBM) obtenidas a partir de venenos de *B. atrox* y *Lachesis muta* respectivamente. Ellas son capaces de unirse a carbohidratos y promover la aglutinación de las plaquetas. La actividad similar a la lectina es inhibida por lactosa, EDTA y DTT (18).

✓ *Activación de plaquetas por factores del plasma:* Representa una forma indirecta de agregación plaquetaria, pues lo hace mediante la activación de la protrombina, por los componentes del veneno, lo cual provoca la generación de la trombina y por consiguiente activación de las plaquetas o mediante la unión de los componentes del veneno a los factores del plasma produciéndose la agregación plaquetaria. Un ejemplo de esto lo constituye la Trombocitina, serino proteasa aislada del veneno de *B. atrox*, que fue más activa sobre plaquetas en plasma, que sobre plaquetas lavadas y re suspendidas en solución Tyrode-albúmina (60).

La Botrocetina es un componente no enzimático purificado a partir del veneno de *B. jararaca*, que tiene la capacidad de agregar las plaquetas al formar un complejo con el factor de von Willebrand (FvW). Representa una herramienta útil para el estudio de anomalías del factor de von Willebrand y de las plaquetas (18,22).

Los componentes del veneno pueden inhibir la agregación plaquetaria por dos mecanismos, siendo el más importante el ejercido por las desintegrinas del veneno.

Las desintegrinas son polipéptidos (41-84 aminoácidos) de bajo peso molecular cuya estructura está fuertemente tramada por 4-7 enlaces disulfuro, que son liberados del veneno de serpientes de la familia Viperidae por procesamiento proteolítico de MPVS de clase PII y PIII y constituyen una familia de antagonistas de receptores de la familia de las integrinas (61,62,63). Tienen la secuencia Arg-Gly-Asp

(RGD) y que compite específicamente con integrinas endógenas, en particular con los receptores de plaquetas GPIIb/IIIa, por medio de la cual se unen a las integrinas en la superficie de las plaquetas, receptores de vitronectina, ($\alpha v\beta 3$), de fibrinógeno ($\alpha IIb\beta 3$), y a receptores de fibronectina ($\alpha 5\beta 1$), inhibiendo la agregación plaquetaria. Por esta razón representan una herramienta con potencial terapéutico en procesos antitrombóticos (22).

Las primeras desintegrinas fueron descritas a finales de la década de 1980, como potentes inhibidores de la agregación plaquetaria (64). Algunos estudios han demostrado, que estas desintegrinas se unen además a integrinas de superficie de muchos tipos celulares, incluyendo células tumorales: inhibiendo la adhesión celular y la metástasis tumoral (65,66).

En Venezuela se han descrito hasta el presente dos desintegrinas, la Cumanastatina aislada del veneno de *Crotalus durissus cumanensis*, que disminuye la adhesión plaquetaria a fibrinógeno y fibrina, así como la agregación plaquetaria inducida por ADP (67), y la Colombistatina aislada a partir del veneno de *B. colombiensis*, la cual inhibe la migración celular, la agregación plaquetaria inducida por ADP y la adhesión de células cancerosas a fibronectina (68).

c. Proteínas que interfieren con la coagulación.

Proteasas procoagulantes

✓ ***Activador del Factor V:*** A partir del veneno de *B. atrox* se ha aislado y purificado una serino proteasa, la cual activa los factores V, VIII y XIII e induce agregación plaquetaria (69).

✓ ***Activador del Factor X:*** A partir de los venenos de *B. atrox* y de *B. erythromelas* se han aislado fracciones que activan el Factor X (70,71).

✓ ***Activadores de protrombina:*** Los activadores de la protrombina aislados de venenos de serpientes han sido ampliamente estudiados y clasificados en 4 grupos, sobre la base de su naturaleza enzimática y del requerimiento de algún cofactor para su actividad. Estos son (A) metaloproteasas con pesos moleculares

comprendidos entre 50 y 90 kDa, formadas por una sola cadena proteica, no requieren cofactores. (B) metaloproteasas con pesos moleculares comprendidos entre 50 y 90 kDa, formadas por dos subunidades unidas no covalentemente, una subunidad metaloproteasa y una subunidad relacionada a lectina tipo C. Su actividad se potencia de manera calcio-dependiente; (C) proteasas tipo serina que requieren de calcio y fosfolípidos para activar la protrombina; y (D) un complejo de proteínas similares a la serino proteasa FXa que requieren de factor Va, calcio y fosfolípidos para su actividad (72,73)

✓ Se han aislado y purificado enzimas activadoras de la protrombina de varias especies de *Bothrops* que pertenecen al grupo A, entre ellas se encuentran: *B. atrox* (70); *B. neuwiedi* (74); *B. erythromelas* (71,75); *B. asper* (72). También se han aislado y caracterizado metaloproteasas activadoras de la protrombina de una sola cadena proteica que no requieren cofactores para su actividad, pero de bajo peso molecular como son la bothrojaractivasa de *B. jararaca* (76); la cotiaractivasa de *B. cotiara* (77) y la Insularinasa A de *B. insularis* (78).

✓ *Enzimas que coagulan el fibrinógeno*

Son serinoproteasas con pesos moleculares comprendidos entre 30 y 45 kDa, que coagulan directamente el fibrinógeno, son llamadas enzimas similares a trombina ó “thrombin-like”. Empleando como criterio de clasificación la velocidad de liberación de los fibrinopéptidos A y B del fibrinógeno, existen distintos grupos: 1) venombinas tipo A, atacan preferencialmente la cadena A α (Arg16-Gly17) en el extremo N-terminal del fibrinógeno, liberando principalmente fibrinopéptido A, formándose así monómeros de fibrina poco estables incapaces de polimerizar y formar coágulos, en este grupo se incluye el “Ancrod” de *Calloselasma rhodostoma*; 2) venombinas tipo AB, liberan los fibrinopéptidos A y B, e incluyen la gabonasa de *Bitis gabonica*; y 3) venombinas B, que liberan el fibrinopéptido B preferencialmente, e incluye la venzima de *Agkistrodon contortrix contortrix* (22).

Se han aislado y purificado enzimas trombino-similares de varias especies de *Bothrops*, entre ellas: *B. atrox* (66, 79, 80,81); *B. asper* (82,83); *B. colombiensis* (84)

B.insularis (85); *B. jararaca* (86; 87), *B. alternatus* (88; 89); *B. lanceolatus* (90); *B. jararacussu* (91); *B. pauloensis* (92); *B. marajoensis* (93); *B. leucurus* (94) y *B. andianus* (95).

Las enzimas similares a trombina aisladas de venenos de serpientes, a diferencia de la trombina, no son inhibidas por hirudina, heparina ni por anti-trombina III. Tampoco activan el factor XIII, razón por la cual forman coágulos de fibrina anormales, compuestos de polímeros cortos no entrecruzados los cuales son degradados rápidamente por el sistema fibrinolítico. Al remover el fibrinógeno de la sangre, disminuye su viscosidad, mejorando la circulación sanguínea. Estas características hacen que estas enzimas purificadas sean consideradas como potenciales agentes defibrinogénicos en el tratamiento de pacientes con desórdenes tromboembólicos (39).

A este respecto cabe destacar que particularmente en el caso de venenos bothrópicos, dos enzimas trombino-similares han sido aprobadas para ser usadas como drogas en el tratamiento del infarto cerebral agudo y la angina de pecho: la Batroxobina, aislada del veneno de *B. atrox* y la Defibrasa, de *B. moojeni* (Batroxobin/Defibrase® (Pentapharm). Ambas convierten el fibrinógeno a fibrina, liberan fibrinopéptido A y son clínicamente bien toleradas y con pocos efectos secundarios. (22, 37,39).

Proteínas con actividades anticoagulantes.

Las fracciones de venenos con actividad anticoagulante se pueden clasificar en las siguientes categorías:

✓ *Activadores de la proteína C:* La proteína C es una serino proteasa, vitamina K dependiente que es activada sobre la pared del vaso sanguíneo. Cumple su función anticoagulante al degradar proteolíticamente al FVa y FVIIIa, los cofactores del complejo protrombinasa y tenasa intrínsecos respectivamente.

El activador de la proteína C, más importante descrito hasta ahora, proviene del veneno de *Agkistrodon contortrix contortrix*, es un muy potente activador de la

proteína C, que actúa independientemente de la trombomodulina y de la trombina, siendo en consecuencia muy útil como reactivo de laboratorio para la determinación de la actividad de la proteína C; este activador purificado se encuentra registrado comercialmente como Protac (22).

En el caso particular de venenos bothrópicos, Stocker y col., 1986 encontraron que los venenos de *B. moojeni*, y *B. pradoi* presentaban activadores de la proteína C (96).

✓ *Proteína enlazada a factor IX/factor X*: Sekiya y col., 1993, purificaron a partir del veneno de *B. jararaca*, la jararaca IX/X-bp. La actividad de esta proteína consiste en enlazarse de modo Ca^{++} dependiente a los factores IX y X y a la proteína S, interfiriendo de esta forma con la función que cumplen dentro del mecanismo de la coagulación (97).

✓ *Inhibidores de la trombina*: Se han descrito varios inhibidores de la trombina provenientes de venenos bothrópicos. Entre ellos a partir de venenos de *B. jararaca* (98; 99) y *B. alternatus* (100), los cuales inhiben la actividad de la misma sin interactuar con su sitio catalítico, siendo además inhibidores de agregación plaquetaria.

A partir del veneno de *B. insularis* se ha aislado y caracterizado un nuevo miembro de la familia de proteínas similares a lectinas tipo C (CLPs) que inhibe la trombina (101).

✓ *Fosfolipasas A_2 (PHA₂)*: Los fosfolípidos junto al calcio y los factores Va y Xa constituyen el complejo protrombinasa encargado de la generación de trombina. Las fosfolipasas de venenos de serpientes pueden inhibir la formación de este complejo por la degradación de los fosfolípidos de la membrana plaquetaria involucrados en la formación del complejo.

En el caso de venenos bothrópicos, Alvarado y Gutiérrez en 1988 han descrito una fosfolipasa miotóxica aislada del veneno de *B. asper* con actividad anticoagulante (102). Lobo de Araujo y col., en 2001 a partir del veneno de *B*

.lanceolatus purificaron una fosfolipasa ácida no tóxica responsable de prolongar el tiempo parcial de tromboplastina en plasma humano (103) y en 2003, Ketelhut y col., a partir del veneno de *B. jararacussu* realizaron el aislamiento y caracterización bioquímica, funcional y estructural de 4 isoformas de fosfolipasas ácidas, dos de las cuales presentaban significativa actividad anticoagulante (104).

A partir del veneno de *B. leucurus* se han aislado y caracterizado 2 fosfolipasas A₂ cuya actividad es dependiente de Ca²⁺ con potente actividad anticoagulante porque inhiben la trombina; sin embargo, no tienen efecto sobre la agregación plaquetaria inducida por ácido araquidónico, ADP o colágeno (105).

Recientemente, se ha descrito una fosfolipasa ácida proveniente del veneno de *B. alternatus*, que es fuerte inhibidora de la trombina y además induce edema (106).

d. **Enzimas fibrino(geno)líticas.**

Los venenos de muchos miembros de la familia Viperidae contienen componentes que afectan la fibrinólisis, que incluyen enzimas fibrinolíticas tipo metaloproteasas o serino proteasas de acción directa y las de acción indirecta o activadoras del plasminógeno, respectivamente (107). Estas enzimas actúan sobre el fibrinógeno y la fibrina, conduciendo a la defibrinogenación de la sangre, lisis de la fibrina y la consecuente disminución de la viscosidad sanguínea. Pueden ser clasificadas como α ó β fibrinogenasas según su actividad sea preferencialmente sobre una u otra cadena del fibrinógeno, sin que esta especificidad sea absoluta, ya que hay una degradación sustancial de la cadena alterna al incrementar el tiempo de incubación. Debido a su amplio espectro de efectos proteolíticos que conducen a la digestión del fibrinógeno.

En los últimos años se han aislado y caracterizado gran número de estas proteasas fibrino(geno)líticas en venenos bothrópicos de diferentes especies, entre estos, de *B. jararaca* (108,109,110); *B. moojeni* (50,111,112,113,114), *B. neuwiedi* (115,116); *B. asper* (52,53), *B. cotiara* (117), *B. jararacussu* (56,77,118,119); *B. leucurus* (58,120,121); *B. marajoensis* (122); *B. atrox* (123,124,125). En algunos casos, se han estudiado sus mecanismos de acción. Estas enzimas al actuar sobre

el fibrinógeno y la fibrina inducen mecanismos enzimáticos que pueden llevar a un síndrome hemorrágico local o sistémico, frecuentemente acompañado de hipo o afibrinogenemia en el accidente bothrópico (107).

Activadores del plasminógeno.

Las enzimas fibrinolíticas indirectas, generalmente del tipo serino proteasas, activan el plasminógeno a plasmina y poseen al menos un dominio catalítico estructuralmente similar a la tripsina (107). Adicionalmente se ha descrito que existen venenos de serpientes que estimulan la liberación de activadores del plasminógeno a partir de células endoteliales, como es el caso de la Batroxobina de *B. atrox* que causa el incremento en la liberación de activador del plasminógeno tipo tisular (t-PA) de forma dosis dependiente (110,126)

La existencia de un componente que cataliza la activación del plasminógeno *in vitro*, fue descrita por primera vez en el veneno de *Trimeresurus stejnegeri*, denominándolo TSV-PA, una serino proteasa de 33 kDa que activa el plasminógeno mediante la ruptura del enlace Arg₅₆₁-Val₅₆₂, de la misma forma que los activadores fisiológicos del plasminógeno, t-PA y u-PA (107).

En 1998, Sugiki y col., encontraron que una metaloproteasa hemorrágica aislada del veneno de *B. jararaca* (Jararafibrasa - JF I), que actuaba sobre la forma de zimógeno de cadena simple de uPA (scuPA), activándola de manera tiempo y dosis-dependiente. Y generando la scuPA de bajo peso molecular (127).

Del veneno de *Lachesis muta muta*, también se aisló una serino proteasa, una glicoproteína de 33 kDa que *in vitro* cataliza la conversión del plasminógeno a enzima activa, plasmina (128,129). La Figura 5 muestra el esquema del sistema hemostático y los sitios de acción de algunos componentes de venenos bothrópicos.

VENENOS DE SERPIENTES Y CITOTOXICIDAD.

Los venenos bothrópicos son mezclas altamente complejas de enzimas y pequeños péptidos con muy diversas actividades, entre las cuales se han descrito la procoagulante, fibrinolítica, hemorrágica, miotóxica, entre otras. Dicho complejo proteico actúa sobre un amplio espectro de órganos y tejidos, causando, además de múltiples efectos locales y sistémicos, graves cuadros de necrosis tisular, trastornos de coagulación y daño endotelial vascular (7,131). En la actualidad, existen importantes reportes en relación a la etiopatogénesis de la hemorragia y la mionecrosis (132), además de numerosas evidencias que describen al choque cardiovascular como causa frecuente de muerte, luego del accidente por mordedura de serpientes del género *Bothrops* (7, 133, 134,135).

En el caso de envenenamiento por *Bothrops colombiensis*, a pesar de la importancia médica en Venezuela, la literatura sobre la composición y actividades biológicas de su veneno es escasa (68, 136,137). Estudios relacionados con la citotoxicidad o cardiotoxicidad, así como sus posibles mecanismos de acción, son inexistentes. Sin embargo, reportes claros han descrito que los venenos bothrópicos son poderosos agentes mionecróticos y que su efecto citolítico puede ser atribuido a la acción directa y local de los componentes del veneno sobre la fibra muscular. Estos venenos contienen componentes citotóxicos y enzimáticos que podrían ser comparables con otras miotoxinas o cardiotoxinas de venenos elapídicos y crotálicos (132, 138,139).

El daño celular puede evaluarse a diferentes niveles: 1) A nivel celular los cambios morfológicos resultan de fácil visualización, mediante el empleo de microscopía óptica convencional; y 2) A nivel subcelular, el uso de sondas fluorescentes permite el marcaje de orgánulos subcelulares. Particularmente, el uso de fluorocromo catiónico lipofílico, tipo DiOC₁ (3), ha sido ampliamente utilizado para ensayar la funcionalidad de las mitocondrias en diversos escenarios biológicos que incluyen diferenciación, apoptosis, envejecimiento y enfermedad cardíaca (140). Esta sonda permea a través de la membrana plasmática y se acumula específicamente en las mitocondrias de la célula viva, en proporción a la magnitud de su potencial de membrana (140).

El objetivo de la presente investigación es evaluar *in vitro*, características de la acción miotóxica del veneno crudo de *B. colombiensis* y de las señales de daño celular inducido por las fracciones altamente fibrino(geno)líticas, provenientes de este veneno. La acción miotóxica es evaluada a través del uso de cultivos primarios en Gota pendiente de mioblastos cardíacos y esqueléticos. El cultivo genera monocapas de células confluentes de 24 horas a partir del explante de tejido en oposición a la fuerza de gravedad. Las células obtenidas permiten estudiar cambios a nivel celular y subcelular.

II. JUSTIFICACION E HIPOTESIS.

Los venenos de serpientes son mezclas únicas en lo que a propiedades bioquímicas y farmacológicas se refiere. Por su alto contenido de proteínas enzimáticas y no enzimáticas se les considera el producto de secreción más altamente concentrado que se encuentra en vertebrados (19).

Algunas de estas proteínas exhiben actividades enzimáticas, tales como fosfolipasas A2, proteinasas, nucleotidasas, fosfodiesterasas, y L-amino-oxidasas. Además de actividad proteolítica, sus enzimas pueden tener diversos efectos farmacológicos que incluyen neurotóxicos, miotóxicos, cardiotoxicos, anticoagulantes y hemorrágicos, entre otros (22).

Se ha descrito que pacientes envenenados, por serpientes de la misma especie y de la misma zona geográfica, presentan diferencias en las manifestaciones clínicas, las cuales son atribuidas a diferencias individuales en la composición de los venenos de las serpientes (141).

La exploración bioquímica y de las actividades hemostáticas de los venenos bothrópicos de diversas especies y localidades, permitirá determinar en estos venenos la presencia y proporción de distintos componentes, y cuales pueden provocar alteraciones en el sistema hemostático de las víctimas, lo cual sería de gran utilidad tanto en investigación básica como en la selección de los ejemplares

adecuados para la producción de antivenenos, principal recurso terapéutico en caso de accidente ofídico.

Muchos de los compuestos presentes en venenos de serpientes representan para humanos con manifestaciones tromboembólicas, un gran potencial como posibles agentes antiadherentes, anticoagulantes y fibrinolíticos. Las propiedades fibrino(geno)líticas de los venenos, sugieren su posible utilidad clínica en enfermedades aterotrombóticas, entre estas, el infarto al miocardio, sobre la base de que fluidifican la sangre. En esta área, las fracciones de venenos podrían ser usadas como interesantes modelos moleculares o directamente para el desarrollo de nuevos agentes terapéuticos que seguirían los ya descritos: Ancrod y Batroxobina, enzimas obtenidas a partir de los venenos de *C. rhodostoma* y de *B. atrox* respectivamente, y que han sido usadas como agentes defibrinogenantes en enfermedades tromboembólicas. (22,37).

Por otro lado, a diferencia de los factores fisiológicos de la coagulación sanguínea, los componentes de venenos de serpientes que interfieren con algunos procesos hemostáticos, son resistentes a los inhibidores fisiológicos, razón por la cual representan herramientas útiles para investigar los mecanismos de la coagulación sanguínea (22).

El aislamiento, caracterización y purificación de enzimas coagulantes, anticoagulantes o fibrinolíticas de los venenos de nuestras serpientes venezolanas, abre un enorme campo de investigación y aplicación para el diagnóstico y tratamiento de diversas patologías. Desde el punto de vista biológico, nos permitirá también describir actividades tóxicas de los venenos, que deban ser consideradas cuando se elaboren los sueros antiofídicos, por nuestros laboratorios nacionales, para asegurar que estos componentes involucrados en las manifestaciones clínicas, sean neutralizados durante el tratamiento de pacientes víctimas de accidentes ofídicos tan frecuentes en nuestra población rural.

Los venenos de nuestras serpientes venezolanas además de poseer una composición muy compleja han sido poco estudiados en lo relacionado a su acción sobre la hemostasia. Cualquier alteración del equilibrio hemostático puede conducir variaciones de la coagulabilidad de la sangre, con la consiguiente aparición de

cuadros de hemorrágicos o trombóticos que inducen coagulopatías de consumo, ocasionando en muchos casos un problema de Salud Colectiva. Por tanto, evaluar los aspectos bioquímicos y las señales de daño tisular de fracciones con actividad fibrinolítica, contribuirá a establecer el potencial de dichas fracciones así como su participación en la fisiopatología del envenenamiento bothrópico.

Para el desarrollo del proyecto se postuló la siguiente hipótesis

“Pacientes víctimas de accidente bothrópico presentan cuadros clínicos muy variables, con manifestaciones hemorrágicas que se han atribuido entre otras a alteración de la membrana basal que recubre los vasos sanguíneos, consumo de plaquetas, activación de la coagulación (consumo de factores, entre estos del Fg) y activación del sistema fibrinolítico (consumo de $\alpha 2$ - antiplasmina, incremento de productos de degradación de fibrin(ógeno) y D-dímeros. Estos hallazgos permiten postular la existencia de variaciones en la composición de los venenos, así como la presencia, entre otras, de enzimas fibrino(geno)líticas con potencial aplicación en biomedicina”

III. OBJETIVOS

OBJETIVOS GENERALES.

- ✓ Evaluar actividades biológicas y bioquímicas de venenos bothrópicos de diversas especies y localidades.
- ✓ Aislar y caracterizar fracciones con actividad fibrino(geno)lítica del veneno de *B. colombiensis*.
- ✓ Determinar señales de daño celular inducido por la(s) fracción(es) con actividad fibrinolítica provenientes del veneno de *B. colombiensis*.

OBJETIVOS ESPECIFICOS.

- ✓ Determinar algunas características bioquímicas y biológicas en los venenos de serpientes venezolanas del género *Bothrops* de diversas especies y localidades.

- ✓ Realizar un estudio comparativo a nivel de especies y localidades geográficas, de las características evaluadas en los venenos de las serpientes del género *Bothrops* en estudio.
- ✓ Caracterizar el veneno bothrópico con mayor actividad fibrinolítica.
- ✓ Identificar y aislar fracciones con actividad fibrino(geno)lítica.
- ✓ Caracterizar bioquímica y biológicamente las fracciones fibrino(geno)líticas aisladas.
- ✓ Evaluar señales de daño celular en mioblastos de embrión de pollo provenientes de cultivos primarios en Gota pendiente, inducidas por el veneno crudo y/o las fracciones fibrino(geno)líticas.

IV. METODOLOGÍA

EQUIPOS

Sistema de Cromatografía Líquida de Alta Presión (HPLC) Delta 1525 de Waters (Massachusetts, USA). Equipo para cromatografía de presión media Biologic, equipo para electroforesis y determinación de punto isoelectrico Mini-Protean II, fuente de poder Power Pac 1000 de Bio-Rad Laboratories California, USA. Balanza Discovery DV215CD de OHAUS Corporation (New Jersey USA). Concentrador Amicon 8400 de Amicon Inc. (Massachusetts, USA). pHmetro de Beckman, liofilizador LabConco. Centrífuga BR4i de Jouan. Espectrofotómetro Ultrospec 2000 de GE Healthcare Life Sciences (Uppsala, Suecia). Lector para microplacas (SUNRISE Tecan USA). Centrífuga Eppendorf 5415C de Brinkmann Instrument Inc. (Hamburgo, Alemania). Agregómetro Chrono-log Modelo 560 CA (Havertown USA). Espectrómetro de masa Voyager-de STR BioSpectrometry Workstation (MALDI-TOF-TOF), Applied Biosystems Corp. (California, USA). Estufa para cultivos celulares Thermo Scientific (Houston, TX-USA), incubadora Heraeus, homogeneizador de tejidos, Corning, equipos de disección.

MATERIALES

Sustratos cromogénicos de la casa Chromogenix AB (Milano, Italia) y fibrinógeno humano rico en plasminógeno (Kabi Vitrum, Sweden y Sigma Chemical

Co) , estándares de Factor Xa, trombina, t-PA de cadena simple (sct-PA), t-PA de cadena doble (tcu-PA) y plasmina, obtenidos de American Diagnostica Inc. (Greenwich, CT, USA). Fibrinógeno humano (Hyphen BioMed). Fibrinógeno y trombina bovinos, aprotinina, phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), 1,10-phenantroline, benzamidine/HCl, ethylene glycol-bis-N,N,N0,N0-tetraacetic acid (EGTA) ethylene diamine tetraacetic acid (EDTA), colágeno tipo IV, Laminina, gelatina de piel porcina, sales de $MgCl_2$, $ZnCl_2$ y $CaCl_2$, marcadores de peso molecular para determinar masa molecular por electroforesis (SDS-PAGE) y anfolinas, riboflavina, agarosa, Reactivos de grado analítico, Solución de Tyrode, fluorocromo catiónico 3,3 dimetiloxycarbonocianida ($DiOC_1(3)$) de Sigma Chemical Co (St. Louis, MO, USA). Colágeno, ADP, ristocetina de Chrono-log (Pennsylvania, USA). Marcadores de peso molecular para determinación de masa molecular por SDS-PAGE, estándares para punto isoelectrico, fueron obtenidos de las casas Invitrogen Corporation (Carlsbad, California USA). Acido trifluoroacético de Riedel-Haen (Alemania). Las resinas Sephadex G-100, Phenyl Sepharose CL-4B de GE, Healthcare Life Sciences (Uppsala, Suecia).

COLUMNAS DE CROMATOGRAFIA

Columna de afinidad Benzamidine-Sepharose (Hi Trap Benzamidine FF- Pharmacia Uppsala, Suecia (1 mL), columna de exclusión molecular Superosa 12 10/300 GL, y columna de intercambio catiónico Mono S HR 10/10 de GE Healthcare Life Sciences (Uppsala, Suecia), Columna de exclusión molecular Protein-Pack™ 300 sw (7,5 X 300mm) de Waters Corporation, Milford, Massachusetts, Bio-Silect SEC 125-5 (7,6X 300 mm) de Bio-Rad Laboratories California, USA. Columna de cromatografía de fase reversa Bio-Sil C-18 HL 90-5 S column (5 μ m; 4.6×150 mm-, Bio-Rad, Hercules, CA)

VENENOS

Para realización del estudio se emplearon venenos de *Bothrops atrox* capturadas en salidas de campo a las localidades de Parguasa en el estado Bolívar; Puerto Ayacucho 1, Serranía del Cuao y Puerto Ayacucho 2 en el estado Amazonas, así como de *Bothrops colombiensis* capturadas hacia el sector de El Guapo (localidades de El Guapo, Caucagua), Edo. Miranda y *Bothrops venezuelensis* de las

localidades del Cerro del Ávila (Ávila), Baruta y La Boyera, todas mantenidas en cautiverio en el Serpentario del Instituto de Medicina Tropical de la Facultad de Medicina de la Universidad Central de Venezuela.

Para la obtención de veneno fresco se realizó el ordeño de los diferentes ejemplares mediante la técnica clásica de ordeño manual. La extracción se realizó cada 25-30 días. Los venenos fueron una mezcla de varias extracciones obtenidas por localidades y guardadas separadamente.

Los venenos fueron centrifugados a 2000 g por 10 minutos a 4 °C, para retirar restos de material insoluble, luego liofilizados y mantenidos a -80°C hasta el momento de ser usados.

ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN

Se utilizaron ratones machos albinos suizos de cepa NIH con peso de 18-20 g proporcionados por el Instituto Nacional de Higiene “Rafael Rangel”, los cuales fueron mantenidos en jaulas de acero inoxidable con hidratación y suministro de alimento *ad libitum*. Los animales fueron tratados de acuerdo a las normas bioéticas establecidas en la Guía para cuidado de animales de laboratorio (142).

Embriones de pollo en estados de desarrollo 27, 35 y 37 HH (143), correspondientes a 5, 8 y 11 días de incubación respectivamente, fueron obtenidos a partir de Gallinas Shaver Red Sex-Link provenientes de la “Granja Avícola Mary”, ubicada en San Antonio de los Altos, estado Miranda.

LA OBTENCIÓN DE PLASMA

El plasma humano fresco se obtuvo a partir de muestras de sangre extraídas de donantes sin alteraciones en la hemostasia, provenientes de nuestro laboratorio, la cual se anticoaguló con citrato de sodio al 3,8 % en una relación 1:9. El plasma fue obtenido por centrifugación a 2000 g por 15 minutos a 4 °C.

CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA DE VENENOS O FRACCIONES

• DETERMINACIÓN DE CONCENTRACIÓN PROTEÍNAS.

La concentración de proteína del veneno crudo y sus fracciones, se determinó por el método de Lowry y *col.*, 1951 (144) y por el método del ácido bicinconínico (145), usando seroalbúmina bovina como patrón de referencia, También se utilizó espectrometría, asumiendo que una unidad de absorbancia es equivalente a 1mg/mL de proteína, cuando un haz de luz a 280 nm incide sobre una muestra contenida en una celda de 1 cm de longitud, según la ley de Beer (146).

• ELECTROFORESIS EN GELES DE POLIACRILAMIDA

El análisis electroforético de las proteínas se realizó en geles de poliacrilamida en presencia de SDS (SDS-PAGE), empleando los métodos descritos por Laemmli, 1970 ó Schägger y von Jagow, 1987 (147,148).

Las bandas proteicas en los geles fueron visualizadas con las tinciones de azul Coomassie R250 al 0,25% y/o tinción de plata (149).

Los marcadores de referencia (BIORAD) contenían miosina (200,000 Da), b-galactosidasa (116,050 Da), fosforilasa b (97,400 Da), seroalbúmina bovina (66,200 Da), ovoalbúmina (45,000 Da), anhidrasa carbónica (31,000 Da), inhibidor de tripsina derivado de soya (21,500 Da), lisozima (14,400 Da) y aprotinina (6,500 Da).

• DETERMINACIÓN DEL PUNTO ISOELÉCTRICO

Siguiendo el método de Garfin y *col.*, 1990 (150), se prepararon geles de acrilamida al 5% estableciendo con una mezcla de anfolitos un gradiente de pH entre 3 y 10. Para la determinación del punto isoeléctrico se elaboró una curva de referencia con estándares para punto isoeléctrico conocido en un rango de 4,45-9,6 (IEF estándar BIORAD).

Las muestras a las cuales se les determinó el punto isoeléctrico fueron las fracciones puras con actividad fibrino(geno)lítica, denominadas Colombienasa-1 y Colombienasa-2, procedentes de la cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa (CLAR-C18), empleando 17µg de Colombienasa-1 y 7,95 µg Colombienasa-2 los cuales fueron re suspendidos en 38 µL de Tris-HCl 50mM, pH 8,2 + 10 µL de

mezcla de Azul de bromofenol/glicerina 1:1. Los tampones de corrida fueron 20mM NaOH, pH 11,5 para el terminal negativo y 10 mM H₃PO₄, pH 2,1 para el terminal positivo. La corrida se realizó a 4°C y el enfoque se desarrolló en 3 etapas: 1ª etapa a 100V, 50mA y 15W; 2ª etapa a 150V, 65mA y 10W y 3ª etapa a 200V, 150mA y 20W.

Una vez finalizada la corrida se verificó la formación del gradiente de pH durante la misma, para lo cual se utilizó el primer carril que estaba libre de muestra que se cortó sobre papel milimetrado donde se había dibujado el área del gel. Esta tira de gel se cortó en 7 trozos de 1 cm² cada uno, siguiendo el orden de cátodo a ánodo. Cada uno de los trozos de gel fue sumergido en un vial que contenía 1 mL de agua destilada y se determinó el pH de cada solución pasadas 12 horas.

El gel restante, donde están las proteínas, fue fijado durante 30 minutos en solución que contenía 4% de ácido sulfosalicílico, 12,5 % de ácido tricloroacético y 30% de metanol y 42,5% de agua, finalmente fue teñido con solución de nitrato de plata (150).

• *ESPECTROMETRÍA DE MASA (MATRIX-ASSISTED LASER-DESORPTION IONIZATION TIME OF FLIGHT - MALDI- TOF-TOF)*

Se realizó como parte de la caracterización bioquímica de las fracciones Colombienasa-1 y Colombienasa-2. Este procedimiento se efectuó en el Centro “Natural Toxins Research”, Texas A&M University-Kingsville, Kingsville, TX 78363, U.S.A.

• *SECUENCIA DE AMINOÁCIDOS.*

La secuencia de aminoácidos de las fracciones purificadas fue realizada por B.Sc. Jacob Galán del Departamento de Bioquímica, Medicina y Farmacología Molecular de la Universidad de Purdue, West Lafayette, Indiana, USA.

• *FRACCIONAMIENTO DEL VENENO.*

El fraccionamiento del veneno se realizó en dos etapas, una etapa analítica, común a todos los venenos bothrópicos separados por especie y localidad, a objeto de establecer los perfiles cromatográficos de cada uno con fines comparativos. Este fraccionamiento fue por exclusión molecular.

En el caso del veneno de *B. colombiensis*, además de determinar el perfil cromatográfico, para establecer la actividad fibrinolítica en las distintas fracciones así como la contaminación con otras actividades del veneno, se realizó en la segunda etapa, un fraccionamiento preparativo, a fin de aislar y caracterizar una(s) fracción(es) con alta actividad fibrinolítica.

ETAPA I. FRACCIONAMIENTO ANALÍTICO.

Para el fraccionamiento del veneno de *B. atrox* de las localidades de Serranía del Cuao, Parguasa y Puerto Ayacucho 1 y 2, se emplearon en cada caso 3 mg de veneno, re suspendidos en 100 µL de tampón acetato de amonio, 50mM pH 6,9 con NaCl 0,125 mM, (tampón de equilibrio y elución). La columna empleada fue una Protein-Pak™ 300 sw (300 X 78 mm, Waters), la elución se realizó con el mismo tampón a una velocidad de flujo de 0,4 mL/minuto, monitoreando la absorbancia a 280 nm.

Muestras de veneno (10 mg/100 mL de tampón de equilibrio) de *B. colombiensis* de las localidades de El Guapo y Caucagua y de *B. venezuelensis* de las localidades de Ávila, Baruta y La Boyera, fueron corridas por cromatografía de exclusión molecular sobre columna Superose H12-HR (10 × 300–310 mm - Pharmacia Uppsala, Suecia) equilibrada con tampón acetato de amonio 50 mM, pH 6,9. La elución se llevó a cabo con el mismo tampón a una velocidad de flujo de 0,3 mL/min y monitoreada a 280nm.

Adicionalmente, venenos de *B. colombiensis* de ambas localidades fueron cromatografiados mediante procedimiento semi-preparativo sobre una columna de exclusión molecular de Sephadex G-100 de 2,5 X 97 cm (Pharmacia Uppsala, Suecia) equilibrada con tampón acetato de amonio 50 mM, pH 6,9. Las muestras de veneno (350 mg/4 mL) fueron disueltas en tampón de equilibrio e inyectadas a la columna. La elución se llevó a cabo con el mismo tampón a una velocidad de flujo de 0,3 mL/min y las proteínas leídas a una absorbancia de 280 nm.

Las fracciones de veneno de *B.colombiensis* con mayor actividad fibrinolítica colectadas de Sephadex G-100 fueron corridas sobre una columna de afinidad de Benzamidine-Sepharose (Hi Trap Benzamidine FF- Pharmacia Uppsala, Suecia) de 1

mL equilibrada con Tampón Tris-HCl 50 mM, pH 7,4. La elución de las proteínas retenidas se realizó con tampón glicina 50 mM, pH 3,0 y se colectaron fracciones de 0,5 mL en tubos que contenían 50 µL de tampón Tris-HCl 1M pH 9,0 para llevar a pH neutro.

ETAPA II. FRACCIONAMIENTO PREPARATIVO.

En la búsqueda de fracciones con actividad fibrino(geno)lítica el veneno de *B. colombiensis* de Cauagua se fraccionó empleando cromatografía de intercambio catiónico, seguida de interacción hidrofóbica, exclusión molecular y finalmente fase reversa

Procedimiento:

A) Inicialmente se usó la cromatografía de intercambio catiónico (IC). Ciento cincuenta miligramos de veneno total (127,75 mg de proteína) de *B. colombiensis*, fueron disueltos en 1 mL de tampón Tris-HCl 50 mM, pH 8,2 (tampón de equilibrio 1 - TE1). La solución fue centrifugada a 10.000 x g por 10 minutos y aplicada a una columna Mono S HR 10/10 (Pharmacia Uppsala, Suecia) previamente equilibrada con el TE1, la elución se realizó inicialmente con un flujo isocrático con el mismo tampón seguido de un gradiente de NaCl de 0-1M en TE1, a una velocidad de flujo de 1,5 mL/min, colectándose fracciones de 1mL/tubo. El perfil cromatográfico se determinó por la absorbancia a 280 nm.

El material eluido se agrupó siguiendo el perfil cromatográfico; luego las fracciones obtenidas fueron dializadas y concentradas mediante concentrador Amicon con membrana de corte de 10000 Da y se les determinó proteínas y se les evaluó la presencia de actividad fibrinolítica y hemorrágica.

B) Para el segundo paso de purificación se empleó una cromatografía en columna de interacción hidrofóbica. Trece mg de la fracción F2 proveniente de IC, la cual presentaba la mayor actividad fibrinolítica y escasa o ausente actividad hemorrágica, se disolvieron en 1,5 mL de tampón fosfato 0,1M- Sulfato de Amonio 1,5 M a pH 8,0 (tampón de equilibrio 2 – TE2), se aplicaron a la columna de Phenyl Sepharose CL-4B de 13X130mm, (Pharmacia Uppsala, Suecia) previamente equilibrada con el mismo tampón. Para la elución se aplicó un gradiente lineal de

sulfato de amonio (1,5-0 M), seguido de agua. La corrida se realizó a una velocidad de flujo de 1,0 mL/min y se recogieron fracciones de 2 mL. El material eluido se agrupó según el perfil cromatográfico y las fracciones obtenidas se dializaron (tampón acetato de amonio 50 mM, pH 6.8- tampón de equilibrio - TE3), concentraron y se les determinó el contenido de proteínas midiendo su densidad óptica a 280 nm y las actividades fibrinolítica y hemorrágica.

C) Para el tercer paso de purificación se empleó una cromatografía de exclusión molecular. De las fracciones obtenidas por Phenyl Sepharosa, dos concentraron la actividad fibrinolítica, denominadas F2-A y F2-B, que fueron recromatografiadas por separado. Ambas fracciones fueron previamente dializadas contra el tampón acetato de amonio 50 mM, pH 6,8 (tampón de equilibrio - TE3) y centrifugadas a 6000 x g por 10 minutos. Para la fracción F2-A se empleó una columna Superose 12 10/300GL (Pharmacia Uppsala, Suecia) equilibrada con el TE3; 1,3 mg de esta fracción resuspendidos en 100 µL de TE3 se aplicaron a la columna y la elución se realizó a una velocidad de flujo de 0,5 mL/min, colectándose fracciones de 0,250 mL.

Para la fracción F2-B se empleó una columna de exclusión molecular Bio-Silect SEC 125-5 (Bio-Rad Laboratories California, USA), equilibrada con el TE3; 0,390 mg de esta fracción resuspendidos en 50 µL de TE3, se aplicaron a la columna y la elución se realizó a una velocidad de flujo de 0,4 mL/min, colectándose fracciones de 0,250 mL. En cada caso, el material eluido se agrupó según el perfil cromatográfico y a las fracciones obtenidas se les determinaron las proteínas por densidad óptica a 280 nm y la actividad fibrinolítica.

Para evaluar el criterio de pureza se empleó una cromatografía de fase reversa sobre una columna de Simmetry® C-18 (4,6X150 mm-Waters), empleando un equipo de cromatografía de alta resolución (CLAR) Delta 1525 de Waters (Massachusetts, USA). Las fracciones activas, denominadas F2A y F2B procedentes de exclusión molecular, fueron resuspendidas en ácido trifluoroacético (TFA) al 0,12% v/v en agua, centrifugadas por 5 minutos a 5000 x g para remover material insoluble, los sobrenadantes por separado fueron inyectados a la columna previamente equilibrada con el mismo TFA 0,12%.-Tampón de equilibrio 4-TE4

En el caso de la fracción F2A se emplearon 26,1 µg y de F2B 17,23 µg; ambos casos por separado fueron resuspendidos en 200 µL de TFA 0,12%. De esta solución fueron inyectados 150 µL a la columna. La cromatografía se realizó a una velocidad de flujo de 1 mL/ min a temperatura ambiente. La elución se efectuó con un gradiente lineal de 0-60% (v/v) de acetonitrilo, en TFA 0,12%, en 60 minutos. Se monitoreó la absorbancia a 215 y 280 nm por medio del detector dual de absorbancia Waters 2487 (Milford, MI, USA). Se empleó el programa “Waters Breeze” para el almacenamiento y manejo de los datos. El procedimiento global de este fraccionamiento se resume en el Figura 6.

DETERMINACIÓN DE ACTIVIDADES BIOLÓGICAS

• LETALIDAD. DOSIS LETAL CINCUENTA (DL_{50}).

La letalidad es expresada como Dosis Letal Media (DL_{50}) y definida como la menor cantidad de veneno o fracción capaz de causar la muerte al cincuenta por ciento de la población animal inoculada. Se determinó mediante el método de Spearman-Kärber (151), propuesto por la Organización Mundial de la Salud (OMS). Dosis seriadas de veneno o de las fracciones liofilizadas (0,175 a 2,5 µg/ 0,2 mL de NaCl al 0,85%) se administraron por vía intraperitoneal (ip) a grupos de 5 ratones por dosis. Posteriormente a las 24 y 48 horas post-tratamiento se registró el número de animales vivos y muertos. El grupo control fueron inyectados con solución salina isotónica.

• ACTIVIDAD HEMORRÁGICA EN PIEL.

Se empleó una modificación del método de Kondo y col., 1960, (152) realizada por Gutiérrez y col., 1985 (153). La actividad hemorrágica se expresó como la dosis hemorrágica mínima (DHM), que es la dosis mínima de veneno capaz de producir una lesión hemorrágica subcutánea con un diámetro de 10 mm, en un tiempo de 2 horas. Se inyectaron dosis seriadas subletales (0,5 a 0,0039 µg/ µL) del veneno disuelto en 0,1 mL de solución salina isotónica en un volumen final de 0,1 mL por vía intradérmica (id) en la región abdominal, empleando 4 ratones por dosis. Los ratones del grupo control fueron inyectados con solución salina isotónica. Pasadas dos horas se sacrificaron los animales, se les disecó la piel y se midió el área hemorrágica en la

cara interna de la misma y se determinó el diámetro de la lesión desarrollada empleando la ecuación: $D = 2r = 2\sqrt{A/\pi}$.

• *ACTIVIDAD FIBRINOLÍTICA*

La actividad fibrinolítica del veneno crudo y fracciones se determinó utilizando el método de placas de fibrina, reportado por Marsh y Arocha-Piñango, 1972 (154). Estas, se prepararon a partir de fibrinógeno humano ó bovino que contenía 10% de plasminógeno como contaminante, o fibrinógeno libre de plasminógeno (0,1%, en tampón Imidazol 50 mM-NaCl 0,15 M, pH 7,4). En placas de petri de 35 mm, niveladas, se agregaron 1500 µL de una solución de fibrinógeno al 0,3% y 75 µL de una solución de trombina bovina (10 UI/mL (CaCl₂ 0,025 M), se mezcló e incubó a temperatura ambiente por 30 minutos. Una vez consolidado el coágulo se aplicó sobre el centro del gel 10µL de las muestras a diferentes concentraciones. Después de incubar 24 horas a 37°C se determinaron las áreas de lisis (mm²). La actividad fibrinolítica se expresó como el área por µg de proteína (mm² / µg). Como controles positivos se emplearon plasmina humana, sct- PA y tcu-PA.

En el caso de la evaluación de actividad fibrinolítica en placas de fibrina con fibrinógeno libre de plasminógeno se empleó el fibrinógeno humano (Hyphen BioMed), ensayando las fracciones Colombienasa-1 y Colombienasa-2, así como veneno total, empleando en todos casos 10 µg de proteína por placa. Se compararon con placas en idénticas condiciones pero elaboradas con fibrinógeno rico en plasminógeno de esta misma casa comercial.

• *ZIMOGRAFÍA EN GEL DE FIBRINA*

Se realizó de acuerdo al método de Carvajal y Arocha-Piñango ,1991 (155). Inicialmente se corrió en un gel de poliacrilamida-SDS al 12% en condiciones no reducidas una mezcla de marcadores de pesos moleculares precoloreados y veneno cuya área de lisis en placas de fibrina fue aproximadamente de 600 mm². Finalizada la corrida, para eliminar el SDS, el gel se lavó 2 veces con Tritón X-100 al 0,2%, agitando constantemente durante una hora a temperatura ambiente, luego el gel se lavó con agua destilada y se colocó sobre una placa de fibrina-agarosa preparada sobre una lámina de gel bond, mezclando 8,5 mL de fibrinógeno humano en

presencia de plasminógeno (1,2% en buffer imidazol-salino, pH 7,4), con 8,5 mL de agarosa de bajo punto de fusión 2,5% (w/w) y 2 mL de trombina (1 UI/mL en CaCl_2 0,025 M). La mezcla se vertió sobre la lámina de GelBond (8 X10 cm), y se dejó formar la malla de fibrina durante 30 minutos a temperatura ambiente.

El gel de electroforesis se colocó sobre la capa de fibrina-agarosa se incubó a 37 °C por 18 horas en cámara húmeda. Transcurrido el tiempo se separó la placa de fibrina del gel y se coloreó con Amido Black (0,1% en una mezcla de metanol/ácido acético/agua (70:10:20) por 5 minutos, luego se decoloró con varios cambios en metanol puro, hasta que el fondo de la lámina permitiera distinguir las áreas de lisis. La lámina se secó en estufa a 37 °C y la actividad fibrinolítica se evidenció como bandas claras sobre el fondo oscuro. Se empleó plasmina como control positivo. Las masas moleculares de las bandas activas se determinaron por medio de estándares de peso molecular pre teñidos.

• *ACTIVACIÓN DEL PLASMINÓGENO.*

Para determinar la presencia de activadores del plasminógeno se empleó como sustrato plasma humano citratado o plasminógeno purificado (Chromogenix AB - Mölndal Sweden), por modificación del método de Mussoni y colaboradores (1976) (156), el cual se fundamenta en activar el plasminógeno con estreptoquinasa y determinar la plasmina generada por medio de un sustrato cromogénico específico para esta enzima, el S-2251.

A fin de escoger la concentración óptima de estreptoquinasa (SK) se realizó una curva de calibración usando una cantidad fija de plasminógeno (10 µg) y cantidades variables de estreptoquinasa (100, 10, 1 y 0,1 UI). En una placa de poliestireno de 96 pozos se colocaron 40 µL (10 µg) por pozo de plasminógeno y 40 µL de estreptoquinasa; la placa se incubó durante 10 min a 37°C, posteriormente se colocaron 20 µL del sustrato cromogénico, luego la placa tapada se incubó a 37°C. Finalmente se determinó la absorbancia a 405 nm a los 15 y 30 min en un lector para microplacas. Se escogió 0,1 UI de SK con una absorbancia a 405 nm de 1,046.

Para el ensayo con las Colombienasas, se empleó una relación 10:2 plasminógeno: fracción. La mezcla contenía 6,6 µL Plasminógeno (1,5 mg/mL), 10 µL de SK (entre 100 y 0,1 UI/mL) o fracción (2 µg / 3,8 µL para Colombienasa-1 y 2

µg/6,8 µL para Colombienasa-2), 26,6 µL de sustrato S-2251 (3mM) y tampón en cantidad suficiente para completar 100 µL de mezcla. Se incubó por 15 min a 37°C y se le determinó la densidad óptica a 405 nm.

• *DEGRADACIÓN DE LA FIBRINA.*

Adicionalmente, la actividad fibrinolítica se evaluó por medio del patrón de degradación de la fibrina seguido por electroforesis. Fibrina entrecruzada se preparó mezclando 25 µL de fibrinógeno bovino-3mg/mL (Sigma), 1µL de factor XIII (purificado en el laboratorio), 5µL de trombina bovina (20 UI/mL, en KCl 0,15 M/CaCl₂ 0,25M); luego de 3 horas a 37°C, a los coágulos formados se les agregó 10 µL de una solución de plasmina (2 µg), veneno o fracciones activas (5 µg), y se incubó a 37°C por 0 , 30 y 90 min, 3 y 24 horas cuando se trató con plasmina y por 0, 30 min, 4 y 24 horas cuando se trató con veneno o fracciones activas. La reacción se detuvo colocando las muestras en un baño de hielo, agregando 25 µL de mezcla reductora (SDS 2%-DTT 2%), luego se hirvieron por 15 minutos y a la solución resultante se le agregaron 10 µL de azul de bromofenol 0.025% en glicerol. Se empleó como control positivo la plasmina (157) Las muestras fueron sometidas a electroforesis en geles al 7%, utilizando el sistema Tris-Tricina (148) y visualizando las bandas proteicas con azul de Coomassie (0,5%).

• *ACTIVIDAD FIBRINOGENOLÍTICA.*

El efecto del veneno y/o las fracciones sobre las cadenas del fibrinógeno se evaluó por medio de electroforesis y por la actividad coagulante remanente, para lo cual se empleó una solución de fibrinógeno humano (American Diagnostica Inc. Stanford CT, USA) (5 mg/mL en tampón Tris-HCl 0,05M pH 7,5). El fibrinógeno se incubó a 37°C con el veneno y/o sus fracciones, inicialmente en distintas proporciones durante 4 horas, a fin de escoger la proporción adecuada para luego evaluar distintos tiempos de incubación y así determinar la cinética de la degradación de la (s) cadenas(s). La electroforesis se realizó geles al 10%, en condiciones reductoras, utilizando el sistema Tris-Tricina y visualizando las bandas proteicas con azul de Coomassie (0,5%).

- *ACTIVIDAD COAGULANTE REMANENTE*

La actividad coagulante remanente del fibrinógeno tratado con el veneno crudo o con las fracciones activas purificadas, se evaluó empleando la solución de fibrinógeno incubada con veneno crudo o Colombienasa-1 a una relación de 100:0,1 y 100:1, para Colombienasa-2, incubando por 1 hora a 37°C. Al final de la incubación a cada 100 µL de solución se le agregaron 100 µL de una solución de trombina bovina (2,5 UI/mL en CaCl₂ 0,025 M), y se registró el tiempo en formar un coágulo, comparando el resultado con el fibrinógeno control en presencia del tampón de coagulación (Tris 0,05 M-NaCl 0,15 M pH 7,4).

- *ACTIVIDAD COAGULANTE*

Para el ensayo de la actividad coagulante del veneno crudo o sus fracciones se empleó como sustrato fibrinógeno bovino o plasma citratado fresco congelado, según se estuviera evaluando la actividad semejante a trombina o procoagulante, siguiendo la metodología de Austen y Rhymes, 1975 (158).

Se emplearon 100 µL de plasma citratado o solución de fibrinógeno al 0,3% en tampón Tris-HCl 0,05 M pH 7,4 (tampón de coagulación), incubando por 3 minutos a 37 °C, luego se añadieron 100 µL de tampón de coagulación y 100 µL de solución de trombina (0,5 a 15 UI/mL) ó 100 µL de veneno crudo ó fracción (100 µg /mL), se mezcló y registró el tiempo de coagulación a 37° C. Como referencia se empleó una solución de trombina ajustada a 2,5 UI/mL, preparada con tampón de coagulación, con lo cual se debe registrar un tiempo de coagulación entre 18 y 22 segundos para el plasma.

La actividad semejante a trombina presente en el veneno crudo o sus fracciones, es reportada en UI/mL, al extrapolar los resultados en una curva de calibración realizada con un patrón de trombina.

- *ESTABILIDAD DE LA ACTIVIDAD FIBRINO(GENO)LÍTICA.*

A la actividad fibrino(geno)lítica presente en las fracciones activas purificadas se le determinó la estabilidad ante diferentes inhibidores de proteasas, iones metálicos, temperaturas y pHs.

o *EFFECTO DE INHIBIDORES DE PROTEASAS.*

La actividad fibrinogenolítica presente en los venenos crudos y/o fracciones se evaluó en presencia de inhibidores de proteasas. Para el caso de inhibidores de serino proteasas se empleó 50 µg/mL SBTI (inhibidor de tripsina derivado de soya), 10 mM PMSF (Fenil metil sulfonil fluoruro), 10 mM benzamidina/HCl, y 100 UI/mL aprotinina. En el caso de inhibidores de metaloproteasas se emplearon 10 mM EDTA-Na, 10 mM EGTA-Na, 10 mM 1,10 fenantrolina; como inhibidor de cisteína proteasas se utilizó 2 mM de Ditiotreitól (DTT) , concentración final (56). El veneno y/o fracción fue incubado por 30 minutos a 37 °C con cada mezcla de inhibidores. Transcurrido este tiempo el fibrinógeno fue incubado a 37° C con el veneno ó las fracciones a la relación de 100:0,1 (mg fibrinógeno/ mg veneno) para el veneno crudo; 100:0,2 para la Colombienasa-1 y 100:1 para la Colombienasa-2, tiempos en los cuales se visualizó la degradación de las cadenas del fibrinógeno por SDS-PAGE al 10% en condiciones reducidas en sistema Tris-Tricina y evidenciando las bandas proteicas con azul de Coomassie (0,5%).

En el caso de la actividad fibrinolítica evaluada en placas de fibrina la inhibición se expresó en porcentaje comparando el área de lisis observada en ausencia de los inhibidores.

o *EFFECTO DE IONES METÁLICOS.*

Tomando en cuenta que la actividad fibrinogenolítica era inhibida por agentes quelantes de metales, se llevó a cabo el ensayo tratando las fracciones Colombienasa-1 y Colombienasa-2 previamente con EDTA, luego se adicionaron iones metálicos (MgCl₂, ZnCl₂ y CaCl₂, CoCl₂, NaCl, KCl) a fin de determinar cual era capaz de revertir el efecto inhibitorio, procediendo de la siguiente manera: 2 µL (0,025 µg/ µL) de la Colombienasa-1, ó 2 µL (0,125 µg/ µL) de Colombienasa-2 fueron mezclados con 2 µL de EDTA (concentración final 10 mM) e incubados por 30 minutos a 37°C. Transcurrido este tiempo se añadió a la mezcla de reacción, 4 µL de los iones Mg⁺², Zn⁺² y Ca⁺², Co⁺², K⁺ y Na⁺ en concentraciones a 2,5 mM, 5,0 mM y 10 mM (concentraciones finales) respectivamente. La mezcla se incubó con el fibrinógeno a las condiciones previamente establecidas (159). Transcurrido este tiempo se evaluó la actividad fibrinogenolítica por electroforesis en SDS-PAGE.

o *EFFECTO DE LA TEMPERATURA.*

El veneno crudo o las fracciones activas purificadas fueron incubados a las temperaturas de 0, 22, 37 y 56°C durante diferentes períodos (56). Luego se incubó con el fibrinógeno a las condiciones establecidas y se evaluó la actividad fibrinogenolítica remanente por electroforesis en SDS-PAGE sobre un gel al 10%, en condiciones reductoras, en sistema Tris-Tricina y visualizando las bandas proteicas con azul de Coomassie (0,5%).

o *EFFECTO DEL PH*

El pH óptimo para la actividad enzimática fue determinado incubando el veneno total ó las fracciones purificadas en tampones con pH entre 2 y 10, por 30 y 120 minutos (56). Se emplearon tampón citrato-fosfato 0,15M para los pHs 3, 4, 5 y 6; tampón Tris-HCl 50mM para los pHs 7,8 y 9 y tampón carbonato-bicarbonato 0,2 M para pH 10. Posteriormente, el veneno o fracciones pretratadas a distintos pHs, se mezclaron con el fibrinógeno a la relación 100:0, 1 para el veneno crudo, 100:0,2 para Colombienasa-1, y 100:1 para Colombienasa-2; luego se incubaron por 30 minutos a 37° C y se evaluó la actividad fibrinogenolítica por electroforesis en SDS-PAGE sobre un gel al 10%, en condiciones reductoras en sistema Tris-Tricina y visualizando las bandas proteicas con azul de Coomassie (0,5%).

• *ACTIVIDAD PROTEOLÍTICA SOBRE PROTEÍNAS DE MATRIZ EXTRACELULAR Y MEMBRANAS BASALES.*

El efecto del veneno crudo y de las fracciones Colombienasa-1 y Colombienasa-2 sobre las proteínas de matriz extracelular y membranas basales, fue evaluado empleando como sustratos laminina de membranas basales de sarcoma murino y colágeno tipo IV de membranas basales de placenta humana, comerciales y fibronectina purificada a partir de plasma humano en nuestro laboratorio (160). Para el análisis de la laminina y la fibronectina las incubaciones fueron a 37° C, en el caso del colágeno tipo IV fue a 25° C, empleando para todos una relación 50:1. Los tiempos de incubación fueron de 2 y 24 horas, deteniendo la reacción al colocar la mezcla en baño de hielo y agregando 2 µL de azul de bromofenol en glicerol al 20% y 3 µL de DTT 2%-SDS 2%. Los cambios en las moléculas fueron visualizados a través de electroforesis (PAGE-SDS) en condiciones reducidas (Guerrero y col.,

2010). Las muestras se hirvieron por 1 minuto y se aplicaron en geles de Laemmli al 7,5%. Las corridas se realizaron a 4°C, voltaje constante de 80 voltios por 3 horas o hasta cuando el marcador del frente de corrida llegó a 1 cm del borde del gel. Se incorporaron controles de proteínas de matriz frescas, es decir sin tratar con el veneno o las fracciones e incubadas por 2 y 24 horas.

- *ACTIVIDAD GELATINOLÍTICA*

La actividad gelatinolítica del veneno y sus fracciones se ensayó empleando geles de acrilamida al 7,5 % donde estaba copolimerizada la gelatina (1 mg/mL). Una vez polimerizado el gel acrilamida-gelatina se colocaron muestras de 5 µg de veneno total y/o fracciones purificadas, diluidas en tampón de muestra. El gel fue corrido en condiciones no reducidas a 20 mA y a 4°C. Una vez terminada la corrida, para remover el SDS, el gel se incubó a temperatura ambiente por 30 minutos en solución de Tritón X- 100 a 2,5%, luego se realizaron 3 lavados con agua destilada por 5 minutos cada uno, con agitación suave y continua; y finalmente el gel se incubó durante toda la noche a 37°C en tampón Tris-HCL 50 mM pH 7,3 + 200 mM de NaCl + 1mM de CaCl₂ + 1mM MgCl₂.6H₂O. Para determinar la actividad gelatinolítica el gel se coloreó con azul de Coomassie (0,5%) por dos horas y luego se decoloró en mezcla etanol: ácido acético: agua (30:7:63). Las zonas claras del sustrato lisado que contrastan con el fondo oscuro, revelan la presencia de enzimas que degradan la gelatina (161).

- *ENSAYOS DE AGREGACIÓN PLAQUETARIA.*

La agregación Plaquetaria fue evaluada por método turbidimétrico empleando un agregómetro Chrono-Log modelo 560 CA (Havertown, USA) de dos canales.

Se empleó sangre fresca obtenida de adultos voluntarios sanos (investigadores del Laboratorio de Coagulación, IVIC), que no hubieran ingerido ningún tipo de antiplaquetario en los 14 días que antecedían al ensayo y que se encontraban en ayuno de 8-10 horas. La muestra de sangre se dejó drenar directamente en los tubos plásticos que contenían citrato de sodio al 3,8% en una relación de 9 partes de sangre por cada parte de citrato, mezclando luego suavemente. Las muestras se centrifugaron a 190 x g, a 23° C por 20 minutos para sedimentar glóbulos blancos y eritrocitos, obteniendo de esta forma el Plasma Rico en Plaquetas (PRP). El resto de

la sangre se centrifugó nuevamente a 1700 x g, a 23° C 15 minutos para obtener el Plasma Pobre en Plaquetas (PPP). Las plaquetas se contaron en cámara de Neubauer, ajustando con PPP la concentración a 300.000 plaquetas/mL.

Para el ensayo, 450 µL de PRP fueron preincubados a 37°C durante 10 minutos en cubetas de vidrio siliconadas contentivas de sendas barritas agitadoras, con agitación continua de 1.200 rpm. Luego se añadieron 10 µL (3 µg) de fracción 4 minutos antes de añadir los inductores de la agregación plaquetaria. La agregación de las plaquetas se indujo con 4,5 µL ADP (concentración final de 10µM), 1 µL de colágeno (2,5 µg/mL concentración final) ó 4,5 µL de ristocetina (concentración final de 0,5; 1,0 y 1,25 mg/mL, respectivamente). Los cambios de transmitancia fueron seguidos continuamente durante 8 minutos. La respuesta de máxima agregación obtenida después de la adición del inductor en ausencia de fracción representó el 100% de agregación. El porcentaje de agregación en presencia de las muestras se calculó comparando la transmitancia obtenida en presencia de fracción con el control para cada inductor. Los porcentajes de agregación plaquetaria de referencia para PRP normales son para ADP 71-88%, colágeno 70-94% y ristocetina 55,5-99 %.

•ACTIVIDAD HEMOLÍTICA INDIRECTA

La actividad hemolítica Indirecta fue ensayada de acuerdo al método de Theakston y Reid, 1983 (162). Para la realización de esta prueba se empleó un soporte que consiste en una mezcla de agar:sangre y yema de huevo en placas de Petri. Luego se realizaron perforaciones de 3 mm de diámetro, en los cuales se dispensaron 20 µL de veneno crudo ó fracciones (Colombienasa-1 y Colombienasa-2) en concentraciones de 25 y 50 µg/20µL.

Las placas se incubaron en cámara húmeda a 37°C durante 24 horas y se midieron los diámetros de los halos de hemólisis de cada una de las dosis. Se empleó solución salina como control negativo y veneno crudo de *Crotalus durissus cumanensis* como control positivo. Cada experimento se realizó por triplicado.

•ACTIVIDAD EDEMATIZANTE.

Se utilizó el método propuesto por Yamakawa y col. 1976 (163) y modificado por Scannone, con base en Manual de Instituto Clodomiro Picado (comunicación personal Dr. Héctor Scannone). Para la determinación de la Dosis Edematizante

Mínima (DEM), se prepararon cinco (5) dosis de veneno a ensayar, utilizando solución salina isotónica como diluyente. Se inyectó 0,05 mL de cada solución en la almohadilla plantar del miembro posterior derecho a grupos de cuatro ratones ($n = 4$). La almohadilla plantar del miembro posterior izquierdo se inyectó con 0,05 mL de solución fisiológica como control. Una hora después de las inyecciones, se procedió a dormir con éter y sacrificarlos por dislocación cervical mecánica, seguidamente se seccionaron los dos miembros posteriores inyectados a la altura de la articulación tarsal y pesados en balanza analítica. Los resultados se expresaron como Dosis Edematizante Mínima (DEM) definida como la cantidad de veneno que induce un edema de un 30% de, con respecto al miembro posterior control, después de una hora de exposición.

Para la determinación de la actividad edematizante de las fracciones Colombienasa-1 y Colombienasa-2, se empleó como referencia la Dosis Edematizante Mínima (DEM) calculada en el Laboratorio de Investigaciones de la Facultad de Farmacia de la Universidad Central de Venezuela, para el veneno crudo de *B.colombiensis*. Tomando esta DEM de 3 μg / animal, se prepararon soluciones de las fracciones Colombienasa-1 y Colombienasa-2 conteniendo 3 μg /50 μL de solución de NaCl al 0,85% y se realizaron los ensayos como se describe previamente a la extremidad izquierda.

- *ACTIVIDAD AMIDOLITICA.*

Los sustratos cromogénicos representan pequeños péptidos de 3-5 aminoácidos unidos en su extremo a un cromóforo (paranitroanilina-pNA), cuya secuencia imita el sitio de clivaje sobre sustrato natural por la enzima que se está evaluando. La ruptura enzimática libera el cromóforo y se genera color, el cual se determina a 405 nm (164).

Se evaluó la actividad amidolítica empleando sustratos cromogénicos (Chromogenix-Instrumentation Laboratory, Milano, Italia) para enzimas con actividad coagulante semejantes a factor Xa (S-2222) y trombina (S-2238); y con actividad fibrinolítica semejantes a plasmina (S-2251); t-PA (S-2288); calicreína (S-2302) y uroquinasa (S-2444). Las concentraciones finales para los sustratos fueron 0,60 mM S-2238; 0,80 mM S-2251; 1,20 mM S-2288; 1,00 mM S-2302; 0,30mM S-2444.

Se emplearon como controles positivos patrones de trombina, plasmina, t-PA y uroquinasa.

En todos los casos las determinaciones se hicieron en placas de 96 pozos, con el sustrato cromogénico correspondiente. En cada pozo, se colocaron 70 μ L de tampón (recomendado para cada sustrato en particular), 20 μ L de la muestra (a diferentes concentraciones) y 10 μ L del sustrato a la concentración adecuada, colocando éste, siempre al final, mezclando e incubando a 37 ° C entre 5 y 30 minutos. Luego se realizó el registro de absorbancia a 405 nm, empleando un lector para microplacas (Sunrise, TECAN. USA). La actividad amidolítica se expresó como mUA 405 nm/min y la actividad específica como mUA/min/mg (165).

- *RECONOCIMIENTO DE LAS COLOMBIENASAS POR SUERO ANTIOFÍDICO POLIVALENTE DE LA FACULTAD DE FARMACIA-UCV (SAOP).*

Mediante el empleo de la técnica de inmunodifusión doble en geles de agarosa (166), se realizó la detección de anticuerpos anti-Colombienasas en el suero antiofídico polivalente (SAOP), principal recurso terapéutico en caso de accidente por mordedura de serpiente en el país. Dicho suero es elaborado en la Facultad de Farmacia de la Universidad Central de Venezuela y neutraliza al menos 2 mg de veneno de *B. colombiensis* /mL de suero.

Láminas portaobjetos fueron pretratadas con agarosa al 1% y luego cubiertas con 3,5 mL de agarosa al 2%. Una vez solidificado el gel se perforaron pozos equidistantes y distribuidos, uno central y 6 periféricos. En el pozo central se colocaron 10 μ L de SAOP y en cada pozo periférico 10 μ L de Colombienasas, conteniendo 26,1; 13,05 y 6,53 μ g/pozo de Colombienasa-1 y 17,0; 8,5 y 4,25 μ g/pozo de Colombienasa-2. Se incubó a 37°C por 24 horas. Una vez detectada la banda de precipitación, se lavó la lámina con solución salina 0,9% y se coloreó con Azul de Coomassie.

ENSAYOS DE CITOTOXICIDAD

- *EVALUACIÓN DE LA CITOTOXICIDAD DEL VENENO DE B. COLOMBIENSIS Y DE LAS FRACCIONES F2, F3, COLOMBIENASA-I Y COLOMBIENASA-2.*

La citotoxicidad del veneno crudo y fracciones con actividad fibrinolítica purificadas (Colombienasas) fue evaluada por medio de ensayos *in vitro* con cultivo de mioblastos de tejido esquelético y cardíaco de embrión de pollo, en gota pendiente..

Preparación de extracto de embrión de pollo (suplemento nutritivo).

Se emplean embriones de ocho días de desarrollo, ya que esto produce un extracto de mejor calidad. Huevos fértiles incubados por ocho días a una temperatura de 37 °C, 70% de humedad relativa y ventilación adecuada, fueron esterilizados con etanol al 70 %. Se realizó una perforación sobre la zona de la cámara de aire, retirando la cubierta calcárea que recubre esta zona. Al eliminar la membrana que separa la cámara de aire del resto del embrión, cada embrión expuesto fue extraído, separado de las membranas que lo rodean y tomado por la región cervical colocándolo en una cápsula de Petri estéril que contenía solución de Tyrode(137mM NaCl, 2.7mM KCl, 1.8mM CaCl₂, 0.49mM MgCl₂, 0.42mM NaH₂PO₄, 11.9mM NaHCO₃ and 11.1.mM glucosa). Bajo microscopio estereoscópico, se removieron los globos oculares y el tejido hepático a fin de evitar contaminación con pigmentos y enzimas proteolíticas. Los embriones fueron homogenizados en homogenizador de tejidos y el material fue centrifugado a 2000 x g, a 25°C durante 15 minutos siendo el sobrenadante el extracto embrionario (167).

- *OBTENCIÓN DE MONOCAPAS DE MIOBLASTOS EN CULTIVO EN GOTA PENDIENTE..*

Las monocapas celulares fueron obtenidas a partir de explantes de tejido muscular esquelético de miembro inferior de embrión de pollo, para esto se emplearon embriones de 11 días de incubación y tejido cardíaco proveniente de embriones de 5 días de incubación.

Para el cultivo primario de los mioblastos en gota pendiente (168) se extrajeron los embriones, luego se procedió a la extracción de los corazones o miembros inferiores, se colocaron por separado en un portaobjeto excavado donde fueron

disecados en pequeños fragmentos (aproximadamente 1 mm³). Cada fragmento se colocó sobre un cubre objeto estéril adicionando 100 µL de mezcla 1:1 extracto embrionario-plasma de pollo. Seguidamente se colocó un porta objetos excavado sobre el cubreobjeto y se volteó, de esta manera el explante se encontraba dentro de una cámara sellada, totalmente adherido en oposición a la gravedad. Finalmente, el montaje anterior fue sellado con parafina evitando así la deshidratación y se incubó a 37 °C y 70% de humedad por 24 horas (Figuras 7 y 8).

La viabilidad celular se garantizó por el seguimiento permanente de la actividad contráctil de las células de la monocapa de cultivo.

- *DAÑO CELULAR INDUCIDO POR EL VENENO CRUDO DE B.COLOMBIENSIS.*

La descripción del daño celular se realiza en dos etapas:

Primera:

Para este ensayo se cultivaron explantes de tejido cardíaco de embrión de pollo de 5 días de desarrollo durante 24 horas. Las monocapas de mioblastos cardíacos obtenidas fueron seleccionadas de acuerdo a la extensión y homogeneidad del halo de crecimiento y divididas en 2 grupos: control y tratadas. Las monocapas seleccionadas fueron sometidas en forma aguda a una concentración de referencia de 40 µg/100mL por 1 hora a 37°C. Cambios morfológicos a nivel de citoplasma y núcleo fueron observados tanto en las células vivas como en las células fijadas, empleando para ello un microscopio de contraste de fases para las células vivas y de luz directa para las células fijadas en formalina y coloreadas con Hematoxilina-Eosina.

Segunda:

- *CÁLCULO DE LA CONCENTRACIÓN LETAL CINCUENTA (CL₅₀).*

Ampliación del rango de concentración para el cálculo de la CL₅₀:

Para estimar la CL₅₀, se empleó el cultivo primario en gota pendiente, a través de un ensayo de toxicidad aguda para lo cual se determinó la proporción de muerte celular, en términos de porcentaje de respuesta todo o nada, en función de la concentración del veneno crudo.

Las monocapas de mioblastos cardíacos obtenidas a partir del cultivo en Gota pendiente, fueron seleccionadas de acuerdo a la extensión y homogeneidad del halo

de crecimiento y divididas en 2 grupos: control y tratadas. Las monocapas escogidas fueron sometidas en forma aguda a distintas diluciones del veneno crudo (20, 10, 5, 2,5 y 1,25 $\mu\text{g}/100\mu\text{L}$) e incubadas durante 1 hora a 37 ° C.

La cardiotoxicidad se determinó sobre monocapas de mioblastos controles y tratadas, fijadas y coloreadas con hematoxilina-eosina (H-E), a través del conteo directo al microscopio, del número de células de forma redondeada en una población total de 120 células/cultivo, distribuidas en cuatro cuadrantes delimitados alrededor del explante, contando 30 células/cuadrante. Los datos obtenidos fueron procesados en MATLAB® (MathWorks, USA) con lo cual se obtuvo la relación concentración-respuesta y la estimación de la CL_{50} , así como los respectivos intervalos. La Concentración Letal 50 se obtuvo mediante las técnicas de Modelos Lineales Generalizados. El modelo empleado fue Logit-Binomial (Distribución binomial para los datos tomados a una misma concentración y función logit como enlace).

- *ENSAYO DE TOXICIDAD AGUDA CON EL VENENO CRUDO Y LAS FRACCIONES F2, FRACCIÓN FIBRINOLÍTICA-NO HEMORRÁGICA Y F3, FRACCIÓN FIBRINOLÍTICA-HEMORRÁGICA EN MIOBLASTOS DE MÚSCULO ESQUELÉTICO DE EMBRIÓN DE POLLO.*

Las monocapas de mioblastos obtenidas a partir del cultivo primario en Gota pendiente de explantes de músculo esquelético, seleccionadas de acuerdo a la homogeneidad del halo de crecimiento, fueron puestas en contacto directo con 15 $\mu\text{g}/100\mu\text{L}$ de fracción F2 o F3, provenientes de la cromatografía de intercambio catiónico (Mono S10/10), incubadas durante una hora a 37°C. Una vez transcurrido el tiempo de exposición, la miotoxicidad se determinó sobre monocapas controles y tratadas fijadas, coloreadas con hematoxilina-eosina (H-E) y observadas al microscopio.

La digitalización de las imágenes de las monocapas de cultivo expuestas a las fracciones fibrinolíticas permitió la elaboración de histograma en escala de grises para el análisis morfométrico.

- *FLUOROCROMO $DiOC_1(3)$ Y MIOBLASTOS CARDIACOS.*

La preparación del fluorocromo catiónico 3,3 dimetiloxicarbonocianida ($DiOC_1(3)$) (169) fue realizada a partir de una solución madre, del producto Sigma, de

0,1 mg/mL. La solución de incubación fue preparada con una mezcla de 10 ml de solución Tyrode + 650 μ L de solución madre.

Explantos de tejido cardíaco de embrión de pollo de 5 días de desarrollo fueron cultivados durante 24 horas (168). Las monocapas de mioblastos cardíacos obtenidas fueron seleccionadas de acuerdo a la homogeneidad, confluencia y extensión del halo de crecimiento celular y fueron divididas en dos grupos: control y tratadas. Las monocapas de mioblastos seleccionadas fueron puestas en contacto directo con 50 μ g/100 μ L de veneno crudo o fracciones Colombienasa-1 y Colombienasa-2, durante una hora a 37°C. Una vez terminado el tratamiento fueron incubadas en solución DiOC₁(3), durante 1 min, lavadas x3 con solución Tyrode y montadas al microscopio invertido (Olympus IX71) para fluorescencia, equipado con plancha térmica a 37°C, para observación de las células vivas y filtros de excitación Azul (λ_{exc} AZUL). Las imágenes fueron capturadas con una cámara CCD DP71 y procesadas con Adobe Photoshop CS3 y PowerPoint.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos se expresan como medias $\pm$ DE, empleando n=3. Las medias y desviaciones estándar fueron calculadas empleando Microsoft Excel

En caso de diferencias entre los grupos experimentales, las comparaciones se realizaron mediante análisis de varianza ANOVA de una vía empleando el test de comparación múltiple de Tukey (GraftPad).

V. RESULTADOS

1. CARACTERIZACIÓN DE VENENOS BOTHRÓPICOS DE DIFERENTES ESPECIES Y LOCALIDADES.

1.1. BIOQUÍMICA

1.1.1 PERFIL ELECTROFORÉTICO

Se evaluaron los perfiles electroforéticos en geles de poliacrilamida en presencia de SDS (PAGE-SDS) y condiciones reducidas, de venenos de serpientes de *Bothrops atrox*, *B. venezuelensis* y *B. colombiensis*. Los polipéptidos hallados fueron clasificados en cinco grupos, basados en la masa molecular relativa de los mismos, estableciéndose que los muy altos son mayores a 200 kDa, altos entre 200-66,2 kDa, intermedios entre 66,2-21,5 kDa, bajos entre 21,5-6,5 kDa y muy bajos los menores a 6,5 kDa. Los resultados se muestran por especies de serpientes.

El perfil electroforético de los venenos de *B. atrox* bajo condiciones reducidas muestran en común un grupo de bandas entre 50-45 kDa, 27-20 y 15 kDa. Se presentaron algunas diferencias entre las 4 localidades geográficas. En el veneno de Serranía del Cuao se observó mayor número de bandas proteicas con masas moleculares altas y bajas. El veneno Puerto Ayacucho 2 mostró abundantes bandas de bajo peso molecular (Figura 9A).

Los venenos de *B. venezuelensis* mostraron en común un rango de bandas entre 32-28 kDa y entre 18 y 16 kDa aproximadamente (Figura 9B), con algunas diferencias entre ellos. El veneno de Bv-Baruta presenta el mayor número de bandas, 16 aproximadamente, entre estas de 45 y 31, y otras entre 25,5 y 14,4 18 kDa que no se observan en los demás venenos. Los venenos de Bv-Aragua y La Boyera muestran aproximadamente 14 y 13 bandas, respectivamente (Figura 9 B).

Los venenos de *B. colombiensis* presentaron patrones electroforéticos muy parecidos. En el veneno de El Guapo, las bandas comprendidas entre 62 y 31 kDa son más intensas. En el de Cauagua se observó una banda adicional de masa molecular superior a 21,5 kDa (Figura 9C).

1.1.2. PERFIL CROMATOGRÁFICO.

El perfil cromatográfico de todos los venenos bothrópicos de las diferentes localidades fue obtenido por medio de columnas de exclusión molecular en condiciones nativas. Para los venenos de *B. atrox* se empleó una columna Protein-PakTM 300 SW (300 X 78 mm, Waters), la cual presenta un límite de exclusión entre 10 y 400 kDa. Los venenos de *B. colombiensis* y *B. venezuelensis* fueron analizados

con la columna Superose H12-HR (10 × 300- 310 mm), Pharmacia Uppsala, Suecia), con límite de exclusión entre 1 y 300 kDa. Los resultados presentados en la Figura 10 muestran diferencias cualitativas y cuantitativas en los perfiles, aún entre venenos de la misma especie, según la localidad de origen.

En los venenos de *B. atrox* de las 4 localidades se pudo observar que los principales picos tenían los mismos tiempos de retención: 23,25; 25,75; 33,75 y 41,25 minutos, los cuales fueron clasificados de acuerdo a sus masas moleculares en: altos (H), intermedios (I), medios (M) y bajos (L). Los picos H y M mostraron la mayor concentración en el veneno de Serranía del Cuao. En los venenos de Parguasa y Puerto Ayacucho-1, el pico M fue predominante; adicionalmente, en ambos venenos se observó un pico que corresponde a componentes de muy bajo peso molecular (VL). El veneno de Puerto Ayacucho-2 presentó todos los picos, excepto L en concentraciones relativamente similares.

Los venenos de *B. venezuelensis* de las 3 localidades presentaron cuatro picos predominantes, con tiempos de retención de 23,55; 34,6; 40,4 y 46 min. En el veneno de Ávila se observó la mayor concentración de componentes de alta y baja masa molecular, adicionalmente en este veneno existen como mínimo 4 picos en los rangos de mediano peso molecular, es similar en los demás.

Los venenos de *B. colombiensis* de las localidades de Caucagua y El Guapo, ambos venenos mostraron tiempos de retención de 23,00; 31,28; 32,06; 34,14; 35,52 y 40,32 minutos y 23,07; 31,24; 32,06; 34,14; 35,50 y 40,27 minutos, respectivamente. La principal diferencia entre ambos perfiles, es la presencia de un pico adicional con un tiempo de retención de 25,08 minutos que solo se observa en el veneno de Caucagua.

1.2. ACTIVIDADES HEMORRÁGICA, COAGULANTE Y FIBRINOLÍTICA.

A los fines de encontrar el veneno bothrópico con la mayor actividad fibrinolítica que además presente poca o ausente actividad hemorrágica y

procoagulante, se evaluaron estas actividades en todos los venenos separados por especie y localidad. Los resultados se muestran en la Tabla 1.

En relación a la actividad hemorrágica, expresada como DMH, la menor actividad la tiene el veneno de *B. colombiensis* de Cauagua con 13,8 µg/ratón; mientras los venenos de *B. venezuelensis* de Baruta y La Boyera presentaron la mayor actividad, con una DMH de 1,15 y 1,36 µg/ratón, respectivamente.

La actividad procoagulante fue evaluada sobre plasma humano citratado o fibrinógeno humano purificado. La mayor actividad sobre plasma se encontró en el veneno de *B. venezuelensis*-Ávila (58,0 UI Thr/µg), seguido de *B. venezuelensis*-Baruta y *B. atrox* Puerto Ayacucho-2, con 36,0 y 35,2 UI Thr/µg respectivamente. Al emplear fibrinógeno humano purificado como sustrato, los más activos fueron los venenos de *B. venezuelensis* Ávila y *B. atrox* de Puerto Ayacucho-2, seguidos del *B. colombiensis* de El Guapo (40,0; 39,6 y 31,0 UI Thr/µg, respectivamente).

En relación a la actividad fibrinolítica, determinada sobre placas de fibrina en ausencia de plasminógeno y expresada como actividad específica (mm²/µg), se encontró que los venenos de *B. colombiensis* de Cauagua, *B. venezuelensis* de Baruta y *B. atrox* de Puerto Ayacucho-1, (30,60; 30,13 y 25,7 mm²/µg, respectivamente) eran los más activos.

Debe resaltarse que en los venenos de *B. atrox* de Parguasa y Puerto Ayacucho-2, en las placas de fibrina se observó dentro del área de lisis, un halo sin lisis (Figura 11).

Con base en los resultados, se escogió el veneno de *B. colombiensis* de Cauagua para proseguir el estudio, por presentar una elevada actividad fibrinolítica (30,6 mm²/µg), con una baja actividad hemorrágica (13,8 µg/ratón) y la menor actividad procoagulante, sobre ambos sustratos plasma y fibrinógeno purificado (11,0 y 14,0 UI Thr/µg, respectivamente).

2. CARACTERIZACIÓN DEL VENENO DE *B. colombiensis*.

2.1. FRACCIONAMIENTO SOBRE SEPHADEX G-100.

Los venenos de *B. colombiensis* de las localidades de El Guapo y Caucaagua fueron inicialmente fraccionados sobre una columna de Sephadex G-100. Bajo las condiciones cromatográficas empleadas, mostraron en ambos casos, cuatro fracciones designadas de acuerdo a sus tiempos de retención de 11h 59min 21seg; 18h 11min 24 seg; 24h 17min 55seg; 27h 43min 34seg como SI, SII, SIII y SIV, respectivamente (Figura 12). A estas fracciones se les evaluaron las actividades coagulante, fibrinolítica, hemorrágica y amidolítica, encontrando que dichas actividades se concentran en las fracciones SI y SII.

2.2. CARACTERIZACIÓN BIOLÓGICA DE LAS FRACCIONES FIBRINOLÍTICAS

2.2.1 ACTIVIDAD COAGULANTE

La actividad coagulante en los venenos crudos de *B. colombiensis* estudiados, evaluada por el método amidolítico (Tabla 2), demostró que en los venenos de las dos localidades, El Guapo y Caucaagua, está presente una actividad semejante a trombina (S-2238), de 568,0 y 502,0 mUA/min/mg, respectivamente; y semejante a factor Xa (S-2222) de 116,4 y 56,0 mUA/min/mg, respectivamente. El veneno de El Guapo fue más activo que Caucaagua.

Con respecto a las fracciones de estos venenos, obtenidas por cromatografía sobre Sephadex G-100, SI concentró la actividad coagulante. Por el método coagulante, el plasma resultó ser mejor sustrato que el fibrinógeno (120 vs 46 UI Th/mg, respectivamente). Por el método amidolítico, la actividad semejante a trombina (S-2238) fue mayor que la semejante a factor Xa (S-2222), 1168 vs 208 mUA/min/mg, respectivamente. Estos resultados también se muestran en la Tabla 2, donde además se observa que la fracción SI proveniente del veneno de El Guapo fue la más activa.

2.2.2 ACTIVIDAD FIBRINOLÍTICA.

En los venenos de *B. colombiensis* de ambas localidades y en las fracciones obtenidas por Sephadex G-100 se encontró una actividad fibrinolítica que se muestra en la Tabla 3. Por el método en placas de fibrina se observó que el veneno de Cauagua fue el más activo que El Guapo (29,0 vs 14,2 mm²/μg). En ambos venenos, esta actividad se inhibió totalmente en presencia de quelante de metales (EDTA) y parcialmente en presencia de inhibidores de serino proteasas.

Por el método amidolítico, en los venenos de ambas localidades (El Guapo y Cauagua), se observó una elevada actividad semejante a calicreína (S-2302), seguida de actividad semejante a t-PA (S-2288), siendo más activo el veneno de El Guapo ($p < 0,01$) (Tabla 3). Las actividades semejantes a plasmina (S-2251) y a uroquinasa (S-2444) fueron muy bajas en ambos venenos (Tabla 3).

En relación a las fracciones, la actividad fibrinolítica en placas de fibrina se concentró en las SII, la cual fue completamente inhibida en presencia de quelantes de metales. En contraste las actividades semejantes a calicreína y a t-PA, se ubicaron en las fracciones SI, siendo esta actividad parcialmente bloqueada en presencia de inhibidores de serino-proteasas. No se observaron diferencias significativas entre las fracciones de ambas localidades. Resultados no mostrados.

2.2.3 ACTIVIDAD HEMORRÁGICA.

La actividad hemorrágica en el veneno de *B. colombiensis* de El Guapo se encontró más elevada que la del veneno de Cauagua (5,32 vs 13,8 μg/ratón, respectivamente). Esta actividad hemorrágica se concentró en las fracciones SI, siendo más activas las del veneno El Guapo que las de Cauagua (1,9 vs 3,9 μg/ratón, respectivamente). Las fracciones SII fueron poco hemorrágicas (139,5 y 87,5 μg/ratón, para las de El Guapo y Cauagua, respectivamente) (Tabla 3).

2.2.4 UNION A BENZAMIDINE/SEPHAROSE™ 4 FAST FLOW.

La actividad fibrinolítica de nuestro interés se concentró en la fracción SII del cromatograma anterior. Para proseguir con el fraccionamiento, las fracciones SII de

ambos venenos (Caucagua y El Guapo) fueron cromatografiadas por separado sobre una columna de Benzamidina Sepharose™ 4 Fast Flow, la cual tiene la propiedad de unir enzimas tipo serina, por la propiedad que tiene la Benzamidina de actuar como inhibidor de las mismas. En la Figura 13 se observa el cromatograma obtenido de la fracción SII proveniente del veneno de la localidad Caucaagua, donde se aprecian dos fracciones, una que representa el material no retenido, denominada BI, y otra denominada B II donde se encuentran las proteasas que interactúan con la Benzamidina, denominada B II y eluída por cambios de pH, que representa las proteasas tipo serina.

La fracción BI representa el 84,5% del total de proteínas presentes en SII obtenida del veneno de *B. colombiensis* y la fracción B II el 15,5% restante. La actividad fibrinolítica está concentrada en la fracción BI, la cual fue completamente inhibida por quelante de metales (EDTA), sin ser afectada por inhibidores de serino proteasas. La actividad coagulante se concentra en la fracción BII, la cual fue abolida por inhibidores de serino proteasas.

2.2.5 ZIMOGRAMA DE FIBRINA.

La actividad fibrinolítica en los venenos de *B. colombiensis* y las fracciones de Sephadex G-100, también se evaluó por medio de zimografía de fibrina. En ambas localidades se observa actividad en las regiones con masas moleculares comprendidas entre 30 y 20 kDa. Las fracciones SII que presentaron la mayor actividad en placas de fibrina, en el zimograma mostraron bandas activas alrededor de 30 kDa. Como control positivo se incluyó la plasmina, donde se observaron 3 bandas activas con masas moleculares comprendidas entre 220-46 kDa Las otras fracciones no mostraron actividad. Datos no mostrados. Los marcadores de masa molecular empleados fueron preteñidos, indicándose con puntos la zona del zimograma donde se encuentran, los cuales sirven para establecer las masas moleculares aproximadas de los componentes activos (Figura 14).

2.2.6 ACTIVIDAD FIBRINOGENOLÍTICA.

El fraccionamiento de SII (fracción con mayor actividad fibrinolítica) sobre una columna de afinidad de Benzamidina/Sepharose™ 4 Fast Flow, produjo una fracción

que no se enlazó a la columna, denominada BI, con una actividad fibrinolítica sobre placas de fibrina de $6,6 \text{ mm}^2 / \mu\text{g}$, que fue neutralizada por quelante de metales, con escasa actividad hemorrágica (16 mm^2) y que no presentó actividad coagulante,

La actividad fibrinogenolítica de esta fracción BI se evidenció mediante electroforesis en presencia de SDS, en geles al 10%. En el fibrinógeno (Fg) control se muestran las tres cadenas $\text{A}\alpha$, $\text{B}\beta$ y γ que lo constituyen (Figura 15). A una relación 100:0,1 (Fg: fracción), a los 30 seg se observa degradación de las cadenas $\text{A}\alpha$, las cuales desaparecen completamente a los 5 min. En contraste las cadenas $\text{B}\beta$ se degradan entre 30 y 240 minutos. Las cadenas γ permanecen inalterables al tiempo y relación, evaluados. Esta actividad fibrinogenolítica fue completamente bloqueada por inhibidores de metaloproteasas, sin ser afectada por inhibidores de serino proteasas (Datos no mostrados).

3. AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE FIBRINOGENASAS.

A objeto de aislar fracción(es) con actividad fibrinolítica presentes en venenos bothrópicos venezolanos, inicialmente se evaluaron venenos de las especies *B. atrox*, *B. colombiensis* y *B. venezuelensis*, de diferentes localidades. Los resultados presentados en la sección 1, evidenciaron que esta actividad es más intensa en los venenos de *B. colombiensis*, siendo el de la localidad de Cauagua el más activo. Adicionalmente este veneno presentó la menor actividad hemorrágica y procoagulante. El fraccionamiento semipreparativo de este veneno por cromatografía de exclusión molecular sobre Sephadex G-100 y cromatografía de afinidad sobre Benzamidine /Sephacrose™ 4 Fast Flow, permitió encontrar una fracción con alta actividad fibrinolítica asociada a enzimas tipo metaloproteasa y que digiere preferencialmente las cadenas $\text{A}\alpha$ del fibrinógeno.

Para obtener el compuesto(s) activo, se fraccionó de manera preparativa el veneno más activo, el de la serpiente *B. colombiensis* de Cauagua, empleando cromatografía de intercambio catiónico sobre una columna Mono S HR 10/10, seguida de cromatografía de interacción hidrofóbica sobre una columna de Phenyl-

Sepharose y finalmente cromatografía de exclusión molecular sobre las columnas Superose 12 10/300GL o Bio-Silect 125-5. Para evaluar el criterio de pureza se utilizó una cromatografía líquida de alta resolución empleando una columna de fase reversa Simmetry® C-18. La actividad fibrinolítica presente en las fracciones fue evaluada por el método de placas de fibrina.

3.1 AISLAMIENTO DE LA FIBRINOGENASAS

Primer paso de purificación

El fraccionamiento del veneno de *B. colombiensis* de Caucagua sobre la columna de intercambio catiónico (Mono S HR 10/10) mostró 16 picos. La actividad fibrinolítica se encontró en los picos **3** (tubos 17-20), **6** (tubos 45-48) y **7** (tubos 50-53). En cada caso, el material fue agrupado en fracciones denominadas **F1, F2 y F3**, respectivamente (Figura 16), las cuales mostraron una actividad fibrinolítica de 9,52; 70,2 y 64,4 mm²/μg, respectivamente y hemorrágica con 50 μg de fracción de 28; 18 y 229 mm², respectivamente (Tabla 4).

El perfil electroforético en presencia de SDS sobre un gel en gradiente (4-12%), en condiciones reducidas y coloreados con azul de Coomassie, de las fracciones F1, F2 y F3 obtenidas de la cromatografía de intercambio catiónico, se muestra en la Figura 17. En cada fracción se observó una sola banda de masa molecular de aproximadamente 25 kDa. Con tinción con nitrato de plata, se observaron bandas adicionales de masas entre 14 y 6 kDa (datos no mostrados). Estos resultados indujeron a continuar con el fraccionamiento, para tratar de aislar las metaloproteasas activas con el mayor grado de pureza.

Segundo paso de purificación.

Para proseguir con el esquema de purificación, se escogió la fracción F2 de la cromatografía de intercambio catiónico, por presentar la mayor actividad fibrinolítica (70,2 mm²/μg) y la menor actividad hemorrágica (18 mm²/50μg de fracción). El fraccionamiento de F2 sobre la columna de Phenyl Sepharose CL-4B (FS) mostró 3 fracciones, las dos últimas presentaron la actividad fibrinolítica y fueron denominadas

F2-A (tubos 29-50) y **F2-B** (tubos 68-70) (Figura 18). Estas fracciones presentaron una actividad fibrinolítica de 48,06 y 131,25 mm²/μg, respectivamente; sin actividad hemorrágica, hasta 50 μg de proteínas evaluadas. Se realizaron tantas corridas de F2, como fueron necesarias para obtener suficiente material que permitiera continuar con la purificación.

Tercer paso de purificación.

Las fracciones con actividad fibrinolítica provenientes de la cromatografía de interacción hidrofóbica, F2-A y F2-B, al ser sometidas a fraccionamiento por exclusión molecular sobre columnas Superosa 12 10/300GL y Bio-Silect SEC 125-5 (Bio-Rad) respectivamente, produjeron los cromatogramas de las Figuras 19 y 20. El cromatograma obtenido en ambos casos muestra una sola fracción que se denominó Colombienasa-1 (tubos 59-67) y Colombienasa-2 (tubos 39-45), ambas con una actividad fibrinolítica de 94,16 y 211,57 mm²/μg, respectivamente. Ninguna presentó actividad hemorrágica.

El esquema de purificación de las Colombienasas 1 y 2, provenientes del veneno de *B. colombiensis* de la localidad de Caucagua y que presentan actividad fibrinolítica, se resume en la Tabla 5.

3.2. CARACTERIZACIÓN DE LAS COLOMBIENASAS

a) BIOQUÍMICA

- **ELECTROFORESIS EN GELES DE POLIACRILAMIDA.**

La Colombienasa-1 y Colombienasa-2, sobre SDS-PAGE en geles al 15%, en condiciones reducidas, presentaron una sola banda homogénea, con una masa molecular aproximada a 25 kDa (Figura 21).

- **PUREZA.**

La pureza de las Colombienasas se evaluó por medio de cromatografía de fase reversa sobre una columna de Simmetry® C-18, empleando un sistema de cromatografía líquida de alta resolución (CLAR). Ambas proteasas, Colombienasa-1

y Colombienasa-2, mostraron un solo pico con tiempos de retención de 47,254 y 7,122 min, respectivamente (Figura 22).

- *ESPECTROMETRIA DE MASA.*

Las masas moleculares, obtenidas por análisis de espectrometría de masas (Matrix-Assisted Laser-Desorption Ionization Time of Flight-MALDI- TOF-TOF), fueron de 23.074,31 Da para la Colombienasa-1 y de 23.078,80 Da para la Colombienasa 2 (Figura 23).

- *PUNTO ISOELÉCTRICO.*

Según los patrones de enfoque isoelectrico las Colombienasas presentan un pI de 6,0 la Colombienasa-1 y de 6,2 la Colombienasa-2.

- *SECUENCIA N-TERMINAL.*

La secuenciación por el extremo N-terminal de las Colombienasas se realizó empleando el método clásico de Edman y reveló fragmentos con las secuencias que se muestran en la Tabla 6.

La búsqueda de las secuencias en la base de datos (170) produjo los resultados que se resumen en la Tabla 7.

De los fragmentos secuenciados, el HLELVVVADHGMFK común a ambas Colombienasas, resultó el de mayor homología con los comparados en la base de datos (92-100% de identidad). Estos porcentajes de identidad en las secuencias analizadas corresponden a metaloproteasas dependientes de Zinc, lo cual refuerza lo reportado en la caracterización bioquímica de las Colombienasas.

b) *BIOLÓGICA*

- *ACTIVIDAD HEMORRÁGICA.*

La actividad hemorrágica del veneno crudo de *B. colombiensis* de Cauca y de las fracciones activas se muestra en la Tabla 8. El veneno crudo presentó una DHM de 13,8 µg/ratón; la fracción F2 proveniente de cromatografía de intercambio catiónico presentó una área hemorrágica muy baja con la máxima dosis evaluada,

4,7 mm² /50 µg. Las Colombienasas 1 y 2 no presentaron actividad hemorrágica con la máxima dosis (50 µg) evaluada.

- *ACTIVIDAD FIBRINOLÍTICA.*

Las Colombienasas en placas de fibrina en presencia y ausencia de plasminógeno, mostraron áreas de lisis muy similares. Estos resultados se resumen en la Tabla 9.

A objeto de determinar si la actividad fibrinolítica de las Colombienasas está asociada a activación del plasminógeno o a la acción directa de sobre la fibrina, se evaluó la capacidad de estas fracciones de activar plasminógeno. Como control positivo se activó plasminógeno purificado con estreptoquinasa y la plasmina generada se determinó por medio de un substrato cromogénico, el S-2251. Se realizó una curva de calibración usando una cantidad fija de plasminógeno (10 µg) y cantidades variables de estreptoquinasa (100, 10, 1 y 0,1 UI de SK), encontrándose bajo las condiciones del ensayo, linealidad entre 1-0,1 UI, que son los datos mostrados en la tabla

En el caso de las Colombienasas (2 µg), los resultados evidenciaron una escasa activación del plasminógeno (10 µg) luego de 30 minutos de reacción (Tabla 10).

La actividad fibrinolítica presente en las Colombienasas también fue evaluada siguiendo el patrón de degradación de la fibrina entrecruzada (XLX), empleando la plasmina como control positivo. Los resultados se muestran en la Figura 24, donde se observa que la plasmina, el veneno y sus fracciones, presentan patrones diferentes de degradación.

Al tiempo 0 de incubación, en todos los casos se presenta la misma apariencia que el control de fibrina XLX, conformado por polímeros de α (α - α) y heterodímeros

de α - γ que se ubican entre 200 y 400 kDa, los dímeros de γ (γ - γ) que se ubican por los 66,2 y 97,4 kDa y las cadenas B β que permanecen en los 54 kDa.

La fibrina tratada con la plasmina, a los 30 minutos muestra una degradación completa de los polímeros de α , y hetero-polímeros, así como degradación parcial de los dímeros de γ y de las cadenas B β , con aparición de productos de degradación menores a 45 kDa, y predominio de fragmentos de peso molecular bajos, menores a 14,4 kDa. A los tiempos sucesivos (90 min, 3 y 24 h), se observa una degradación completa de los dímeros de γ y de las cadenas B β , con fragmentos entre 31, 45 kDa y 6,5 kDa.

La fibrina tratada con el veneno crudo y las Colombienasas presentan patrones de degradación semejantes. A los 30 minutos se observa una degradación parcial de los heteropolímeros de alto peso molecular y de los polímeros de α , observándose los dímeros de γ y las cadenas B β , sin modificaciones significativas. A las 4 h, en todos los casos aparecen fragmentos entre 31 y 45 kDa, observados también en el caso de la plasmina. Adicionalmente aparecen fragmentos de pesos moleculares intermedios entre 21 y 31 kDa, ausentes en el tratamiento con plasmina. Finalmente a las 24 h se observa la degradación de las cadenas B β , con fragmentos de pesos moleculares intermedios y se intensifica una banda con peso molecular alrededor de 14 kDa.

- *ACTIVIDAD FIBRINOGENOLÍTICA.*

El efecto del de las Colombienasas sobre las cadenas del fibrinógeno fue evaluado por electroforesis empleando el sistema Tris/Tricina bajo condiciones reducidas. Las Colombienasas, a la relación 100:0,1 inducen una rápida degradación de las cadenas A α del fibrinógeno (30 seg) que fue completa a los 15 minutos en el caso de la Colombienasa-1 y a los 30 minutos para la Colombienasa-2. A esta misma relación, las cadena B β y γ , muestran un ligero aumento de la movilidad electroforética después de los 30 min, sin evidente la degradación de las mismas (Figura 25).

A las relaciones 100:0,5; 100:1 y 100:5 de Fg: enzima, la Colombienasa-1, indujo una degradación de las cadenas A α a los 5 minutos y B β a los 60 minutos, permaneciendo sin modificarse las cadenas γ (Figura 26). En contraste, la Colombienasa- 2, a la relación 100:1, induce una completa degradación de las cadenas A α y B β a los 5 minutos. A partir de los 30 minutos se inicia la degradación de la cadena γ , completándose a los 120 minutos (Figura 27).

La actividad coagulante remanente del Fibrinógeno muestra la alteración de la funcionalidad de la molécula. El fibrinógeno control (100 μ L) incubado por 4h a 37 °C, al ser mezclado con trombina (100 μ L - 2,5 UI/mL en CaCl₂ 0,025 M), coaguló en 24 seg. En contraste, el fibrinógeno tratado con el veneno crudo o las fracciones, a la relación 100:1, durante 4 h, al agregar la trombina, se observó la formación de finos hilos de fibrina, a los 30 seg en el caso del veneno crudo, a los 55 y 65 seg para las Colombienasa-1 y Colombienasa-2, respectivamente, sin la formación de un coágulo estable en ninguno de los casos, aún después de 2 horas de incubación.

- *ESTABILIDAD DE LA ACTIVIDAD FIBRINO(GENO)LÍTICA.*

- o *EFEECTO DE INHIBIDORES DE PROTEASAS*

Los resultados de la actividad fibrinolítica del veneno de *B. colombiensis* y de las fracciones en presencia de inhibidores de proteasas se muestran en la Tabla 11. El área de lisis fue muy reducida y superficial en presencia de inhibidores de metaloproteasas (IMP); en presencia de los inhibidores de serino proteasas (ISP) hubo una lisis bien definida, aunque menor que las muestras tratadas con tampón en ausencia de inhibidores.

La actividad fibrinogenolítica de las Colombienasas, evaluada en presencia de los inhibidores se muestra en la Figura 28. Estos resultados muestran una completamente inhibición de la actividad en presencia de los inhibidores de metaloproteasas (EDTA, EGTA ó 1,10 fenantrolina); en contraste los inhibidores de serino-proteasas, no mostraron efecto sobre esta actividad.

- o *EFEECTO DE IONES METÁLICOS.*

A objeto de evaluar qué ion metálico está relacionado con la actividad fibrino(geno) lítica se emplearon iones divalentes (Ca^{+2} , Mg^{+2} , Zn^{+2} , Co^{+2}), así como Na^{+} y K^{+} bajo la forma de cloruros, a fin de establecer cuál era capaz de revertir el efecto de los inhibidores de quelantes de metales. El comportamiento observado fue igual para ambas fracciones. A las concentraciones ensayadas, solamente las sales de zinc mostraron la capacidad de revertir la acción del inhibidor de metaloproteasa (EDTA) y restablecer la actividad proteolítica de las Colombienasas sobre el fibrinógeno. Este resultado se observa en la Figura 29.

o EFECTO DE LA TEMPERATURA.

Para evaluar la estabilidad térmica de la actividad fibrinogenolítica presente en las Colombienasas y el veneno total, se pre-incubaron estos a diferentes temperaturas (4, 25, 37 y 56 °C) por 30 minutos y 2 horas, luego se evaluó la actividad residual. En la Figura 30 se observa que la temperatura óptima de la actividad fibrinogenolítica es de 25°C. A esta temperatura, a una relación 100:0,5 para la Colombienasa-1 y 100:1 para la Colombienasa-2, durante 30 minutos y 2 horas de incubación, se observa degradación de las cadenas A α y B β , con formación de productos de degradación del fibrinógeno con masas moleculares entre 45,0 y 17,0 kDa, así como entre 16,0 y 7,0 kDa.

A las temperaturas de 4 y 37 ° C se observa degradación de ambas cadenas pero con formación de productos de mayores masas moleculares, entre 45,0 y 17,0 kDa. A 56 ° C se evidencia una pérdida total de la actividad.

o EFECTO DEL PH.

Para evaluar la estabilidad de la actividad fibrinogenolítica frente a los cambios de pH, el veneno de *B. colombiensis* y las Colombienasas se pre-incubaron a diferentes pH (3-10), durante 2 horas, luego se evaluó la actividad residual. A la relación Fg: veneno de 100:1, 30 minutos de incubación a 25 °C, la mayor actividad se observa a pHs entre 7 y 9, donde ocurre una degradación de las cadenas A α y B β . En el rango de pHs entre 3 y 6 y a pH 10 no se observa degradación de dichas cadenas. El patrón de degradación fue similar para el veneno crudo y para ambas

Colombienasas. La Figura 31 muestra la actividad fibrinogenolítica para la Colombienasa-2, bajo las condiciones experimentales expuestas.

- *ACCIÓN DE LAS COLOMBIENASAS SOBRE PROTEÍNAS DE MATRIZ EXTRACELULAR Y MEMBRANAS BASALES.*

Una de las consecuencias más comunes del envenenamiento bothrópico lo constituye el sangrado local y sistémico. El sangrado local se atribuye principalmente a metaloproteasas dependientes de zinc, cuyo mecanismo de acción no está completamente dilucidado, sin embargo se ha demostrado que hidrolizan proteínas de membranas basales y de matriz extracelular que rodean las células endoteliales y los capilares sanguíneos. Estas proteínas incluyen laminina, fibronectina, entactina, colágeno tipo IV, entre otras. Su degradación juega un papel central en la patogénesis de la hemorragia (43,52).

Por lo antes expuesto, se evaluó la actividad proteolítica de las Colombienasas sobre estas proteínas de matriz extracelular y de membranas basales a objeto de establecer su participación en la hemorragia local, característica del veneno de *B. colombiensis*.

- o *COLÁGENO TIPO IV.*

Bajo las condiciones experimentales empleadas no se observó ningún efecto del veneno crudo ni de las Colombienasas sobre el colágeno tipo IV de membranas basales de placenta humana. En la Figura 32 puede observarse como el colágeno control sin pre-incubar, llamado colágeno fresco, tiene la misma apariencia que las muestras incubadas en presencia o no de la Colombienasa-1. El veneno crudo y la Colombienasa-2 presentaron un patrón similar (resultados no mostrados).

- o *FIBRONECTINA:*

La fibronectina empleada en los ensayos fue purificada en el laboratorio a partir de plasma humano. Se presenta como una banda de aproximadamente 210 kDa. La Colombienasa-1 degrada la fibronectina humana (Fn), generando un patrón de degradación que se observa en la Figura 33. A la relación 100:2 (Fn: enzima), y

37°C, a las 2 horas han desaparecido las bandas de alto peso molecular, se observan productos de muy diversos pesos moleculares: altos (148 y 98 kDa), medios (65,0 kDa). A diferencia de la proteína incubada en ausencia de la enzima, aparece muy intensa una banda alrededor de los 98 kDa. A las 24 horas de incubación se intensifica la banda correspondiente a los productos de pesos moleculares menores a 98kDa y bandas de menor intensidad en la zona de pesos bajos, 36 kDa.

La Colombienasa-2 degrada la fibronectina humana con un el patrón de degradación que se presenta en la Figura 34. A la relación 100:2 (Fn: enzima), y 37°C, a las 2 horas se observan productos de diferentes masas moleculares predominando las altas (148 - 98 kDa). El patrón de digestión de las 24 horas de incubación incluye productos de masas moleculares altas, medias y bajas, intensificándose bandas correspondientes a productos de masas menores (< 36 kDa).

o LAMININA

Las Colombienasas, bajo las condiciones experimentales empleadas, a la relación 100:2 y 37 °C, no indujeron cambios en la migración electroforética de las cadenas que conforma la laminina en condiciones reducidas, después de 2 ó 24 horas de incubación (Figura 35).

- *ACTIVIDAD GELATINOLÍTICA.*

Evaluar la actividad gelatinolítica es relevante pues se ha asociado con la actividad hemorrágica de las metaloproteasas de venenos de serpientes (174) y por consiguiente puede estar relacionado con la degradación *in vivo* de la matriz extracelular. La actividad gelatinolítica se evaluó por medio de zimografía en un gel de poliacrilamida co-polimerizado con gelatina, la cual evidenció actividad proteolítica sobre la gelatina por parte del veneno crudo, demostrada a través de bandas de lisis en la zona de pesos moleculares comprendidos entre 148-98 kDa, así como en la zona cercana a los 22 kDa. La Colombienasa-2 también mostró actividad gelatinolítica en esa región cercana a 22 kDa, en contraste, la Colombienasa-1 no mostró actividad gelatinolítica (Figura 36).

- *ACTIVIDAD AMIDOLÍTICA DE LAS COLOMBIENASAS.*

Para corroborar los resultados obtenidos de la actividad fibrino(geno)lítica en presencia de inhibidores y las conclusiones obtenidas de las bases de datos con las que se relacionó la secuencia N-terminal de las Colombienasas, se evaluó la presencia de enzimas tipo serina relacionadas con la hemostasia, por medio de la actividad amidolítica. Los resultados demuestran que estas enzimas, a diferencia del veneno crudo, carecen de actividad amidolítica sobre los sustratos cromogénicos empleados para determinar actividades similares a trombina, factor Xa, calicreína, plasmina, uroquinasa y t-PA, lo cual indica que la actividad proteolítica mostrada en los resultados anteriores, sobre fibrinógeno, fibrina, y proteínas de matriz, no está relacionada con enzimas tipo serina.

- *ACCIÓN DE LAS COLOMBIENASAS SOBRE AGREGACIÓN PLAQUETARIA.*

Se realizan ensayos de agregación plaquetaria en presencia de las Colombienasas a fin de evaluar su posible participación en las alteraciones de la hemostasia características del cuadro clínico en el envenenamiento bothrópico. Los resultados de las pruebas de agregación plaquetaria muestran que las Colombienasa-1 y Colombienasa-2 no tienen efecto sobre la agregación plaquetaria inducida por colágeno ó ADP (Tabla 12).

- *ACTIVIDAD PROCOAGULANTE DE LAS COLOMBIENASAS*

Para evaluar la actividad coagulante de las Colombienasas, se usó como sustrato plasma humano citratado y fibrinógeno bovino purificado. Como referencia se empleó una curva estándar realizada con trombina bovina. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 13, donde se observa que el veneno crudo presenta una actividad coagulante semejante a trombina, sobre plasma de 11 UI/mg y sobre fibrinógeno de 14 UI/mg, Las Colombienasas no presentaron actividad coagulante sobre plasma o fibrinógeno purificado,

- *ACTIVIDAD EDEMATIZANTE DE LAS COLOMBIENASAS.*

A fin de determinar la posible participación del las Colombiensasas en el edema característico del accidente por mordedura de *B. colombiensis*, se evaluó la actividad edematizante de las mismas.

La dosis edematizante mínima (DME) del veneno total, es definida como la cantidad mínima de veneno que es capaz de producir un edema en el área plantar de la extremidad posterior del ratón de 30%. Con base en la DEM del veneno crudo de *B.colombiensis* de 3 µg / ratón, determinada en el Laboratorio de Investigaciones de la Facultad de Farmacia de la UCV, proporcionada por el Dr. H Scannone, se realizaron los ensayos con las fracciones Colombiensasas-1 y Colombiensasas-2, empleando 3,9 µg/ ratón para la Colombiensasas-1 y 3,8 µg/ ratón para la Colombiensasas-2 resultando ser muy discreto el edema producido por ambas fracciones, 12,66% de edema determinado para la Colombiensasas-1 y 8,45% para la Colombiensasas-2, empleando n=4 en ambos casos.

- *ACTIVIDAD HEMOLÍTICA INDIRECTA DE LAS COLOMBIENASAS. CON LAS FRACCIONES COLOMBIENASA-1 Y 2, EMPLEANDO 50 MG/ 20 ML POR POZO, NO SE OBSERVARON HALOS DE HEMÓLISIS, LO CUAL INDICA QUE ESTAS FRACCIONES NO TIENEN ACTIVIDAD TIPO FOSFOLIPASA A2.*

Como controles positivos se emplearon 50 µg/ 20 µL por pozo de veneno crudo de *B. colombiensis* que produjo un halo de hemólisis de 176,71 mm² y de *Crotalus durissus cumanensis*, con un halo de hemólisis de 192 mm².

- *RECONOCIMIENTO DE LAS COLOMBIENASAS POR SUERO ANTIOFÍDICO POLIVALENTE FACULTAD DE FARMACIA-UCV (SAOP).*

Al examinar la inmunodifusión doble, se encontró que la Colombiensasas-2 no reaccionó con SAOP en ninguna de las diluciones empleadas. En contraste, se observó una banda continua de precipitación en los 3 pozos correspondientes a la Colombiensasas-1 enfrentada al SAOP, destacando una banda de precipitación en la zona de equivalencia en el pozo correspondiente a 8,5 µg de enzima (Figura 37).

4. EFECTO TOXICO DE LAS COLOMBIENASAS SOBRE CULTIVO EN MONOCAPAS DE MIOBLASTOS CARDIACOS.

El cultivo de mioblastos al ser tratado con el veneno crudo de *B. colombiensis* o las Colombienasas mostró diversos cambios. En cuanto a la monocapa se observó la pérdida de adhesión celular al sustrato, aparición de áreas discontinuas en la monocapa, así como células redondeadas en suspensión, en contraste con la monocapa control cuyas células permanecieron adheridas al sustrato, manteniéndose la continuidad de la monocapa.

La respuesta celular ante la exposición aguda al veneno es de tipo cuantál, o del todo o nada, siendo la muerte celular la máxima expresión de daño. El efecto de distintas concentraciones del veneno crudo sobre grupos celulares de mioblastos cardíacos, en cultivo primario de gota pendiente, se evaluó determinando la proporción en términos de porcentaje de células con forma redondeada asociada a muerte celular.

Desde el punto de vista morfológico los mioblastos que recibieron el tratamiento agudo con veneno crudo mostraron alteraciones morfológicas a nivel de citoplasmas y núcleos, reducción de su volumen citoplasmático. Las células aparecieron colapsadas y redondeadas, despegándose fácilmente del sustrato, perdiendo contacto con las células vecinas. Pudo observarse una secuencia temporal de cambios morfológicos que culminaron en una notable condensación del núcleo y el citoplasma. Los cambios estructurales internos más sobresalientes ocurren en el núcleo. El nucléolo se disocia, mostrando condensación y fragmentación de la cromatina (Figura 38). La muerte celular se definió como aquellos mioblastos que después de una hora de tratamiento perdieron su forma estrellada característica, adquiriendo forma redondeada, con alteración de la membrana celular y compactación del citoplasma.

El ensayo de toxicidad aguda permitió determinar la Concentración Letal Cincuenta (CL₅₀), la cual representa la cantidad de veneno que al ser puesta en contacto directo con los mioblastos en cultivo induce la muerte celular del 50% de la

población, en 1 hora de exposición y a 37°C. Para el cálculo de la CL₅₀ la característica morfológica seleccionada fue la apariencia de células colapsadas, redondeadas. Con base en la curva concentración-respuesta, la CL₅₀ calculada fue 40,38 µg/mL, con un rango subletal de 37,67 µg/mL y supra letal de 43,11 µg/mL (Figura 39).

- *TOXICIDAD AGUDA CON VENENO CRUDO Y FRACCIONES CROMATOGRÁFICAS.*

Los ensayos de citotoxicidad en cultivo de mioblastos fueron realizados con veneno crudo de *B.colombiensis*, las fracciones provenientes de la cromatografía de intercambio catiónico, F2 que es fibrinolítica no hemorrágica y F3, fibrinolítica-hemorrágica, así como con las Colomبيينasas provenientes de F2, y que concentran la actividad fibrinolítica no hemorrágica.

Se realizó la comparación entre las fracciones F2 y F3, en principio por tratarse de fracciones sin o con actividad hemorrágica respectivamente, siendo ambas altamente fibrinolíticas.

Los cultivos tratados con la fracción F2 y F3, al evaluarlos bajo microscopio de luz, mostraron una respuesta diferencial. Los tratados con F2 presentan una apariencia similar al control, donde las fibras musculares mantienen su organización característica (Figura 40 b). Los cultivos tratados con F3 muestran un incremento de los espacios intercelulares, pierden contacto con las células vecinas, con una evidente desorganización de las fibras (Figura 40 c y c').

La digitalización de las imágenes de las monocapas control y sometidas a la acción de las fracciones F2 y F3 permitió la elaboración de histograma en escala de grises (Figura 40 g), donde es posible apreciar que la curvas de monocapa control y monocapa expuesta a acción de F2 son muy similares, casi se sobreponen, mientras la curva correspondiente a la monocapa expuesta a la acción de F3 presenta valores muy inferiores, lo cual se traduce en un paso casi completo del haz de luz a través de los espacios intercelulares, congruente con la pérdida de la organización fibrilar, desprendimiento de las células del sustrato y la separación intercelular antes mencionada.

Los cambios inducidos por el veneno de *Bothrops colombiensis*, se evaluaron por microscopia de luz, así como por medio de sondas fluorescentes, específicamente por medio del fluorocromo catiónico lipofílico, tipo DiOC₁ (3), el cual permite estudiar el daño a nivel subcelular. La Figura 41 muestra los resultados obtenidos con los controles y el veneno crudo por ambos criterios morfológicos: microscopía de contraste de fase y con las Colombienasa-1 y Colombienasa-2 por medio de la sonda fluorescente. En el caso del veneno crudo se observó, una pérdida de la homogeneidad, confluencia y extensión del halo de crecimiento en la monocapa de mioblastos cardiacos en contacto directo con el veneno crudo (41 B-B'-B''), una disrupción de la monocapa, asociada con la aparición de mayores espacios intercelulares. Los mioblastos cardiacos cambian su forma estrellada de amplio citoplasma, claros núcleos y nucléolos (Figura 41A'), a células de formas redondeadas, con estrecho citoplasma, finas extensiones citoplasmáticas, núcleos y nucléolos difusos (Figura 41 B').

Los resultados obtenidos con el veneno crudo y visualizados por medio del DiOC₁ (3) (Figura 41 B''), muestran una estructura celular colapsada, con intensa fluorescencia difusa, estructuras mitocondriales y área perinuclear sin definición alguna. En contraste, la población de mioblastos cardiacos controles, así como las tratadas con las Colombienasa-1 y Colombienasa-2, visualizadas por esta técnica (Figuras 41 A''-C-D), mostró un intenso brillo de fluorescencia emitida en verde, resaltando la estructura convencional de las mitocondrias con forma de bastones alargados por todo el citoplasma y en el área peri-nuclear.

VI. DISCUSIÓN

1. CARACTERIZACIÓN DE VENENOS BOTHRÓPICOS DE DIFERENTES ESPECIES Y LOCALIDADES.

Se ha descrito que pacientes envenenados por serpientes de la misma especie y zona geográfica, presentan diferencias en las manifestaciones clínicas, las cuales

son atribuidas a diferencias individuales en la composición de los venenos (4). Los venenos de serpientes representan la sumatoria de múltiples factores que conducen a un eficiente producto biológico cuyo principal propósito es la inmovilización, muerte e inicio de la digestión de la presa. Contienen una mezcla de proteínas con muchas actividades biológicas. Estas diversas actividades causan alteraciones fisiopatológicas que según el género y especie de la serpiente causante del accidente ofídico, pueden incluir desórdenes hemostáticos sistémicos relacionados con alteraciones a nivel de los sistemas de la coagulación, fibrinolítico, así como de las funciones plaquetarias. Además, cuadros de hipotensión, insuficiencia renal y choque (17, 65, 137,175).

Las serpientes del género *Bothrops* habitan en una extensa región de América que abarca desde México hasta Argentina, siendo responsables de la mayor tasa de morbilidad humana que cualquier otro grupo de serpientes venenosas (176).

En Sur América, *B. atrox*, *B. colombiensis* y *B. jararaca* son las de mayor interés médico. En Brasil y Venezuela las especies de *Bothrops* son las responsables de más del 80% de todos los accidentes ofídicos registrados (4).

El conocimiento de la composición proteica de los venenos de serpientes nos proporcionará bases para estudios futuros de relaciones estructura-función de toxinas individuales con miras al desarrollo de nuevos protocolos para la terapia antiofídica. Las diferencias en la composición de los venenos implican que la mezcla de inmunización para producir el antisuero debe ser representativa de la especie, lo que en la práctica supone realizar un muestreo de venenos de diferentes individuos, de diferentes edades, de ambos sexos y distintas procedencias.

Nuestros resultados representan la primera caracterización detallada de las variaciones inter e intra específicas de los perfiles proteicos y parámetros hemostáticos de poblaciones de serpientes del género *Bothrops* provenientes de diversas localidades geográficas a lo largo y ancho del país. Estos hallazgos permiten profundizar en la comprensión de la biología de las serpientes de este género, así como de la patología inducida por su veneno.

Numerosos trabajos han demostrado que existe variación en la composición de los venenos de serpientes de manera inter e intra específica. La variabilidad de

los venenos se asocia con distintos factores tales como criterios taxonómicos (diferencias a nivel intra e inter específico, así como entre géneros y familias), procesos evolutivos (aislamiento geográfico y especiación) y diferencias asociadas a la edad (177). Las diferencias intra específicas tienen lugar entre individuos, debido a variaciones estacionales, dieta, hábitat, edad y dimorfismo sexual (177,178).

Existen numerosos reportes de esta variabilidad intra-específica. Se ha demostrado que los desórdenes de la coagulación son frecuentemente registrados en pacientes con envenenamiento provocado principalmente por ejemplares juveniles de *Bothrops jararaca* (179) ó de *Bothrops áspér* (180). Kamiguti y col., 1986, sugieren que en tales accidentes la generación de trombina podría conducir a una coagulación intravascular diseminada (CID), debido a los componentes procoagulantes o a la actividad trombino-similar encontrada estos venenos. Estos autores también reportaron que *in vitro* los venenos obtenidos de ejemplares juveniles de *B. jararaca* presentaron niveles más altos de activadores de la protrombina y de factor X que la de ejemplares adultos (175).

Ejemplares de *B. jararaca* nacidos y mantenidos bajo condiciones de cautiverio estrictamente controladas, separados por sexo, presentaron diferencias individuales en sus actividades coagulante y fibrinolítica (181,182). La caracterización proteómica comparativa de venenos de *B. áspér* de distintas localidades geográficas, así como de edades diferentes, mostró prominentes diferencias entre sus proteomas (183). También con venenos de *Crotalus* se han demostrado diferencias individuales en la composición y actividades biológicas de venenos de este género (184).

Nuestras observaciones también mostraron que los venenos de serpientes del genero *Bothrops* de distintas especies presentaron variación en la presencia o ausencia y en las cantidades relativas de las proteínas como se evidenció a través de perfiles electroforéticos y cromatográficos.

Los perfiles proteicos analizados por SDS-PAGE de los venenos obtenidos de las 3 especies de *Bothrops* estudiadas (*atrox*, *venezuelensis* y *colombiensis*) muestran diferencias en la composición lo que se evidencia por el número e intensidad de bandas. En los venenos de *B. atrox* predominan componentes entre 45

y 21 kDa, excepto el de la localidad de Serranía del Cuao donde se encuentra una gran diversidad de bandas en todos los rangos de peso molecular. Esta diferencia podría estar relacionada con las características geográficas de esa localidad particular. Es probable que por la topografía de la misma haya algunas diferencias en las poblaciones de presas de la zona y eso haya representado presiones selectivas para los individuos locales, enriqueciéndose la composición del veneno, relacionando la gran diversidad de bandas con mayor número de actividades; en *B. venezuelensis* se observan bandas comunes entre las tres localidades alrededor de 31 kDa y entre 14 y 21 kDa y en *B. colombiensis* entre 50, 30 y 21 kDa.

Resultados similares son mostrados en estudio de variabilidad inter específica realizado con venenos de serpientes brasileras del género *Bothrops*. El estudio incluyó *Bothrops alternatus*, *B. atrox*, *B. bilineatus*, *B. brazili*, *B. castelnaudi*, *B. cotiara*, *B. erythromelas*, *B. fonsecai*, *B. hyoprurus*, *B. insularis*, *B. itapetiningae*, *B. jararaca*, *B. jararacussu*, *B. leucurus*, *B. marajoensis*, *B. moojeni*, *B. neuwiedi*, *B. pirajai*, y *B. pradoi*. Demostraron que las 19 especies en estudio diferían en composición, número e intensidad de las bandas. Sin embargo la mayoría de los venenos contenían componentes con masas moleculares entre 64 y 25 kDa y de aproximadamente 14 kDa. Los venenos de *B. castelnaudi* y *B. neuwiedi* fueron la excepción pues carecían de bandas de 25 kDa y 60 kDa respectivamente (185). Furtado, 2005, al comparar venenos de *B. jararaca* y *B. alcatraz* mostró perfiles electroforéticos muy similares, sin embargo, *B. alcatraz* mostró tres bandas proteicas de masas moleculares de 97, 80 y 38 kDa, que no estaban presentes en el veneno de *B. jararaca*. Estas bandas podrían estar asociadas a proteínas responsables de actividades coagulante y proteolítica más potentes en el veneno de *B. alcatraz* (186).

En cuanto al perfil cromatográfico, evaluado por medio de columnas de exclusión molecular con límites de exclusión similares, también se muestran diferencias cualitativas y cuantitativas entre las distintas localidades. Es el caso de los venenos de *B. atrox*, los provenientes de Serranía del Cuao, presentan una mayor proporción de componentes de altas y bajas masas moleculares, mientras que para las localidades de Parguasa y Puerto Ayacucho-1 predominan componentes de

masas moleculares medias. Solo estos venenos muestran componentes de muy bajas masas moleculares, probablemente correspondientes a desintegrinas presentes en ellos, las cuales se han reportado en otros venenos de *Bothrops* (68). Los venenos de *B. venezuelensis* muestran perfiles muy similares, observándose en el veneno de Ávila la mayor proporción de componentes de alta y baja masa molecular. Los venenos de *B. colombiensis* son similares, excepto por una fracción de peso molecular alto presente solo en el veneno de Caucagua; ambos venenos muestran ser más ricos en componentes de pesos intermedios y medios

Tomando en cuenta las masas moleculares evidenciadas por electroforesis o por cromatografías de exclusión molecular, las proteínas presentes en estos venenos bothróticos venezolanos pueden representar componentes con actividad enzimática similares a los reportados en venenos de *Bothrops* descritos hasta el presente, donde se han evidenciado metaloproteasas con actividades hemorrágicas (64-40 kDa), serino proteasas (40-20 kDa) y fosfolipasas A2 (16-13 kDa) (73,187).

Con el propósito de aislar un compuesto de aplicabilidad en biomedicina, en los venenos bothróticos analizados en el presente estudio, se evaluaron las actividades hemorrágica, procoagulante y fibrinolítica, para tratar de seleccionar el veneno que presente una significativa actividad fibrinolítica, con escasas actividades hemorrágica y procoagulante.

Las metaloproteasas dependientes de zinc presentes en venenos de serpientes, son enzimas proteolíticas altamente tóxicas con una amplia variedad de actividades funcionales que causan hemorragia, la cual puede estar asociada a alteraciones en el sistema de la coagulación, así como a degradación de componentes de matriz extracelular y membranas basales, facilitando la difusión de los componentes del veneno a través de las membranas (41). El análisis comparativo de la actividad hemorrágica expresada como DMH, mostró la menor actividad en el veneno de *B. colombiensis* de Caucagua con 13,8 $\mu\text{g/ratón}$; mientras la mayor actividad fue observada en los venenos de *B. venezuelensis* de Baruta y La Boyera, con una DMH de 1,15 y 1,36 $\mu\text{g/ratón}$, respectivamente. Estas diferencias podrían estar relacionadas con la presencia de componentes de elevada masa molecular en los

venenos de *B. venezuelensis* asociados con metaloproteasas de alto peso molecular, como ocurre con la Bothropasina, una metaloproteasa tipo P-III, con potente actividad hemorrágica y mionecrótica aislada del veneno de *B. jararaca* (188)

Los efectos biológicos de los venenos de serpientes son complejos debido a que sus componentes tienen distintas acciones y pueden actuar de forma concertada con otras moléculas del veneno y/o de la víctima. La acción sinérgica de las proteínas del veneno puede potenciar sus actividades o contribuir a la propagación de las toxinas (1). Los venenos bothrópicos contienen numerosas proteínas que inducen alteraciones hemostáticas que involucran plaquetas, sistemas de la coagulación y fibrinólisis, así como actividades proteolíticas y necrosantes, que se manifiestan en la víctima del envenenamiento como síndrome hemorrágico y necrosis tisular respectivamente (189).

Los componentes de venenos de serpientes que actúan sobre el sistema de la coagulación, pueden tener un efecto directo sobre factores de la coagulación por activación proteolítica específica o degradación de manera inespecífica. La actividad coagulante es debida a enzimas que actúan sobre componentes procoagulantes del plasma, por ejemplo activadores de factor IX, factor X y protrombina, o por la acción de enzimas similares a trombina (38). El análisis comparativo de nuestros venenos bothrópicos mostró que la mayor actividad coagulante, empleando plasma como sustrato la tiene el veneno de *B. venezuelensis*- Ávila (58 UIThr/ μ g) y la menor el veneno de *B. colombiensis*-Caucagua. Al emplear fibrinógeno como sustrato, también correspondió al veneno de *B. venezuelensis*- Ávila (40 UIThr/ μ g) la mayor actividad. De igual forma el veneno de *B. colombiensis*-Caucagua presentó la menor actividad coagulante sobre este sustrato.

Los resultados de la actividad coagulante de los venenos bothrópicos de las diversas especies estudiadas, sugieren la presencia de actividades semejante a trombina, así como posibles activadores de factor X, como ya ha sido reportado por otros autores (70; 71) y/o la protrombina, como los reportados para *B. erythromelas* (75); *B. asper* (72); *B. jararaca* (76); *B. cotiara* (77) y *B. insularis* (78).

El análisis comparativo de la actividad procoagulante puso de manifiesto diferencias evidentes inter e intra específicas de los venenos evaluados, demostrando variación en la composición y proporción de los elementos activos del veneno. La mayor actividad coagulante sobre fibrinógeno observada en los venenos de *B. atrox*-Pto. Ayacucho y *B. colombiensis*-El Guapo, indica la prevalencia de proteasas con actividad similar a trombina. Son numerosas las enzimas similares a trombina descritas en venenos de serpientes del género *Bothrops*, tales como *B. jararacussu* (91); *B. pauloensis* (92); *B. marajoensis* (93) y *B. leucurus* (94), entre otras.

Los venenos de *B. venezuelensis* de las localidades Ávila y Baruta, así como *B. atrox*-Parguasa, presentaron la mayor actividad coagulante sobre plasma, lo que sugiere que además de enzimas semejantes a trombina, estos venenos deben contener actividad pro-coagulante relacionada con la generación de trombina, actividades que en conjunto pueden conducir a una CID con complicaciones clínicas que de no ser tratadas a tiempo pueden causar otras alteraciones a nivel renal, micro-vascular e incluso la muerte (175).

Es conocido que los venenos de muchos miembros de la familia Viperidae contienen fracciones que afectan el sistema fibrinolítico, que incluyen enzimas fibrinolíticas directas y de activadores del plasminógeno, bien sea presentes en los venenos o liberados por células endoteliales luego de la estimulación por toxinas presentes en éstos (22; 107,190). Estas enzimas actúan sobre el fibrinógeno y la fibrina, conduciendo a la defibrinogenación de la sangre, lisis de la fibrina y la consecuente disminución de la viscosidad sanguínea. Pueden ser clasificadas como α ó β fibrinogenasas, según su actividad sea preferencialmente sobre una u otra cadena del fibrinógeno, y pertenecen al grupo de enzimas tipo metaloproteasas o serino proteasas (107).

En el presente estudio comparativo la actividad fibrinolítica evaluada por método de placas de fibrina, también mostró evidentes diferencias entre los venenos evaluados. La mayor actividad fibrinolítica, expresada como actividad específica ($\text{mm}^2/\mu\text{g}$), la presentó el veneno de *B. colombiensis*-Caucagua ($30,6 \text{ mm}^2/\mu\text{g}$),

seguida de los venenos de *B. venezuelensis* de Baruta y *B. atrox* de Puerto Ayacucho-1, con 30,13 y 25,7 mm²/μg, respectivamente.

Debe resaltarse que en los venenos de *B. atrox* de Parguasa y Puerto Ayacucho-2, en las placas de fibrina se observó dentro del área de lisis, un halo sin lisis; hallazgo que sugiere la presencia de inhibidores de proteasas responsables de la inhibición de la actividad lítica sobre la fibrina. Estos resultados demuestran que los profundos efectos que los venenos bothrópicos causan en el sistema hemostático de la víctima, están relacionados con un balance entre activadores e inhibidores presentes en el veneno y así mismo con la cantidad de veneno, edad y sexo de la serpiente.

Este análisis comparativo de las distintas actividades presentes en los venenos bothrópicos de diversas especies y localidades, nos permitió escoger el veneno de *B. colombiensis* de Caucagua para proseguir el estudio, por presentar una elevada actividad fibrinolítica (30,6 mm²/μg), con una baja actividad hemorrágica (13,8 μg/ratón) y la menor actividad procoagulante, sobre ambos sustratos (plasma y fibrinógeno purificado); 11,0 y 14,0 UI Thr/μg, respectivamente. Esto con miras a aislar y caracterizar compuestos activos de relevancia en terapéutica, como es el caso de las enfermedades trombo-embólicas.

Desde el punto de vista de mecanismo de acción de los venenos, los resultados obtenidos en el presente trabajo demuestran una gran variabilidad en la composición y toxicidad de los venenos de diversas especies y localidades geográficas. Calvete y col., 2009, al comparar el proteoma de venenos bothrópicos también de ejemplares provenientes de diversas localidades de Centro y Sur América, encuentran importantes diferencias en los porcentajes de los componentes de dichos venenos (191).

2.- CARACTERIZACIÓN DEL VENENO DE *B.colombiensis*.

La variación en la composición del veneno en el seno de una misma especie constituye un mecanismo biológico que dota a la serpiente de gran flexibilidad para

adaptarse a ambientes cambiantes y poder, así, garantizar su supervivencia: de la adaptación a un ecosistema particular depende el éxito depredador de la especie (1).

Reportes de variabilidad intra específica demostrada en venenos provenientes de animales en cautiverio sugieren que las diferencias en la composición de los mismos son heredadas y controladas genéticamente de manera estricta, más que inducidas por el medio ambiente (181,192). Sin embargo, influencias micro evolutivas podrían ser la base de la alta variación en la composición del veneno entre poblaciones que comparten el mismo hábitat (193).

Las principales manifestaciones del envenenamiento bothrópico sistémico están representadas por las alteraciones en la hemostasia. Estas junto a las manifestaciones clínicas podrían ser provocadas por la variabilidad individual de los venenos. Las diferencias en la composición molecular y actividad farmacológica de los venenos de serpientes, se presentan no solo entre especies diferentes sino también dentro de la misma especie pero con edades o sexos diferentes (178).

En esta investigación también se evaluó la variabilidad intra especie por medio del análisis comparativo de las actividades fibrino(geno)lítica, coagulante, hemorrágica local y letal, de venenos de *B. colombiensis* provenientes de dos localidades geográficamente muy próximas (El Guapo y Caucagua, estado Miranda). Resultados que demostraron diferencias significativas probablemente asociadas a diferencias en la composición de los venenos.

En el envenenamiento bothrópico algunos autores han sugerido que la coagulopatía es producto de enzimas del veneno que actúan sobre el fibrinógeno, conocidas como enzimas trombina similares, activan la protrombina y/o el factor X e inducen la disminución de fibrinógeno circulante así como de otros factores de la coagulación, con incremento de los productos de degradación del fibrinógeno (194). Una significativa degradación del fibrinógeno es característica en pacientes víctimas de mordedura por viperidios en Sur América (190,195).

Hasta el presente, la actividad coagulante de *Bothrops colombiensis* no ha sido caracterizada. Nuestros datos indican variaciones en la composición y

proporción de componentes responsables de la actividad pro coagulante (Tabla 2) presente en los venenos bothrópicos de ambas localidades. La actividad amidolítica está relacionada a una moderada actividad similar a factor Xa y una elevada actividad similar a trombina.

Por el método coagulante el veneno de El Guapo mostró la mayor actividad, siendo más activo sobre fibrinógeno purificado, lo cual evidencia una elevada actividad semejante a trombina. En relación a las fracciones obtenidas por exclusión molecular, SI concentró la actividad coagulante, siendo la proveniente del veneno de El Guapo la más activa, especialmente sobre plasma como sustrato lo que evidencia que en esta fracción existen activadores de protrombina y/ o del Factor X como ya ha sido reportado por otros autores (70, 73). Estos componentes presentes en la fracción de mayor masa molecular llevan a pensar en estudios futuros para aislar y caracterizar actividades procoagulantes las cuales deben estar asociadas con las coagulopatías evidentes en las manifestaciones clínicas presentes en los envenenamientos por *B. colombiensis* (137,196, 197).

Como se describió anteriormente, en los venenos de la familia Viperidae se han descrito enzimas fibrinolíticas que causan lisis del coágulo sanguíneo de manera directa o por activadores del plasminógeno (107, 120, 128,129). Sin embargo, no existen estudios sobre la actividad fibrinolítica del veneno de *B. colombiensis*. Con miras a futuras aplicaciones clínicas de enzimas fibrinolíticas en terapia trombolítica, iniciamos un estudio de esta actividad en el veneno de *B. colombiensis*, el cual fue elegido entre todos los venenos bothrópicos evaluados, por ser el de mayor actividad fibrinolítica con de menor actividad procoagulante y hemorrágica. Nuestros resultados evidenciaron que ambos venenos de *B. colombiensis* estudiados presentaron actividad fibrinolítica por el método amidolítico (similar a calicreína y t-PA) y por el método de placas de fibrina (Tabla 2). El veneno de El Guapo mostró una actividad amidolítica más elevada que el de Cauca; en contraste, la mayor área de lisis fue observada en el veneno de Cauca, lo cual podría atribuirse a una mayor concentración de metaloproteasas asociadas a actividad fibrinolítica, tal como se ha reportado en veneno de *B.jararaca* (110), actividad que debe estar asociada al

cuadro hemorrágico inducido por la degradación de fibrinógeno/fibrina, así como con proteínas de matriz extracelular relacionadas con el proceso hemostático, cicatrización y modelaje de los vasos sanguíneos (198).

Entre las fracciones cromatográficas obtenidas de Sephadex G-100, SI y SII mostraron actividad fibrinolítica (Figura 7). En ambos venenos, la fracción SI presentó la más alta actividad procoagulante, hemorrágica, y fibrinolítica por el método amidolítico (similar a calicreína y t-PA), con baja actividad fibrinolítica en placas de fibrina (Tabla 3 y 4), lo que evidencia que en esta fracción deben estar concentradas la mayor parte de enzimas tipo serina asociadas a estas actividades. En contraste, la fracción SII mostró una actividad fibrinolítica cuatro veces mayor en placas de fibrina sin significativa actividad hemorrágica ni amidolítica, lo que puede estar asociado a la presencia de enzimas tipo metaloproteasas concentradas en esta fracción. Para evidenciar estos hallazgos se evaluó la actividad fibrinolítica en presencia de inhibidores de proteasas, resultados que mostraron que metaloproteasas son las más relacionadas con las actividades fibrinolítica y hemorrágica (Tabla 4).

En el zimograma sobre geles de fibrina ambos venenos mostraron diversas bandas activas entre 31 a 60 kDa, las cuales pueden estar asociadas con enzimas tipo serino como la Bothrombina (86) y Bothrojarasina (98) que a su vez se asocian con las actividades coagulante y fibrinolítica presentes en estos venenos, así como a metaloproteasas asociadas con actividades fibrinolítica y tipo hemorraginas como la jararagina (110). El zimograma también evidencia en la fracción SII, donde se concentró la actividad fibrinolítica dependiente de metales, bandas activas entre 20 y 50 kDa, las cuales podrían estar asociadas a metaloproteasas del tipo P-II o P-III (22, 43,199).

Para evaluar si esta actividad está asociada con enzimas tipo metaloproteasas, se determinó la actividad fibrinogenolítica presente en la fracción SII en presencia de quelantes de metales. Los resultados evidenciaron pérdida de la actividad, lo cual demuestra la asociación con este tipo de enzimas, hallazgo que llevó a continuar el estudio con esta fracción. Con el propósito de eliminar la actividad

coagulante contaminante, esta fracción se aplicó sobre una columna de benzamidina, la cual tiene la capacidad de unir enzimas tipo serina. El análisis de la actividad fibrinogenolítica con las fracciones obtenidas de la columna de benzamidina demostró que el material que no se unió indujo una rápida degradación de la cadena $\text{A}\alpha$ del fibrinógeno (30 segundos) y una lenta degradación de la cadena β (60 minutos). La intensidad de la banda de proteína correspondiente a las cadenas γ permaneció inalterable después de 24 horas de incubación. Estos resultados sugieren la presencia de α fibrinogenasas en los venenos de *B. colombiensis*, tal y como ha sido reportado en otros venenos bothrópicos. Cabe mencionar: *B. asper* (52,53), *B. neuwiedi* (116,117), *B. moojeni* (50, 112, 113,114), *B. cotiara* (77), *B. jararacussu* (56,118, 119), *B. jararaca* (109,188), *B. leucurus* (58, 94, 120, 123, 124).

La hemorragia local debida a lesiones en el endotelio vascular es un efecto clínico importante en el envenenamiento por *Bothrops colombiensis* (15). Esta actividad hemorrágica es manifestada por equimosis y petequias locales con sangramiento en el sitio de la mordedura. La dosis hemorrágica mínima (DHM) evaluada en ambos venenos de *B. colombiensis* y fracciones mostró que El Guapo tenía una DHM aproximadamente 50% menor a la del veneno de Caucagua. La hemorragia es uno de los principales efectos locales del envenenamiento por viperidios y de gran significancia en la patología de pacientes envenenados (42,43). Algunos autores (72, 200) han propuesto que los mayores responsables de esta actividad hemorrágica en los venenos de serpientes son las metaloproteasas. Esta actividad fue localizada en la fracción SI en ambos venenos.

En cuanto a la presencia de metaloproteasas en el veneno de *B.colombiensis*, nuestros resultados coinciden con los presentados en el análisis proteómico de este veneno realizado por Calvete y col. en 2009. Ellos determinan que el 42,3% del contenido total de proteínas de este veneno corresponde a metaloproteasas dependientes de Zinc^{+2} , porcentaje repartido entre metaloproteasas tipo PIII (11%), que en nuestro caso correspondería a proteasas hemorrágicas y probablemente a activadores de protrombina tipo A y B, concentradas en la fracción SI obtenida de la columna de exclusión molecular y metaloproteasas tipo PI (30,8%), que

correspondería a metaloproteasas con poca actividad hemorrágica y mayoritariamente no hemorrágicas, probablemente α -fibrinogenasas, evidenciadas en la fracción SII (191).

En contraste, el porcentaje de serino proteasas determinado por Calvete y col. en 2009 (191), corresponde solo a un 1% del contenido total de proteínas del veneno. Al compararlo con las actividades asociadas a serino proteasas determinadas en nuestro análisis (actividad similar a trombina, calicreína y t-PA) y concentradas en la fracción SI, podría sugerirse que se trate de proteínas pobremente representadas en términos cuantitativos, pero muy activas y por consiguiente, muy importantes en el cuadro clínico. Se ha demostrado que en el envenenamiento por ejemplares de la familia Viperidae, proteínas similares a calicreína son las responsables del dolor local, incrementos en la permeabilidad capilar, hipotensión sistémica y contracción del músculo liso (201).

Nuestros resultados destacan la importancia de complementar los estudios de proteómica de los venenos con la exhaustiva evaluación de las actividades biológicas de sus componentes para así poder relacionar posibles mecanismos de acción con afectos clínicos.

Bogarín y col. en 2000 establecieron variaciones en la toxicidad de venenos de 11 especies de serpientes del género *Bothrops* (202). Otros autores han demostrado diferencias inter específicas (185, 186,203), En nuestro estudio, la letalidad de los venenos mostró significativa diferencia entre *Bothrops* de la misma especie. La alta toxicidad observada en el veneno de Caucagua podría ser explicada por la elevada concentración de metaloproteasas presentes en este veneno, implicadas en la elevada actividad fibrinolítica observada en este veneno, la cual puede actuar directamente sobre la matriz extracelular induciendo una extensiva disrupción sub endotelial con activación de células endoteliales y plaquetas, conduciendo de manera indirecta a una coagulación intravascular diseminada.

En conclusión, las acciones tóxicas de los venenos de serpientes son versátiles ya que sus diferentes componentes tienen actividades que varían,

pudiendo también ser más activas en relación con otras toxinas al actuar sinérgicamente incrementando en consecuencia sus acciones finales. La variabilidad de los venenos ocurre en diversos ámbitos incluyendo variaciones inter e intra especie (193). Adicionalmente, los componentes de los venenos pueden ser alterados por la localización geográfica y el hábitat de las serpientes (98, 193, 204).

3. AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE METALOPROTEASAS CON ACTIVIDAD DE α -FIBRINOGENASAS.

Los venenos de serpientes son mezclas complejas ricas en proteínas que incluyen metaloproteasas, fosfolipasas A2, serino proteasas y otras proteasas que actúan por diferentes mecanismos (22, 41, 190). Su estudio es de interés médico pues son las responsables de muchos efectos locales y sistémicos en el accidente ofídico. Por muchos años las investigaciones se han enfocado en algunas enzimas fibrinolíticas que incluyen metaloproteasas por su potencial aplicación clínica en el tratamiento de la enfermedad trombótica (205).

A pesar de su importancia médica, hasta el presente son escasos los trabajos realizados con veneno de *Bothrops colombiensis* en Venezuela. Existen reportes de estudios clínico-epidemiológicos con venenos de *Bothrops* con especial énfasis en este veneno por ser el responsable de la mayoría de los accidentes ofídicos en el país (137, 196, 197). Calvete y col. en el 2009 (191), han estudiado la proteómica del veneno de *B.colombiensis*, con fines taxonómicos y filogenéticos considerándola un miembro más del complejo “atrox-asper”. En relación a la composición del mismo, solamente dos proteínas han sido aisladas del veneno de *B. colombiensis*, una fracción con actividad tipo trombina aislada y parcialmente caracterizada como una glicoproteína de 67 kDa que coagula el fibrinógeno (84) y una desintegrina, la Colombistatina, proteína no enzimática que inhibe la agregación plaquetaria así como la migración celular y la adhesión de células cancerosas a fibronectina (68).

En el presente estudio se describe la purificación y caracterización de dos metaloproteasas fibrino(geno)líticas no hemorrágicas (Colombienasa-1 y

Colombiensa-2), provenientes del veneno de *B. colombiensis*, por la combinación de tres pasos cromatográficos: intercambio catiónico, interacción hidrofóbica y exclusión molecular, las cuales representan las primeras enzimas, fibrino(geno) líticas descritas para este veneno. El esquema de purificación y actividad funcional fue similar al de otras metaloproteasas tipo P-Ib. tales como la BjussuMP-II de *B. jararacussu* (118).

El primer paso de purificación, cromatografía de intercambio catiónico, condujo a la obtención de tres fracciones fibrinolíticas (F1, F2, F3), las cuales por SDS-PAGE se muestran cada una como una sola banda de aproximadamente 25 kDa. Esto sugiere la existencia de un “complejo” de enzimas fibrinolíticas de bajo peso molecular, donde coexisten enzimas hemorrágicas (F3) y no hemorrágica o débilmente hemorrágica (F1 y F2).

La caracterización de las Colombienasas mostró que presentan gran similitud en sus propiedades físicas, bioquímicas y biológicas. Los resultados correspondientes a las actividades biológicas muestran que ambas proteínas fueron estables y no sufrieron modificación durante el proceso de purificación. La Colombienasa-1 representa el 1,92% de la proteína total del veneno; en contraste, la Colombiensa-2 representa solo el 0,26%. El perfil en cromatografía líquida de alta resolución de fase reversa (CLAR-FR) y su secuencia confirmaron el alto grado de pureza de estas enzimas.

Sus masas moleculares por SDS-PAGE fueron de 25 kDa aproximadamente y por análisis de espectrometría de masas (MALDI- TOF-TOF) fueron de 23074,31 Da para la Colombienasa-1 y de 23078,80 Da para la Colombienasa 2; con puntos isoeléctricos de 6,0 y 6,2 respectivamente. Las masas moleculares de las Colombienasas son similares a las reportadas para otras metaloproteasas tales como: Leucurolysin_A y BleucMP, con 23,0 y 23,83 kDa respectivamente, descritas en *B. leucurus* (120, 121); BthMP y BmooMPa-1 de 23,5 y 24,5 kDa respectivamente aisladas del veneno de *B. moojeni* (114,115); Cotiaractivase of 23 kDa del veneno de *B. cotiara* (77); BaP1 de 22,3 kDa aislada del veneno de *B. asper* (52); Neuwiedasa de 20 y 25 kDa proveniente del veneno de *B. neuwiedi* (116); Porthidin-

1 de 23 kDa aislada del veneno de *Porthidium lansbergii* (206); Batroxase de 22,9 proveniente del veneno de *B. atrox* (125), entre otras.

El conocer las secuencia de aminoácidos y las estructuras tridimensionales de nuevas metaloproteasas aisladas a partir de venenos de serpientes, permitirá identificar, por comparación con las ya descritas, los residuos específicos y los motivos relacionados con las actividades biológicas de las Colombienasas, para así entender mejor sus posibles mecanismo de acción y por ende el abordaje de las consecuencias clínicas en la víctimas de estos venenos. De los fragmentos secuenciados de las Colombienasas, un péptido con 14 residuos, HLELVVVADHGMFK, resultó común a ambas enzimas y reflejó la mayor homología (92-100% de identidad) con los cotejados en la base de datos NCBI (170). Se encontró un 92% de identidad con la cadena α de la estructura cristalina de BmooMP α -I, metaloproteasa no hemorrágica de *B. moojeni* (171); y 100% de identidad con las metaloproteasas BmooMPalpha-I de *B. moojeni* (114); Leucurolysin-A de *B. leucurus* (120); Mt-d-I de *Agkistrodon blomhoffi brevicaudus* (172); Mt-d de *Agkistrodon halys* (172) y LHF-II de *Lachesis muta* (173). Estas proteínas son todas metaloproteasas dependientes de zinc, siendo las provenientes de *B. moojeni* y *B. leucurus* libres de actividad hemorrágica.

Es importante destacar que las Colombienasas presentaron una alta homología no solo con secuencias correspondientes a metaloproteasas de venenos bothrópicos (*B. moojeni* y *B. leucurus*), sino también a las de venenos de *Agkistrodon* sp (Mt-d-I) y *Lachesis muta* (LHF-II), las cuales son metaloproteasas hemorrágicas tipo P-II y P-I respectivamente. Esta particularidad sugiere que las metaloproteasas libres de actividad hemorrágica podrían ser buenos inmunógenos para generar anticuerpos efectivos contra metaloproteasas de mayor peso molecular y con más potente actividad hemorrágica.

Las Colombienasas 1 y 2, con masas moleculares alrededor de 23 kDa, carecen de actividad hemorrágica y su actividad fibrino(geno) lítica es inactivada por inhibidores de metaloproteasas, pero no por inhibidores de serino proteasas, en consecuencia, pueden ser clasificadas dentro del tipo P-Ib. La ausencia de actividad

hemorrágica puede deberse a una menor afinidad por los componentes de proteínas de matriz o a su estructura, ya que las metaloproteasas de la clase P-I carecen de los dominios tipo desintegrina y ricos en cisteína, los cuales parecen determinar su unión al colágeno y a otros componentes de matriz extracelular, presentan solo el dominio metaloproteasa, caracterizado por una secuencia consenso HEXXHXXGXXH, responsable de la unión al zinc. (207),

La actividad fibrinolítica presente en las Colombienasas, evaluada tanto en placas de fibrina como por análisis electroforético del patrón de degradación de la fibrina entrecruzada, demostró un comportamiento muy similar en ambas enzimas. Las Colombienasas 1 y 2 presentaron una actividad fibrinolítica que fue semejante en presencia y ausencia de plasminógeno, lo cual sugiere que estas enzimas no son capaces de activar plasminógeno, como lo corroboran nuestros ensayos de activación del plasminógeno. Estos resultados indican que la actividad fibrinolítica presente en las Colombienasas 1 y 2, es por acción directa y no por activación del plasminógeno a plasmina.

En relación al patrón de degradación de la fibrina, el análisis electroforético de la fibrina entrecruzada muestra que la plasmina, empleada como control positivo y el veneno y sus fracciones, originan patrones de degradación diferentes. La plasmina genera a las 24 horas de incubación un patrón de degradación característico representado por dos prominentes bandas de 79,9 y 38,5 kDa (208), La presencia de productos de muy bajo peso molecular (6,3 kDa), podría explicarse sobre la base de que no fue completo el entrecruzamiento de la fibrina, probablemente debido a que el FXIIIa habría perdido actividad. En contraste, el veneno crudo y las Colombienasas produjeron bandas correspondientes a productos de 34,4; 21,9 y 8,9 kDa.

En relación a la actividad proteolítica sobre el fibrinógeno, una glicoproteína dimérica de 340 kDa compuesta por tres cadenas polipeptídicas $\text{A}\alpha$, $\text{B}\beta$ y γ , unidas por enlaces disulfuro (23), las enzimas proteolíticas de venenos de serpientes han sido clasificadas como α o β fibrinogenasas, según degraden *in vitro* de manera directa preferencialmente las cadenas $\text{A}\alpha$ o $\text{B}\beta$ del fibrinógeno, respectivamente. Las α -fibrinogenasas atacan preferencialmente las cadenas $\text{A}\alpha$ y generalmente son

metaloproteasas que también degradan las cadenas B β pero más lentamente; mientras que las β -fibrinogenasas generalmente son serino proteasas que degradan más rápidamente las cadenas B β y muestran actividad arginina-esterasa (22,190). Se asume que estas enzimas, durante el envenenamiento tienen como función, remover la fibrina que pueda formarse y el fibrinógeno para mantener un estado de anti-coagulación que facilite la propagación de otros componentes del veneno a través del sistema circulatorio (209).

La actividad fibrinogenolítica de las Colombienasas, evaluada por electroforesis, fue muy similar. La cadena A α del fibrinógeno fue muy susceptible a la acción de ambas Colombienasas, su degradación se inició a los 30 segundos y fue completa a los 15 y 30 minutos para Colombienasa-1 y 2 respectivamente. Nuestros resultados sugieren que las Colombienasas actúan como α -fibrinogenasas.

La Colombienasa-1, a una relación 100:1, indujo degradación de las cadenas A α y B β del fibrinógeno sin alteración de la cadena γ , en contraste, la Colombienasa-2 degradó completamente las cadenas A α -, B β - del fibrinógeno en 5 minutos y la cadena γ a los 120 minutos, lo que hace a esta última diferente a la Colombienasa-1 y similar a la plasmina. Existen pocos reportes de enzimas de venenos de serpientes que degraden la cadena γ del fibrinógeno. No se ha reportado ninguna enzima que degrade específica y exclusivamente esta cadena (190). La cadena γ es mucho más estable y su degradación ocurre al parecer solo incrementando el tiempo de incubación o la concentración de la enzima. Esto se ha observado con la FIIa de *Agkistrodon acutus*, la cual degrada la cadena γ tras una incubación prolongada de 8 horas (210). El mismo fenómeno fue observado con Cerastase F-4 proveniente de veneno de *Cerastes cerastes* y una enzima fibrino(geno)lítica aislada del veneno de *Vipera lebetina*. Ambas fueron capaces de degradar la cadena γ tras 48 y 24 horas de incubación respectivamente (211; 212). En cuanto a los venenos bothrópicos, Serrano y col., 1993, comparan enzimáticamente tres proteasas aisladas del veneno de *B. moojeni*, dos de ellas serino proteasas (MSP 1 y MSP 2) y una metaloproteasa (MPB), todas degradan las tres cadenas del fibrinógeno, siendo más activa la MPB (50). A partir del veneno de *B atrox*, se aisló una metaloproteasa hemorrágica (Batx-

l) que degrada parcialmente la cadena γ al incrementar la concentración de la enzima (123). Recientemente, Rodríguez-Acosta y col., reportan degradación de la cadena γ del fibrinógeno al incubar veneno crudo o fracciones semipurificadas de veneno de *B.isabellae* en la relación 100:10 (213). La condición particular de que la Colombienasa-2 degrade adicionalmente la cadena γ , podría alterar mas intensamente las funciones del fibrinógeno tales como su unión al factor XIII, la incorporación del factor XIII al coagulo de fibrina, la unión a la trombina, la polimerización de la fibrina y la agregación plaquetaria (23), lo cual puede incrementar el riesgo de sangramiento en el accidente por mordedura de serpientes *B. colombiensis*.

Adicionalmente, la actividad coagulante remanente del fibrinógeno tratado con el veneno de *B colombiensis* o sus fracciones, las Colombienasas 1 y 2, demuestra una ausencia de coágulos en todos los casos. Estos resultados confirman que el fibrinógeno ha sido degradado con pérdida de la actividad funcional, lo cual se relaciona con el síndrome hemorrágico sistémico observado luego del envenenamiento por venenos bothrópicos.

Swenson y Markland en 2005 hacen una revisión sobre enzimas fibrino(geno)líticas. Estas enzimas agrupadas en serino y metaloproteasas. difieren en sus mecanismos y blancos de acción, pero su objetivo es común: representan el elemento que facilita la dispersión de los componentes tóxicos del veneno a través de la circulación (190).

La mayoría de las α - fibrinogenasas son metaloproteasas, con actividad dirigida preferencialmente a las cadenas $A\alpha$ y con baja actividad sobre las cadenas $B\beta$ del fibrinógeno. Presentan actividad proteolítica sobre caseína, la mayoría de ellas son hemorrágicas y su actividad es inhibida por agentes quelantes de metales como el EDTA. Están relacionadas entre sí por sus secuencias de aminoácidos y pertenecen a la familia de las metaloproteasas conocidas como metzincinas. Los miembros de este grupo son enzimas dependientes de zinc, su tamaño oscila entre 20 y 100 kDa y son capaces de hidrolizar proteínas de membranas basales, tales como fibronectina,

laminina y colágeno tipo IV. Además degradan fibrinógeno y fibrina. Pueden encontrarse varias de ellas en un mismo veneno (42, 55, 107).

Las β -fibrinogenasas, generalmente del tipo serino proteasas que atacan preferencialmente las cadenas $B\beta$ del fibrinógeno y poseen baja actividad sobre las cadenas $A\alpha$. Poseen actividad de esterasa sobre sustratos sintéticos como TAME o BAEE y sus actividades son inhibidas por inhibidores de serino proteasa como la benzamidina (107).

Las enzimas fibrino(geno)líticas de acción directa tienen mecanismo de acción completamente diferente a los activadores del plasminógeno con características muy especiales:

- ✓ Son de acción directa, pues no requieren de ningún factor para expresar su actividad.
- ✓ No liberan fibrinopéptidos A ó B, no inducen formación de fibrina.
- ✓ Pueden ser hemorrágicas o no.
- ✓ La actividad hemorrágica puede estar asociada ó no a la fibrinolítica.
- ✓ Al ser de acción directa tienen las ventajas de:
 - o No son inhibidas por inhibidores de serino proteasas plasmáticas (SERPINAS).
 - o No activan plasminógeno, por consiguiente no hay efectos secundarios.
 - o No se registran alteraciones patológicas.

Estas características las hacen poseedoras de potencial clínico en tratamiento de coágulos oclusivos (190).

Con base en sus propiedades bioquímicas y fisicoquímicas, las enzimas fibrino(geno)líticas tipo metaloproteasas, (por ejemplo la fibrolasa, enzima fibrinolítica aislada del veneno de *Agkistrodon contortrix contortrix*) con masas moleculares entre 22 y 25 kDa, son α -fibrinogenasas, que carecen de actividad hemorrágica, no contienen carbohidratos en su estructura, son inhibidas por quelantes de metales, son termolábiles y su actividad proteolítica es máxima en los pHs entre 7 y 9.

La actividad fibrinogenolítica fue empleada para determinar la estabilidad de las Colombienasas frente a variaciones de temperatura y pH. Los resultados mostraron que las enzimas fueron activas sobre las cadenas $A\alpha$ y $B\beta$ del fibrinógeno en rangos de temperatura comprendido entre 4 y 37 °C, con una actividad máxima a

25 °C. Las Colombienasas no fueron estables a altas temperaturas (56°C). Igualmente la actividad proteolítica fue máxima en los pHs entre 7 y 9. Este comportamiento es similar al de otras metaloproteasas aisladas de venenos de serpientes (56, 118,120).

Muchas de las enzimas fibrinolíticas aisladas de venenos de serpientes son metaloproteasas, las cuales se caracterizan por la presencia de un ion metálico catalíticamente indispensable en su sitio activo, generalmente zinc. En consecuencia sus actividades catalíticas pueden ser inhibidas por quelantes de metales (43).

Las actividades fibrinolítica y fibrinogenolítica de ambas Colombienasas fueron completamente abolidas por EDTA, EGTA, 1-10 fenantrolina. En contraste, la incubación con benzamidina, aprotinina, y/o PMSF no inhibió su actividad.

La inhibición de la actividad fibrino(geno)lítica por quelantes de metales fue revertida solamente por Zn^{++} (10 mM), lo que demuestra que este ión metálico está involucrado en la actividad. Se trata entonces de metaloproteasas dependientes de zinc, lo cual concuerda con los resultados obtenidos al cotejar la secuencia de las Colombienasas con las secuencias registradas en la base de datos consultada. Se han reportado resultados similares para otras MPVS como lo muestra la caracterización de las Mutalisinas II aisladas del veneno de *Lachesis muta muta* (157).

La inhibición de la actividad fibrinogenolítica por la incubación con DTT revela la importancia de los enlaces disulfuro en la estabilización de la estructura nativa y por consiguiente de su actividad. Así mismo la presencia de enlaces disulfuro en el dominio metaloproteasa sugiere la especificidad de estas enzimas por sustratos particulares (214).

La homología demostrada a través de la comparación de secuencias, con metaloproteasas dependientes de zinc, así como el efecto de los quelantes de metales sobre su actividad fibrino(geno)lítica confirma que las Colombienasas 1 y 2 son metaloproteasas, particularmente α -fibrinogenasas.

Podría pensarse que ambas Colombienasas pueden promover un efecto anti-coagulante, ya que son capaces, como los muestran nuestros ensayos *in vitro*, de

degradar las cadenas $A\alpha > B\beta$, (adicionalmente la cadena γ en el caso de la Colomبيينasa-2) del fibrinógeno, así como los polímeros de α , los dímeros γ - γ las cadenas α y β de la fibrina. Estas características les confieren un potencial terapéutico; sin embargo son estas mismas bondades quienes potencian el efecto tóxico del veneno al incrementar el riesgo de sangramiento en el curso del accidente ofídico.

Las membranas basales son estructuras especializadas de matrices extracelulares producidas por algunas células tales como células endoteliales, epiteliales, adiposas, musculares y nerviosas. Molecularmente se caracterizan por la presencia de una gran variedad de componentes bioquímicamente complejos organizados como una red rica en proteínas que incluyen laminina, entactina, colágeno tipo IV y proteoglicanos. En los mamíferos las membranas basales están involucradas en angiogénesis, diferenciación celular, adhesión plaquetaria, filtración glomerular, entre otras (215).

Las bases moleculares de la potencia hemorrágica son de naturaleza multifactorial compleja que incluye modificaciones post traslacionales, presencia de motivos funcionales, elementos estructurales particulares, grado de glicosilación y propiedades fisicoquímicas específicas (44, 118, 216). La habilidad de las MPVS de inducir hemorragia se ha vinculado a su capacidad para degradar proteínas de matriz extracelular presentes en las membranas basales que rodean las células endoteliales en la microvasculatura (42, 43, 217). Se han realizado numerosos esfuerzos, con la finalidad de interpretar los mecanismos que gobiernan la actividad hemorrágica de las MPVS; sin haber sido completamente dilucidados. Existe consenso en cuanto a que el paso clave es la degradación enzimática de los componentes de las membranas basales de los capilares sanguíneos (42, 43, 44). Una vez degradadas las membranas basales y proteínas de adhesión, se debilita la pared del vaso, alterándose las interacciones entre las células endoteliales y la lamina basal. Las presiones biofísicas de la microvasculatura inducen la distensión y debilitamiento de la pared del capilar, se pierde la integridad de la misma en algunos puntos y allí ocurre la extravasación (218)

Con base en la estructura de sus dominios, las metaloproteasas han sido recientemente reclasificadas como P-I, P-II y P-III. Cada una de estas categorías incluye subclases. Las antiguas P-IV han pasado a ser una categoría dentro de las P-III, ya que hasta la fecha no se ha observado su ARNm transcrito (45). Las MPVS clase P-III inducen un mayor efecto hemorrágico que las clase P-I, esto se ha asociado a la presencia de los dominios tipo desintegrina y rico en cisteína, los cuales determinan la especificidad del sustrato (172) pues dirigen a la enzima a sitios fisiológicamente relevantes en los capilares (42), resultando en la degradación proteolítica de proteínas estructurales claves en las membranas basales. Las toxinas hemorrágicas más potentes presentan una desarrollada especificidad de sustrato y eficiencia catalítica para uniones peptídicas de proteínas presentes en la membrana basal (219,220). La observación de que algunas metaloproteasas no hemorrágicas también degradan *in vitro* estas proteínas de membranas basales conduce a pensar que no es la degradación en sí, sino el patrón específico de la misma (221).

Como parte de la caracterización biológica de las Colombienasas se evaluó la acción de estas metaloproteasas, que por sus características pueden pertenecer a la clase P-I, sobre proteínas de matriz extracelular y membranas basales que incluyeron colágeno tipo IV, laminina, gelatina y sobre la proteína adhesiva fibronectina. Bajo las condiciones experimentales empleadas, se observó que la laminina, una glicoproteína trimérica que constituye el mayor componente no colagenoso de la lámina basal, asociada a la adhesión, proliferación y diferenciación, fue completamente resistente a la acción de las Colombienasas. La misma situación ocurrió con el colágeno tipo IV. Este hallazgo podría explicar la ausencia de actividad hemorrágica por parte de las Colombienasas cuando son inyectadas en la piel de ratones. La Leucurolisin-a de *B. leucurus*, la Neuwiedasa de *B. neuwiedi* metaloproteasas no hemorrágicas clase I, la Atroxlysin, metaloproteasa hemorrágica proveniente de *B.atrox* igualmente mostraron una proteólisis limitada de los componentes de matriz extracelular (116, 120, 124).

Escalante y col. 2011 al comparar la actividad proteolítica de BaP1, metaloproteasa hemorrágica de *B. asper* con la de leuc-a de *B. leucurus*, sobre

algunos sustratos *in vivo* e *in vitro*, encuentran que difieren en su capacidad para degradar sustratos clave de membranas basales, principalmente colágeno tipo IV, perlecanos y nidógeno. Estas proteínas juegan un papel primordial en la integración de las membranas basales con las proteínas de matriz que les rodean, como lo son los colágenos tipo VI y XV, dando estabilidad mecánica a la estructura de los capilares sanguíneos. La hidrólisis diferencial del colágeno tipo IV por parte de las enzimas mencionadas, sugiere que la degradación de estos componentes de membranas basales, estructuralmente relevantes, podría representar el paso clave en el mecanismo de acción de las MPVS. (222).

La fibronectina es una glicoproteína adhesiva formada por una molécula asimétrica que consiste de dos subunidades similares de 220 kDa. Está presente en forma soluble en el plasma o insoluble en la matriz extracelular de la mayoría de los tejidos. Es sintetizada y secretada por una gran variedad de células, por lo tanto es uno de los componentes de mayor distribución en el cuerpo, que participa en las reacciones bioquímicas de diversos procesos fisiológicos y patológicos. Debido a la presencia de dominios multifuncionales en su estructura, la fibronectina interacciona con distintos componentes de la coagulación y fibrinólisis. Puede unirse al colágeno, fibrinógeno, fibrina, factor XIII, plaquetas, entre otros y de esta manera regula procesos tales como adhesión y agregación plaquetaria, remodelación de tejidos y fibrinólisis mediada por activadores del plasminógeno (223).

Las Colomبيينasas 1 y 2 degradan la fibronectina generando patrones de degradación diferentes. La Colomبيينasa-2 genera un mayor número de fragmentos de degradación. La degradación de la fibronectina ha sido reportada para metaloproteasas aisladas de venenos de serpientes como Atroxlysin de *B.atrox* (124), Leucurolysin-b y Leucurolysin-a de *B.leucurus* (58,120), Neuwiedasa de *B.neuwiedi* (116), Colombiestatina de *B.colombiensis* (68), BaH4 de *B.asper* (53), entre otras.

La fibronectina juega un importante papel en los procesos celulares de migración y adhesión asociados a la embriogénesis, malignidad, cicatrización, hemostasia. Particularmente en la hemostasia participa en la agregación y adhesión

plaquetaria, así como el entrecruzamiento de la fibrina, en consecuencia todos estos procesos pueden verse alterados por la actividad de las Colmbienasas sobre esta proteína (223). La acción proteolítica de las Colmbienasas sobre esta importante proteína extracelular y plasmática, involucrada tanto en procesos hemostáticos de relevancia como funciones plaquetarias, coagulación y fibrinólisis, así como la cicatrización y remodelación de tejidos, puede explicar parte de las manifestaciones hemorrágicas locales y sistémicas observadas en los accidentes bothrópicos.

Los venenos bothrópicos inducen efectos locales y sistémicos tales como edema, hemorragia, mionecrosis, desórdenes hemostáticos, nefrotoxicidad entre otros. Las metaloproteasas de estos venenos se asocian con los procesos hemorrágicos por la degradación proteolítica de las proteínas de la superficie celular y los componentes de matriz extracelular involucrados en el mantenimiento de la estructura e integridad capilar (42). Particularmente la gelatina ha sido usada como sustrato para demostrar actividad metaloproteasa y se ha relacionado con la actividad hemorrágica (174). La actividad gelatinolítica evaluada a través de zimografía ha servido para ensayar actividad proteolítica de MPVS sobre colágeno, lo cual puede estar relacionado con la degradación *in vivo* de la matriz extracelular (224).

Nuestros resultados muestran para el veneno crudo varias bandas intensas en la zona de pesos moleculares altos (<148 >64 kDa), que pueden corresponder a metaloproteasas de altos pesos moleculares o clase P-III. Otra banda fue detectada en la región cercana a los 22 kDa. En contraste las Colmbienasas tienen un comportamiento diferencial, ya que solo la Colmbienasa-2 presenta débil actividad gelatinolítica en esa región cercana a los 22 kDa, lo cual coincide con el peso molecular determinado para ella. Esta actividad fue inhibida en presencia de EDTA, corroborando su naturaleza de metaloproteasas. Resultados similares han sido reportados por Terra y col., 2009 (224) al comparar la actividad gelatinolítica de los venenos de *B. lanceolatus* rico en metaloproteasas clase P-I y de *B. jararaca*, veneno rico en metaloproteasas clase P-III, encontrando una mayor actividad gelatinolítica en este último. Asocian este comportamiento con las patologías radicalmente diferentes

inducidas por estos venenos. Rodríguez y col., 2010 al estudiar la actividad gelatinolítica del veneno de *B. isabellae* reportan bandas de actividad en las áreas entre 105 y 46 kDa y asocian esta actividad en menor grado, con el potencial necrótico del veneno (213).

Adicionalmente, la actividad coagulante evaluada por método coagulante demostró que el veneno crudo tiene una discreta actividad coagulante sobre plasma y fibrinógeno purificado. Podría pensarse que por tratarse de un veneno bothrópico, en él deberían estar presentes, como en otros venenos bothrópicos, actividades procoagulantes relacionadas con activadores de FIX, FX o FV, entre otros, pero los inhibidores de serino proteasas presentes en el plasma humano, como la antitrombina III, antitripsina y macroglobulina, entre otros, deben estar neutralizando estas actividades. Las Colombinasas no presentaron actividad procoagulante al emplear plasma o fibrinógeno como sustrato lo que indica que no contienen las enzimas similares a trombina o posibles procoagulantes, presentes en el veneno crudo.

Al igual que otras metaloproteasas fibrinolíticas, las Colombinasas, a diferencia del veneno crudo, no poseen actividad amidolítica sobre los sustratos para trombina, factor Xa, calicreína, plasmina, uroquinasa y t-PA lo cual indica que la actividad proteolítica mostrada en los resultados anteriores, sobre fibrinógeno, fibrina, y proteínas de matriz extracelular, no está relacionada con enzimas tipo serina. Este comportamiento es común a otras enzimas fibrino (geno) líticas reportadas (190). Este hallazgo unido a la ausencia de inhibición por inhibidores de serino proteasas, confirma que las Colombinasas no son serino proteasas.

En general las plaquetas están vinculadas a funciones de: integridad vascular, hemostasia primaria, coagulación, transporte (serotonina, etc.), trombosis, aterogénesis, fagocitosis, inflamación, procesos inmunológicos, posiblemente participan en procesos metastásicos. En el proceso hemostático las plaquetas participan en las reacciones de: 1) adhesión a la pared o a la zona lesionada del vaso; 2) extensión de la plaqueta sobre la superficie endotelial expuesta; 3) secreción del contenido granular de las plaquetas; 4) formación de un agregado o masas de

plaquetas; 5) aceleración de la coagulación plasmática (23). Los venenos de serpientes vipéridas latinoamericanas afectan las plaquetas de maneras diversas. Se han descrito componentes como la 'botrocetina' y la 'aspercetina' que se unen al factor de von Willebrand e inducen agregación plaquetaria, produciendo *in vivo* un cuadro de trombocitopenia trombótica. Estos venenos presentan también un grupo de moléculas denominadas 'desintegrinas', las cuales tienen una región con la secuencia Arg-Gli-Asp (RGD) que se une a la integrina $\alpha IIb\beta 3$ de las plaquetas, causando inhibición de la agregación plaquetaria y afectando el proceso hemostático (225).

Nuestros ensayos mostraron que las Colombienasas no tienen efecto sobre la agregación plaquetaria al emplear colágeno ó ADP como inductores. Estos resultados son similares a los obtenidos al comparar el efecto de la Mutalisinas I y II (mut-I y mut-II), aisladas de veneno de *Lachesis muta muta*, sobre la agregación plaquetaria. La mut I (100 kDa), metaloproteasa hemorrágica clase III, muestra efecto inhibitorio sobre la agregación plaquetaria inducida por colágeno, empleando PRP humano, mientras la mut II no. El dato sugiere que el dominio tipo desintegrina en las MPVS clase III (principalmente EDC en lugar de R/KGD como en las desintegrinas) juega un papel clave ya que le confiere a estas metaloproteasas la capacidad de reconocer receptores de la familia de las integrinas en las membranas de las plaquetas y de otros tipos celulares, afectando el proceso de agregación plaquetaria y la adhesión de otras células a sustratos de matriz extracelular (226; 227).

Marcussi y col., 2007 encontraron que la BjussuMP-II, metaloproteasa no hemorrágica (24 kDa) proveniente de *B. jararacussu*, era capaz de inhibir la agregación plaquetaria inducida por colágeno y proponen que las diferencias estructurales entre proteasas hemorrágicas y no hemorrágicas podrían estar en el reconocimiento selectivo de proteínas de la superficie de las plaquetas, las cuales podrían tener alta afinidad por las integrinas, interfiriendo con sus funciones (118).

Partiendo de que las Colombienasas digieren el fibrinógeno, la fibrina y la fibronectina, es razonable asumir que estas proteasas inhiban la agregación plaquetaria, además, al degradar fibrinógeno y la fibronectina intactos, los productos de degradación de los mismos podrían contribuir a la inhibición del proceso. Sin

embargo es posible que la ausencia del dominio tipo desintegrina en las Colombiasas determine un efecto inhibitorio de relevancia sobre la agregación plaquetaria.

La patogénesis del envenenamiento bothrópico es compleja, pero las manifestaciones locales han sido vinculadas directamente a la acción combinada de metaloproteasas, fosfolipasas A_2 y/o serino proteasas presentes en el veneno (45,228).

Los pacientes víctimas de accidentes bothrópicos, presentan signos de envenenamiento sistémico tales como alteraciones hemostáticas y signos locales que incluyen hemorragia, mionecrosis, dermonecrosis y prominente respuesta inflamatoria. (131, 137,139). La respuesta inflamatoria, clave en el progreso del daño tisular, está asociada con edema, dolor, infiltrado leucocitario y liberación de citoquinas y otros mediadores pro inflamatorios. (42,229).

Particularmente el edema se ha asociado a la acción miotóxica de las fosfolipasas (PLA_2) sobre el músculo liso de los vasos linfáticos induciendo contracción y daño celular irreversible que conduce a edema local (230). Sin embargo, experimentos con veneno crudo de *B. jararaca* en presencia de inhibidores de metaloproteasas (1,10-phenanthroline-oPhe), serino proteasas (phenylmethanesulfonyl fluoride –PMSF) ó fosfolipasas A_2 (p-bromophenacyl-bromide p-BPB), permitieron establecer que las metaloproteasas tienen un papel más relevante que las serino proteasas ó fosfolipasas en las reacciones inflamatorias inducidas por el veneno (231).

El edema es producto de la acción de mediadores inflamatorios liberados o sintetizados en el curso del envenenamiento, estos mediadores inducen incrementos en la permeabilidad de los vasos (232; 233). La mayoría de las metaloproteasas descritas en venenos de serpientes son hemorrágicas; sin embargo existe un número creciente de reportes de metaloproteasas no hemorrágicas, muchas de las cuales tienen actividad fibrinolítica. Pertenecen a la clase P-I, poseen solo dominio

metaloproteasa. Es frecuente la caracterización enzimática de ellas, no así sus efectos patológicos.

A fin de determinar la posible participación de las Colombienasas en el edema característico del accidente por mordedura de *B. colombiensis*, se evaluó la actividad edematizante de las mismas. Se determinó que las Colombienasas indujeron edema muy discreto, 12,66% la Colombienasa-1 y 8,45% la Colombienasa-2, al inyectar 1,3 Dosis Edematizante Mínima (DEM) en el cojinete plantar de ratones. Estos resultados son comparables con los obtenidos con la BjussuMP-II de *B. jararacussu*, que mostró una pobre actividad edematígena con respecto al veneno crudo (118).

Trabajos realizados con otras metaloproteasas P-I han revelado resultados diferentes. Los ensayos con Leucurolysin-a (leuc-a), metaloproteasa no hemorrágica tipo P-I, demostraron que ésta incrementa la permeabilidad a nivel de capilares sanguíneos, induciendo prominente edema que contribuye en gran medida al efecto local observado después de un accidente por *B.leucurus* (234). Igualmente la Neuwiedasa, metaloproteasa de 22 kDa aislada del veneno *B. neuwiedi*, libre de actividad hemorrágica, cuando es inyectada en el músculo *gastrocnemius*, contribuye al daño local porque induce edema, infiltrado inflamatorio, miotoxicidad y degrada componentes de matriz extracelular (235). En contraste, ensayos realizados con BaP1, metaloproteasa tipo P-I proveniente de *B.asper*, inyectada también en músculo *gastrocnemius* de ratón, induce hemorragia moderada, mionecrosis, edema, así como infiltrado inflamatorio compuesto principalmente de leucocitos polimorfo nucleares y macrófagos acompañado de niveles séricos incrementados de citoquinas IL-1 β y IL-6, así como otros mediadores inflamatorios que incluyen eicosanoides y quimoquinas (221,236,237) . Igualmente la Porthidin- 1, metaloproteasa hemorrágica clase P-I aislada del veneno de *Porthidium lansbergii*, degrada fibronectina, gelatina, caseína, fibrinógeno, fibrina e induce prominente edema al ser inyectada en el cojinete plantar de ratones (206).

Nuestros resultados sugieren que la degradación proteolítica de los componentes de las membranas basales es un factor clave en la inducción del edema. Es poca la participación de las Colombienasas en el prominente edema

reportado en el accidente por mordedura de *B.colombiensis*. (137). Este edema debe estar asociado a las fosfolipasas y metaloproteasas hemorrágicas presentes en el veneno de *B. colombiensis*.

Los ensayos de inmunodifusión doble en gel mostraron un claro reconocimiento de la Colombienasa-1 por el suero antiofídico polivalente elaborado en la Facultad de Farmacia-UCV, presentándose como una banda de precipitación continua frente a los tres pozos contentivos de las tres diluciones empleadas. En contraste, con la Colombienasa-2 no fue así. Estos resultados sugieren que la Colombienasa-2 presenta determinantes antigénicos poco inmunogénicos o que su presencia en el veneno crudo, contra el cual se elabora el suero antiofídico, representa un porcentaje muy bajo (0,26%) incapaz de despertar una respuesta de anticuerpos. Conociendo la importante actividad fibrino(geno)lítica de esta Colombienasa, sería recomendable incorporarla al inóculo empleado en la inmunización de los animales para la producción del suero antiofídico.

Es importante destacar que las Colombienasas no tienen un papel preponderante en el daño local inducido por el veneno, pues en función de los presentes resultados estas carecen de actividades hemorrágica, miotóxica, edematígena; sin embargo por su alta actividad fibrino(geno)lítica estas metaloproteasas podrían ser exploradas como agentes trombolíticos ya que disuelven el coágulo de fibrina o impiden su formación, como es el caso de la fibrolasa, metaloproteasa fibrinolítica de 23 kDa aislada del veneno de *Agkistrodon contortrix contortrix*, la cual ya ha sido explorada en estudios preclínicos e investigaciones clínicas (190).

En el presente trabajo demostramos que la variación intraespecífica del veneno también ocurre entre especímenes individuales sin variación estacional o geográfica, dieta, hábitat o diferencias de edad, tal como lo proponen otros autores (192, 193, 202, 203, 238,239).

Es sabido que un tratamiento antiofídico es eficaz en la medida en la cual este pueda revertir la coagulopatía inducida por el veneno, la hemorragia, el shock

hipotensivo y cualquier otro signo de envenenamiento sistémico. Esta eficacia se logra solamente con antivenenos en cuya elaboración se haya tomado en cuenta la heterogeneidad inter e intra específica de la composición de los venenos (191).

Nuestros resultados refuerzan la importancia de emplear mezclas de venenos para la inmunización en la elaboración del antiveneno con la intención de garantizar un perfil de neutralización de toxinas más completo. Por esta razón es primordial establecer cuáles son las proteínas más tóxicas para dirigir hacia ellas la respuesta inmune. Acá cobra importancia la tendencia cada vez más marcada de trabajar con la venómica y antivenómica a fin de asegurar venenos con proteomas muy bien caracterizados, así como antivenenos que sean específicos para los elementos más tóxicos del veneno, como es el caso de muchas proteínas de bajo peso molecular, muy tóxicas, pero débilmente inmunogénicas de relevancia en el cuadro clínico del paciente.

Con el propósito de evaluar el potencial terapéutico de las Colombienasas, como agentes desfibrinantes, anticoagulantes e incluso como adyuvantes en terapia trombolítica, en este trabajo se ha iniciado el estudio del potencial citotóxico de estas enzimas, empleando un modelo celular de monocapas de mioblastos.

4.- EFECTO TÓXICO DE LAS COLOMBIENASAS SOBRE MONOCAPAS DE MIOBLASTOS EN CULTIVO EN GOTA PENDIENTE A PARTIR DE TEJIDO MUSCULAR.

Los venenos bothrópicos son mezclas altamente complejas de enzimas y pequeños péptidos con muy diversas actividades, entre las cuales se han descrito la miotóxica, la hemorrágica, la procoagulante, la fibrinolítica, entre otras. Dicho complejo proteico actúa sobre un amplio espectro de órganos y tejidos, causando, además de múltiples efectos locales y sistémicos, graves cuadros de necrosis tisular, daño endotelial vascular y trastornos de coagulación (131, 7). En la actualidad, existen importantes reportes en relación a la etiopatogénesis de la hemorragia y la mionecrosis (132), además de numerosas evidencias que describen al choque

cardiovascular como causa frecuente de muerte, luego del accidente por mordedura de serpientes del genero *Bothrops* (131, 133, 134, 135).

En el caso de envenenamiento por *Bothrops colombiensis*, a pesar de la importancia médica en Venezuela, la literatura sobre la composición y actividades biológicas de su veneno es escasa. Específicamente estudios relacionados con la citotoxicidad o cardiotoxicidad son inexistentes. Sin embargo, reportes claros han descrito que los venenos bothrópicos son poderosos agentes mionecróticos y que su efecto citolítico puede ser atribuido a la acción directa y local de los componentes del veneno sobre la fibra muscular. Estos venenos contienen componentes citotóxicos y enzimáticos que podrían ser comparables con otras miotoxinas o cardiotoxinas de venenos elapídicos y crotálicos (132, 138,139). A pesar de la información antes descrita, la toxicidad cardíaca y los posibles mecanismos de acción vinculados a estos venenos y en particular los vinculados al veneno de *B. colombiensis*, no están aun claramente establecidos.

En materia de estudio y evaluación *in vivo* de toxinas el modelo animal, particularmente el murino, ha sido ampliamente empleado por ser el único que permite valorar en tiempo real las actividades biológicas de dichas toxinas, así como la letalidad o la eficacia de antivenenos; sin embargo las presiones de comités internacionales de Bioética han obligado a disminuir el número de animales de experimentación y a eliminar el excesivo sufrimiento de los mismos.

Ante esta necesidad surge el empleo de embriones de pollo para la evaluación de antivenenos. Las principales características que han hecho al embrión de pollo un excelente modelo experimental son: su fácil obtención y mantenimiento en condiciones de laboratorio, la obtención rápida de respuestas celulares, su rápido desarrollo embrionario (240) y una buena correlación con el modelo murino (241)

Entre los objetivos de la presente investigación estaba el evaluar “*in vitro*”, características de la acción miotóxica del veneno crudo de *B. colombiensis* y de las señales de daño celular inducido por las fracciones con actividad fibrinolítica; F2, F3, Colombienasa-1 y Colombienasa-2, provenientes del veneno de *B.*

colombiensis. La acción mitotóxica fue evaluada a través del uso de cultivos primarios en Gota pendiente de mioblastos cardíacos y esqueléticos. Estos cultivos generan monocapas de células confluentes de 24 horas a partir del explante de tejido en oposición a la fuerza de gravedad. Las células obtenidas permiten estudiar cambios a nivel celular y subcelular. A nivel celular los cambios morfológicos resultan de fácil visualización y a nivel subcelular, el uso de sondas fluorescentes permite el marcaje de organelos. Particularmente, ha sido ampliamente utilizado el uso de fluorocromo catiónico lipofílico, tipo DiOC₁ (3), para ensayar la funcionalidad de las mitocondrias en diversos escenarios biológicos que incluyen diferenciación, apoptosis, envejecimiento y enfermedad cardíaca (140). Esta sonda permea a través de la membrana plasmática y se acumula específicamente en las mitocondrias de la célula viva, en proporción a la magnitud de su potencial de membrana (140).

El presente trabajo constituye el primer reporte donde se muestra claramente que el tratamiento agudo con veneno crudo de *B. colombiensis* y su fracción fibrinolítica hemorrágica F3, ejerce efectos tóxicos sobre mioblastos de embrión de pollo en cultivo, como lo evidencian los cambios en la monocapa celular así como alteraciones en la morfología celular y subcelular. En contraste, las fracciones fibrino(geno)líticas no hemorrágicas, las Colombienasa-1 y Colombienasa-2 provenientes de *B. colombiensis* no indujeron estos cambios.

A través de los ensayos *in vitro* fue posible establecer los criterios morfológicos de daño celular. Los daños celulares se observaron tanto en la monocapa como en los mioblastos que la conformaban. Los efectos incluyeron reducción de la adhesión celular al sustrato, incremento de espacios intercelulares en la monocapa, pérdida de la organización, viéndose comprometida la viabilidad celular.

Se demostraron cambios morfológicos drásticos a nivel celular que incluyeron disminución de áreas citoplasmáticas, condensación del citoplasma, aparición de formas celulares redondeadas, presencia de estructuras filamentosas, así como cambios en el patrón mitocondrial en lo relativo a cambios subcelulares. Las alteraciones nucleares más destacadas fueron condensación del núcleo y

fragmentación del material nuclear. Otros autores empleando monocapas de células de epitelio renal canino (MDCK) han mostrado resultados similares al someter las monocapas a tratamiento agudo con venenos crudos de *B. moojeni*, *B. alternatus* y *Lachesis muta muta*, interpretando la emisión de estructuras filamentosas como un intento de reorganización de las células a fin de restablecer la integridad de la monocapa parcialmente perdida al desprenderse y morir las células que la conforman (242, 243, 244).

Con base a los criterios de daño celular antes mencionados, se calculó la CL_{50} a partir de una prueba de valoración biológica del todo o nada, donde la respuesta cuantificada fue la muerte celular como máxima expresión de daño, vinculada a células redondeadas, entendiendo este parámetro como la Concentración Letal 50, la cual representa la cantidad de veneno que al ser puesta en contacto directo con los mioblastos en cultivo induce la muerte celular del 50% de la población, en 1 hora de exposición y a 37°C.

Los datos muestran que el veneno crudo de *B. colombiensis* posee un claro efecto citotóxico dependiente de la dosis ajustándose a una curva dosis-respuesta sigmoidea característica de eventos biológicos, con una CL_{50} de 40,38 µg/mL para el veneno crudo, sobre mioblastos cardiacos. Al comparar esta CL_{50} con los valores reportados para *B. alternatus* (243) encontramos que la exposición de células MDCK, durante 3 horas, a 10 µg de veneno crudo, pueden disminuir la población celular en un 65%, lo cual representa 1,9 veces menos potente que el veneno crudo de *B. colombiensis*. Es importante tener en cuenta que se trata de tipos celulares diferentes.

Los cambios morfológicos inducidos por el veneno crudo sobre los mioblastos cardiacos siguieron una secuencia temporal que incluyó disrupción de la monocapa, incremento de los espacios intercelulares, disminución de áreas citoplasmáticas, condensación del núcleo y el citoplasma, aparición de formas celulares redondeadas presencia de estructuras filamentosas, fragmentación del material nuclear y cambios en el patrón mitocondrial. Estos cambios morfológicos observados se han asociado a muerte celular por apoptosis.

La apoptosis se ha definido como el proceso de muerte celular caracterizado por la condensación de la cromatina, fragmentación del ADN y activación de las caspasas (245). El proceso apoptótico puede ser iniciado por diferentes estímulos, tales como activación de receptores en la membrana celular (por ejemplo Fas/APO-1) conocida como vía extrínseca (246), o vía organelos intracelulares, tales como las mitocondrias, que pueden, bajo ciertas condiciones liberar factores apoptóticos como citocromo c y activar la cascada de las caspasas, conocida como vía intrínseca (247).

Nuestros resultados se correlacionan con lo reportado por otros autores, quienes han demostrado que los venenos ofídicos, particularmente venenos bothrópicos, poseen proteínas tales como, metaloproteasas, fosfolipasas, L-aminoacidoxidasas, desintegrinas, entre otras, que son capaces de desencadenar la apoptosis en células normales y cancerígenas (248, 249, 250, 251).

De igual forma, los cultivos de músculo esquelético tratados con la fracción fibrinolítica-hemorrágica F3, mostraron alteraciones relacionadas con incremento en los espacios intercelulares, desprendimiento del sustrato con la consecuente pérdida de la organización fibrilar característica. Con base en criterio morfológico las señales de daño celular inducido por esta fracción también parecen estar asociados a muerte celular por apoptosis.

Diversos autores han reportado en cultivos de células endoteliales, inducción de apoptosis por metaloproteasas de venenos de serpientes y esta apoptosis está vinculada a la actividad proteolítica, aun cuando no es claro el mecanismo por el cual esto ocurre (252, 253). En nuestro caso se emplearon exposiciones agudas y concentraciones comprendidas entre 50 y 150 microgramos con cultivos celulares provenientes de explantes de tejido muscular de embrión de pollo, modelo no evaluado hasta el presente, donde la viabilidad celular se garantizó por el monitoreo permanente de la actividad contráctil de las células de la monocapa de cultivo.

El tratamiento agudo con el veneno crudo pudo inducir un desprendimiento de las células de su sustrato, con inducción de apoptosis en solo 60 minutos de

exposición. El anclaje de las células a la matriz extracelular se ha asociado con su supervivencia y el desprendimiento de las células del sustrato podría estar relacionado a la acción proteolítica del veneno (254).

Por otro lado, algunos estudios bioquímicos han demostrado claramente que las toxinas hemorrágicas aisladas de venenos de serpientes son metaloproteasas dependientes de Zinc, capaces de degradar enzimáticamente componentes de membranas basales y de matriz extracelular (40; 43). Por esta razón la fracción F3 en su condición de metaloproteasa hemorrágica, podría estar provocando el desprendimiento del sustrato con la consiguiente disgregación de la organización fibrilar que caracteriza el tejido muscular. Brenes y col., 2010 (255), haciendo uso de la toxina BaP1, metaloproteasa tipo P-I proveniente de veneno de *B. asper*, establecen que no existe correlación entre la habilidad de BaP1 para inducir pérdida de adhesión al sustrato y efecto citotóxico, ya que registran 50% de citotoxicidad empleando concentraciones de toxina (3-6 µg/mL) que no inducen pérdida de adherencia. Sin embargo en el caso que nos ocupa, ambos efectos ocurren simultáneamente.

Por otro lado, Calvete y col., 2009 (191), al estudiar el proteoma del veneno de *B.colombiensis* establecen, como producto del fraccionamiento de este por HPLC de fase reversa, la existencia de al menos 20 proteínas diferentes, agrupadas en 8 familias, a saber, 2 grandes familias representadas por metaloproteasas, un 42% y PLA2s, 44% del total de proteínas, el 14% restante lo constituyen 6 familias menores donde cabe destacar las L-aminoacidoxidasas (LAAOS).

Girón y col., 2008, (136) muestran evidencias bioquímicas de que en el veneno crudo de *B. colombiensis* y fracciones obtenidas por exclusión molecular, SI y SII, contienen metaloproteasas del tipo PIII y PI respectivamente, asociadas a una alta actividad hemorrágica y baja actividad fibrinolítica las PIII y al contrario en el caso de las PI. Teniendo en cuenta lo que se conoce sobre la composición del veneno de *B. colombiensis*, se podría sugerir, que en el presente trabajo, las señales de daño observadas en cultivo primario de mioblastos expuestos al veneno crudo, representan la sinergia de los efectos de metaloproteasas, PLA2s y LAAOs

presentes en este veneno. El aparente proceso apoptótico desencadenado podría estar asociado a cualquiera de las vías de activación de caspasas, dada la compleja composición del veneno de *B.colombiensis*.

Al emplear la sonda marcadora selectiva de mitocondria DiOC₁ (3), en el caso de los miocitos cardiacos tratados con veneno crudo, presentaron una estructura celular colapsada, con intensa fluorescencia difusa, estructuras mitocondriales y área perinuclear carente de definición. Los resultados permiten sugerir que dado el cambio observado en el patrón de distribución de la fluorescencia inducido por el veneno crudo en los miocitos en cultivo, este podría estar promoviendo la activación de factores mitocondriales que desembocan en muerte celular. El veneno de *B. colombiensis* puede estar induciendo señales de daño tisular y celular vinculadas a procesos apoptóticos producto de la acción sinérgica de sus múltiples componentes.

En contraste, la respuesta de los mioblastos a la exposición aguda de las Colombienasa-1 y Colombienasa-2, fue similar al control sin tratamiento, mostrando un intenso brillo de fluorescencia emitida en verde, resaltando la estructura convencional de las mitocondrias con forma de bastones alargados por todo el citoplasma y en el área peri-nuclear. Estas diferencias podrían explicarse con base en el hecho de que estas fracciones purificadas por tratarse de metaloproteasas tipo P-I, carecen de dominios desintegrina y dominio rico en cisteína, los cuales parecen importantes para la inducción de la apoptosis, como lo demuestran Tanjoni y col., 2005 (256), al incubar células endoteliales con Jararragina, metaloproteasa tipo P-III de 52 kDa aislada de veneno de *B.jararaca*, esta mostró efecto proapoptótico por activación de la pro-caspasa-3 y alteraciones en el ratio Bax/Bcl-xL. Este efecto fue acompañado de disminución de la viabilidad celular y pérdida de la adhesión celular. Esto nos permite pensar que las Colombienasa-1 y Colombienasa-2, altamente fibrino(geno)líticas, no parecen comprometidas en la citotoxicidad del veneno de *B. colombiensis*.

En resumen, las Colombienasa -1 y Colombienasa-2 aisladas del veneno de *B. colombiensis*, en su condición de metaloproteasas con actividad fibrino(geno)lítica,

libres de actividad hemorrágica y citotóxica parecen buenas candidatas a ser empleadas con fines terapéuticos.

La Tablas 14 y 15 resumen la caracterización de los venenos bothrópicos separados por especie y localidad y la caracterización bioquímica y biológica de las Colombienasas 1 y 2 respectivamente.

VII. CONCLUSIONES

1. Nuestros resultados representan la primera caracterización bioquímica y biológica de venenos de serpientes del género *Bothrops* provenientes de diversas especies (*atrox*, *venezuelensis* y *colombiensis*) y localidades geográficas de Venezuela.
2. Los perfiles cromatográficos y electroforéticos de los venenos *Bothrópicos* estudiados muestran diferencias en la composición y concentración de componentes activos, que deben estar relacionadas con la diversidad de enzimas tipo metaloproteasas, serino proteasas y fosfolipasas A_2 asociadas con las manifestaciones clínicas.
3. El veneno de *B. atrox*-Parguasa fue el más letal y el de *B. colombiensis*- El Guapo el menos letal; asimismo el veneno de *B. venezuelensis*-Baruta fue el más hemorrágico y de *B. colombiensis* –Caucagua el menos hemorrágico.
4. Las actividades relacionadas con la hemostasia evidencian una actividad coagulante más elevada en el veneno de *B. venezuelensis*- Ávila y menor el *B. colombiensis*-Caucagua. Una actividad fibrinolítica más elevada en el veneno de *B. colombiensis*-Caucagua y menor en *B. atrox*- Serrania del Cuao.

5. Con base en la actividad fibrinolítica y la disponibilidad, los de *B. colombiensis* (El Guapo y Caucaagua) fueron escogidos para aislar esta actividad. El veneno de El Guapo presenta la mayor actividad hemorrágica, coagulante y fibrinolítica asociada a enzimas tipo serino-proteasas. En contraste el veneno de Caucaagua presentó la mayor actividad letal, además de la fibrinolítica en placas de fibrina y fibrinogenolítica asociadas a enzimas tipo metaloproteasas, las cuales pueden tener grandes implicaciones en manifestaciones hemorrágicas asociadas a la letalidad.
6. Del veneno de *B. colombiensis* de Caucaagua se aislaron dos metaloproteasas, Colombienasa-1 y Colombienasa-2, con masas moleculares de 23,074 y 23,078 kDa y puntos isoeléctricos de 6,0 y 6,2 respectivamente. Presentan una actividad fibrinogenolítica que se asocia a α fibrinogenasas, Esta actividad fue máxima a pHs entre 7 y 9 y a 25 °C y fue inestable a 56°C. La secuencia de los fragmentos N-terminal demostró una gran homología entre las Colombienasas y metaloproteasas dependientes de zinc, particularmente con α -fibrinogenasas.
7. Estas Colombienasas no presentan actividades hemorrágica, coagulante, hemolítica, proteolítica sobre proteínas de matriz extracelular o que alteren la agregación de plaquetas, o que fuesen citotóxicas. Debido a la elevada actividad fibrino(geno)lítica que presentan, tienen un potencial terapéutico como agentes trombolíticos y/o desfibrinantes.
8. En el presente trabajo se demuestran diferencias inter e intra-específicas entre los venenos de *Bothrops* venezolanos, que pueden estar asociadas a variaciones: estacionales o geográficas, dieta, sexo, hábitat o diferencias de edad. Las diferencias en la composición de los venenos implican que la mezcla de inmunización para producir el antisuero debe ser representativa de la especie, lo que en la práctica supone realizar un muestreo de venenos de diferentes individuos, de diferentes edades, sexos y procedencias; así como establecer cuáles son las proteínas más tóxicas para dirigir hacia ellas la respuesta inmune.

AGRADECIMIENTOS

- A la Universidad Central de Venezuela por darme esta nueva oportunidad.
- A mi tutor, el Dr. Alexis Rodríguez por haberme brindado su apoyo, su inquebrantable optimismo, su valiosísima experiencia, su paciencia, su gran calidad humana.
- A la Dra. Belsy Guerrero por la generosidad y solidaridad mostradas al compartir sus vastos conocimientos y su valioso tiempo.
- En especial quiero agradecer al maravilloso equipo humano del Laboratorio de Fisiopatología del Centro de Medicina Experimental del Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC), mis compañeros: Ana María Salazar, Zoila Carvajal, Carlos Ibarra y Amparo Gil, quienes desinteresadamente con su experiencia, recursos, paciencia, y esfuerzo aliviaron el día a día de este largo camino.
- Al Dr. Héctor Scannone y a la TSU Irma Fernández por brindarme su preciado tiempo y conocimientos.
- A la Sección de Inmunoquímica del Instituto de Medicina Tropical de la Facultad de Medicina de la Universidad Central de Venezuela (UCV) donde desarrollé parte de este proyecto.
- Al Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC) por asumirme como estudiante tesista y por financiar parte de este trabajo.
- Al Dr. Marco Álvarez y la Lic. Lourdes Perdomo de la Sección de Microscopía Electrónica del Instituto Anatómico “José Izquierdo” de la Facultad de Medicina de la Universidad Central de Venezuela (UCV) por brindarme generosamente su asesoramiento y experiencia.
- Al “Natural Toxins Research Center”, Texas A&M University-Kingsville, Kingsville, TX 78363, USA, especialmente a la Dra. Elda Sánchez por su valioso y oportuno apoyo.
- Al Fondo Nacional de Ciencia y Tecnología (FONACIT) por haber financiado la realización de esta Tesis Doctoral como parte del proyecto PG-2005000400.

VIII. BIBLIOGRAFIA

1. Calvete JJ, Sanz L, Angulo Y, Lomonte B, Gutiérrez JM Venoms, venomics, antivenomics. FEBS Lett 2009; 583:1736-1743.
2. Lancini, V. *Serpientes de Venezuela*. Segunda edición. Ernesto Armitano, Editor, Venezuela.1986.
3. The Reptile Database [Página Web en línea] Disponible: <http://www.reptile-database.org> [Consulta: 2011, Abril].
4. Rengifo, C, Rodríguez-Acosta, F. Serpientes, Veneno y Tratamiento Médico en Venezuela. Fondo Editorial de la Facultad de Medicina. Universidad Central de Venezuela. Caracas; 2005.
5. Navarrete LF, López-Johnston JC, Blanco A. Guía de la Serpientes de Venezuela. Biología, venenos, conservación y checklist. Gráficas Lauki. Caracas; 2006.
6. Serpientes de Venezuela. [Página Web en línea]. Disponible: <http://serpientesdevenezuela.ucv.ve> [Consulta: 2010, Enero].
7. Chippaux J P. Snake-bites: appraisal of the global situation. Bull WHO 1998; 76: 515–524.
8. Chippaux J. P. (2008a). Estimating the global burden of snakebite can to help to improve management. PloS Medicine. 5: e221.doi:10.1371/journal. pmed.0050221.
9. Kasturiratne A., Wickremasinghe A., De Silva N., Gunawardena N., Pathmeswaran A., Premaratna R. *et al*. The global burden of snakebite: A literature analysis and modelling based on regional estimates of envenoming and deaths. PloS Medicine 2008. 5: e218. doi: 10.1371/journal. Pmed.0050218.Trop. 68: 334-339.
10. Chippaux J. P. (2008b). Incidence et mortalité par animaux venimeux dans les pays tropicaux. Med.

- 11.Bochner R. & Fiszon J. (2008). Profil des accidents par des animaux venimeux au Brésil, 2001 à 2006. Collection Rencontres en Toxinologie. 6:119-122 .Documento en línea: [http://sfet.asso.fr/images/stories/SFET/pdf/](http://sfet.asso.fr/images/stories/SFET/pdf/EBook-RT16-2008-signets.pdf) EBook-RT16-2008-signets.pdf (Consultado: 2012, Julio 20).
- 12.Anuario de Mortalidad del Ministerio del Poder Popular para la Salud, Año 2008 [Página Web en línea]. Disponible: <http://www.mpps.gob.ve> [Consulta: 2011, Diciembre].
- 13.Campbell JA, Lamar W W. The Venomous Reptiles of Latin America. Comstock Publishing Associates. 1989, pp.168; 172-178; 180-224.
- 14.Fuentes, O, Rodríguez-Acosta, A. Sobre los géneros *Bothriechis*, *Bothriopsis*, *Bothrops* y *Porthidium* (Serpentes: *Crotalidae*) existentes en Venezuela. Claves para su identificación de interés biomédico. Acta Biol Venez 1997; 17: 31-38.
- 15.Rodríguez A, Mondolfi A, Orihuela R, Aguilar A. ¿Qué hacer frente a un accidente ofídico? Venediciones.C.A. Caracas- Venezuela. 1995.
- 16.Instituto de Investigación Clodomiro Picado. [Página Web en línea]. Disponible: <http://cariari.ucr.ac.cr> [Consulta: 2009, Febrero].
17. Kamiguti A, Cardoso J L C. Haemostatic changes caused by the venoms of South American snakes. Toxicon 1989; 27: 955-963
- 18.Kamiguti AS, Sano-Martins I S. South American snake venoms affecting haemostasis. J.Toxicol.-Toxin Reviews 1995; 14: 359-374.
- 19.Russel F E, Walter FG, Bey T A, Fernández M C Snakes and snakebite in Central América. Review article. Toxicon 1997; 35: 1462-1522.
- 20.Meier J, Stocker K. Effects of snake venoms on hemostasis. Critical Rev Toxicol 1991; 21: 171-182.
- 21.Harvey AL Twenty years of dendrotoxins. Toxicon 2001; 39:15-26.

22. Markland F S. Snake venoms and the hemostatic system. *Toxicon* 1998; 36: 1749-1800.
23. Colman R W, Clowes A W, George J N, Goldhaber S Z, Marder V J. Overview of Hemostasis. En: Colman R W, Clowes A W, Goldhaber S Z, Marder V J, George J N. *Hemostasis and Thrombosis: Basic Principles and Clinical Practice*. Editorial Lippincott Williams & Wilkins. 2006. 5th Edition. Cap. 1.
24. Hemostasis Systems [Página Web en línea]. Disponible: Haemostasis.se Webmaster Lars Faxälv. Copyright. © 2011 [Consulta: 2011, Mayo].
25. Cramer E M Fontenay M Platelets: Structure Related to Function. En: Colman R W, Clowes A W, Goldhaber S Z, Marder V J, George J N *Hemostasis and Thrombosis: Basic Principles and Clinical Practice*. Editorial Lippincott Williams & Wilkins. 2006. 5th Edition. Cap. 26.
26. Hoffman M, Monroe DM. A cell-based model of hemostasis. *Thromb Haemost* 2001; 85:958-965.
27. Hoffman M. A cell-based model of coagulation and the role of factor VIIIa. *Blood Rev* 2003; 17 Suppl 1:S1-5.
28. Hantgan, R y Lord, S. Fibrinogen Structure and Physiology. En: Colman R W, Clowes A W, Goldhaber S Z, Marder V J, George J N. *Hemostasis and Thrombosis: Basic Principles and Clinical Practice*. Editorial Lippincott Williams & Wilkins. 2006. 5th Edition. Cap 16
29. Nesheim ME, Leurs J, Dirk F. Hendriks DF. Thrombin-Activatable Fibrinolysis Inhibitor AKA Procarboxypeptidase U. En :Colman R W, Clowes A W, Goldhaber S Z, Marder V J, George J N. *Hemostasis and Thrombosis: Basic Principles and Clinical Practice*. Editorial Lippincott Williams & Wilkins. 2006. 5th Edition. Cap. 20
30. Booth N, Bachmann F. Plasminogen–Plasmin System. En: Colman R W, Clowes A W, Goldhaber S Z, Marder V J, George J N. *Hemostasis and Thrombosis: Basic Principles and Clinical Practice*. Editorial Lippincott Williams & Wilkins. 2006. 5th Edition. Cap. 18.

31. Medved L, Nieuwenhuizen W. Molecular mechanisms of initiation of fibrinolysis by fibrin. *Thromb Haemost* 2003; 89:409-19.
32. Rijken DC, Lijnen HR. New insights into the molecular mechanisms of the fibrinolytic system. *J Thromb Haemost*. 2009; 7:4-13.
33. Hoover-Plow J. Does plasmin have anticoagulant activity? *Vasc Health Risk Manag* 2010; 6:199-205.
34. Elhasade AS, Perkowska A, Paczek L, Szmidt J, Gaciong Z. Physiology of fibrinolysis. *Med Sci Monit* 1998; 4: 555-563.
35. Cesarman-Maus G, Hajjar KA. Molecular mechanisms of fibrinolysis. *Br J Haematol* 2005; 129:307-21.
36. Nesheim M, Wang W, Boffa M, Nagashima M, Morser J, Bajzar L. Thrombin, thrombomodulin and TAFI in the molecular link between coagulation and fibrinolysis. *Thromb Haemost* 1997; 78:386-391.
37. Braud S, Bon C, Wisner A. Snake venoms proteins acting on hemostasis. *Biochimie* 2000; 82: 851-859.
38. Larrèché S, Mion G, Goyffon M. Haemostasis disorders caused by snake venoms. *Ann Fr Anesth Reanim* 2008; 27:302-309.
39. Sajevic T, Leonardi A, Križaj I. Haemostatically active proteins in snake venoms. *Toxicon* 2011; 57:627-645.
40. Bjarnason JB, Fox JW. Hemorrhagic toxins from snake venoms. *J. Toxicol. Toxin. Reviews* 1988-1989, 7:121-209.
41. Fox JW, Serrano SM. Structural considerations of the snake venom metalloproteinases, key members of the M12 reprotolysin family of metalloproteinases. *Toxicon* 2005b; 45:969-985.
42. Gutiérrez JM, Rucavado A. Snake venom metalloproteinases: their role in the pathogenesis of local tissue damage. *Biochimie* 2000; 82:841-50.

43. Bjarnason JB, Fox JW. Hemorrhagic metalloproteinases from snake venoms. *Pharmacol Ther* 1994; 62:325-72.
44. Ramos O H P, Selistre-de-Araujo H.S. Comparative analysis of the catalytic domain of hemorrhagic and non-hemorrhagic snake venom metalloproteinases using bioinformatic tools. *Toxicon* 2004; 44: 529–538.
45. Fox JW, Serrano SM. Timeline of key events in snake venom metalloproteinase research. *J Proteomics* 2009; 72:200-209.
46. Aguilar I, Girón ME, Rodríguez-Acosta A. Purification and characterisation of a haemorrhagic fraction from the venom of the Uracoan rattlesnake *Crotalus vegrandis*. *Biochim Biophys Acta* 2001; 1548:57-65.
47. Paine MJ, Desmond HP, Theakston RD, Crampton JM. Purification, cloning, and molecular characterization of a high molecular weight hemorrhagic metalloprotease, jararhagin, from *Bothrops jararaca* venom. Insights into the disintegrin gene family. *J Biol Chem* 1992; 267:22869-22876.
48. Maruyama M, Tanigawa M, Sugiki M, Yoshida E, Mihara H. Purification and characterization of low molecular weight fibrinolytic/hemorrhagic enzymes from snake (*Bothrops jararaca*) venom. *Enzyme Protein* 1993; 47:124-135.
49. Muniz JR, Ambrosio AL, Selistre-de-Araujo HS, Cominetti MR, Moura-da-Silva AM, Oliva G *et al*. The three-dimensional structure of bothropasin, the main hemorrhagic factor from *Bothrops jararaca* venom: insights for a new classification of snake venom metalloprotease subgroups. *Toxicon* 2008; 52:807-816.
50. Serrano SM, Sampaio CA, Mandelbaum FR. Basic proteinases from *Bothrops moojeni* (caissaca) venom--II. Isolation of the metalloproteinase MPB. Comparison of the proteolytic activity on natural substrates by MPB, MSP 1 and MSP 2. *Toxicon* 1993; 31:483-492.
51. Borkow G, Gutiérrez JM, Ovadía M. Isolation and characterization of synergistic hemorrhagins from the venom of the snake *Bothrops asper*. *Toxicon* 1993; 31:1137-50.

52. Gutiérrez JM, Romero M, Díaz C, Borkow G, Ovadla M. Isolation and characterization of a metalloproteinase with weak hemorrhagic activity from the venom of the snake *Bothrops asper* (Terciopelo). *Toxicon* 1995; 3: 19–29.
53. Franceschi A, Rucavado A, Mora N, Gutiérrez JM. Purification and characterization of BaH4, a hemorrhagic metalloproteinase from the venom of the snake *Bothrops asper*. *Toxicon* 2000; 38:63-77.
54. Pantigoso C, Escobar E, Malaga O, Yarleque A. Isolation and some properties of the proteinase atroxin from the venom of the snake *Bothrops atrox*. *Acta Cient Venez* 1996; 47:67-73.
55. Gay CC, Leiva LC, Maruñak S, Teibler P, Acosta de Pérez O. Proteolytic, edematogenic and myotoxic activities of a hemorrhagic metalloproteinase isolated from *Bothrops alternatus* venom. *Toxicon* 2005; 46:546-554.
56. Mazzi M, Marcussi S, Guilherme B. C, Stábelic R G, Joaõ J. F, Tíclia F *et al.* A new hemorrhagic metalloprotease from *Bothrops jararacussu* snake venom: isolation and biochemical characterization. *Toxicon* 2004; 44: 215–223.
57. Stroka A, Donato JL, Bon C, Hyslop S, de Araujo AL. Purification and characterization of a hemorrhagic metalloproteinase from *Bothrops lanceolatus* (Fer-de-lance) snake venom. *Toxicon* 2005; 45:411-20.
58. Sánchez EF, Gabriel LM, Gontijo S, Gremski LH, Veiga SS, Evangelista KS *et al.* Structural and functional characterization of a P-III metalloproteinase, leucurolysin-B, from *Bothrops leucurus* venom. *Biochim. Biophys Acta* 2007; 468: 193–204.
59. Smith SV, Brinkhous KM. Inventory of exogenous platelet-aggregating agent derived from venoms. *Thromb Haemost* 1991; 66:259-63.
60. Niewiarowski S, Kirby EP, Brudzynski TM, Stocker K. Thrombocytin, a serine protease from *Bothrops atrox* venom. 2. Interaction with platelets and plasma-clotting factors. *Biochemistry* 1979; 18:3570-3577.
61. Zuzel, M. Toxicological and biological importance of snake venom metalloproteinase and disintegrins. *Toxicon* 1999; 37: 261.270

62. Calvete JJ, Marcinkiewicz C, Monleón D, Esteve V, Celda B, Juárez P, *et al.* Snake venom disintegrins: evolution of structure and function. *Toxicon* 2005; 45:1063-1074.
63. Moura-da-Silva AM, Ramos OH, Baldo C, Niland S, Hansen U, Ventura JS *et al.* Collagen binding is a key factor for the hemorrhagic activity of snake venom metalloproteinases. *Biochimie* 2008; 90:484-492.
64. Huang TF, Holt JC, Lukasiewicz H, Niewiarowski S Trigramin. A low molecular weight peptide inhibiting fibrinogen interaction with platelet receptors expressed on glycoprotein IIb-IIIa complex. *J Biol Chem* 1987; 262:16157-16163.
65. Kamiguti AS, Cardoso JL, Theakston RD, Sano-Martins IS, Hutton RA, Rugman FP *et al.* Coagulopathy and haemorrhage in human victims of *Bothrops jararaca* envenoming in Brazil. *Toxicon* 1991; 29:961– 972.
66. Petretski JH, Kanashiro M, Silva CP, Alves EW, Kipnis TL. Two related thrombin-like enzymes present in *Bothrops atrox* venom. *Braz J Med Biol Res* 2000; 33:1293-1300.
67. Da Silva M, Lucena S, Aguilar I, Rodríguez-Acosta A, Salazar AM, Sánchez EE, Girón ME *et al.* Anti-platelet effect of cumastatin 1, a disintegrin isolated from venom of South American *Crotalus rattlesnake*. *Thromb Res.* 2009; 123:731-739.
68. Sánchez EE, Rodríguez-Acosta A, Palomar R, Lucena SE, Bashir S, Soto JG *et al.* 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* 2009; 83:271-279.
69. Kirby E P, Niewiarowsky S, Stocker K, Kettner C, Shaw E, Brudzynsky T M. Thrombocytin, a serine protease from *Bothrops atrox* venom. Purification and characterization of the enzyme. *Biochemistry* 1979; 18: 3564-3570.
70. Hofmann H, Bon C. Blood coagulation induced by the venom of *Bothrops atrox*. Identification, purification and properties of two factor X activators. *Biochemistry* 1987; 26: 780-787.

71. Maruyama M, Kamiguti AS, Tomy SC, Antonio LC, Sugiki M, Mihara H. Prothrombin and factor X activating properties of *Bothrops erythromelas* venom. *Ann Trop Med Parasitol* 1992; 86:549-556.
72. Loria GD, Rucavado A, Kamiguti AS, Theakston RD, Fox JW, Alape A *et al.* Characterization of 'basparin A,' a prothrombin-activating metalloproteinase, from the venom of the snake *Bothrops asper* that inhibits platelet aggregation and induces defibrination and thrombosis. *Arch Biochem Biophys* 2003; 418: 13-24.
73. Kini RM. Anticoagulant proteins from snake venoms: structure, function and mechanism. *Biochem J* 2006; 397: 377-387.
74. Govers-Riemslog JW, Knapen MJ, Tans G, Zwaal RF, Rosing J. Structural and functional characterization of a prothrombin activator from the venom of *Bothrops neuwiedi*. : *Biochim Biophys Acta* 1987, 916:388-401.
75. Silva MB, Schattner M, Ramos CR, Junqueira-de-Azevedo IL, Guarnieri MC, Lazzari MA *et al.* A prothrombin activator from *Bothrops erythromelas* (jararaca-da-seca) snake venom: characterization and molecular cloning. *Biochem J* 2003, 369:129-139.
76. Berger M, Pinto AF, Guimarães JA. Purification and functional characterization of bothrojaractivase, a prothrombin-activating metalloproteinase isolated from *Bothrops jararaca* snake venom. *Toxicon* 2008; 51:488-501.
77. Senis YA, Kim PY, Fuller GLJ, Garcia A, Prabhakar S, Wilkinson MC *et al.* Isolation and characterization of cotiaractivase, a novel low molecular weight prothrombin activator from the venom of *Bothrops cotiara*. *Biochim Biophys Acta* 2006; 1764: 863–871.
78. Modesto JC, Junqueira-de-Azevedo IL, Neves-Ferreira AG, Fritzen M, Oliva ML, Ho PL, Perales J *et al.* AM. Insularinase A, a prothrombin activator from *Bothrops insularis* venom, is a metalloprotease derived from a gene encoding protease and disintegrin domains. *Biol Chem* 2005; 386:589-600.
79. Holleman WH, Weiss LJ. The thrombin-like enzyme from *Bothrops atrox* snake venom. Properties of the enzyme purified by affinity

chromatography on p-aminobenzamidine-substituted agarose. J Biol Chem 1976; 251:1663-1669.

80. Cavinato RA, Remold H, Kipnis TL. Purification and variability in thrombin-like activity of *Bothrops atrox* venom from different geographic regions. Toxicon 1998; 36:257-267.
81. Stocker K, Barlow GH. The coagulant enzyme from *Bothrops atrox* venom (Batroxobin). Methods Enzymol 1976; 45, 214-233.
82. Aragón F, Gubensek F. *Bothrops asper* venom from the Atlantic and Pacific zones of Costa Rica. Toxicon 1981; 19:797-805.
83. Pérez AV, Rucavado A, Sanz L, Calvete JJ, Gutiérrez JM. Isolation and characterization of a serine proteinase with thrombin-like activity from the venom of the snake *Bothrops asper*. Braz J Med Biol Res 2008; 41:12-17.
84. Gabrijelcic D, Drujan B, Gubensek F. Coagulant proteinase from *Bothrops colombiensis* venom. Toxicon 1982; 20:275-278.
85. Selistre HS, Giglio JR. Isolation and characterization of a thrombin-like enzyme from the venom of the snake *Bothrops insularis* (jararaca ilhoa). Toxicon 1987; 25:1135-1144.
86. Nishida S, Fujimura Y, Miura S, Ozaki Y, Usami Y, Suzuki M *et al.*. Purification and characterization of bothrombin, a fibrinogen-clotting serine protease from the venom of *Bothrops jararaca*. Biochemistry 1994; 33:1843-1849.
87. Vieira DF, Watanabe L, Sant'ana CD, Marcussi S, Sampaio SV, Soares AM *et al.* Purification and characterization of jararassin-I, A thrombin-like enzyme from *Bothrops jararaca* snake venom. Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai) 2004; 36:798-802.
88. Smolka MB, Marangoni S, Oliveira B, Novello JC. Purification and partial characterization of a thrombin-like enzyme, balterobin, from the venom of *Bothrops alternatus*. Toxicon 1998; 36:1059-1063.

89. Costa J de O, Fonseca KC, Mamede CC, Beletti ME, Santos-Filho NA, Soares AM *et al.* Bhalternin: Functional and structural characterization of a new thrombin-like enzyme from *Bothrops alternatus* snake venom. *Toxicon* 2010; 55:1365-1377.
90. Lobo de Araujo A, Donato JL, Bon C. Purification from *Bothrops lanceolatus* (fer de lance) venom of a fibrino(geno)lytic enzyme with esterolytic activity. *Toxicon* 1998; 36:745-758.
91. Sant' Ana CD, Ticli FK, Oliveira LL, Giglio JR, Rechia CG, Fuly AL *et al.* BjussuSP-I: a new thrombin-like enzyme isolated from *Bothrops jararacussu* snake venom. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 2008; 151:443-454.
92. Costa FL, Rodrigues RS, Izidoro LF, Menaldo DL, Hamaguchi A, Homs-Brandeburgo MI *et al.* Biochemical and functional properties of a thrombin-like enzyme isolated from *Bothrops pauloensis* snake venom. *Toxicon* 2009; 54:725-735.
93. Vilca-Quispe A, Ponce-Soto LA, Winck FV, Marangoni S. Isolation and characterization of a new serine protease with thrombin-like activity (TLBm) from the venom of the snake *Bothrops marajoensis*. *Toxicon* 2010; 55:745-753.
94. Magalhães A, Magalhães HPB, Richardson M, Gontijo S, Ferreira RN. Almeida AP *et al.* Purification and properties of a coagulant thrombin-like enzyme from the venom of *Bothrops leucurus*. *Comp Biochem Physiol A* 2007; 146: 565–575
95. Valeriano-Zapana JA, Segovia-Cruz FS, Rojas-Hualpa JM, Martins-de-Souza D, Ponce-Soto LA, Marangoni S. Functional and structural characterization of a new serine protease with thrombin-like activity TLBan from *Bothrops andianus* (Andean Lancehead) snake venom. *Toxicon*. 2012; 59(2):231-40.
96. Stocker K, Fischer H, Meier J, Brogli M, Svendsen L. Protein C activators in snake venoms. *Behring Inst Mitt*. 1986; 79:37-47.
97. Sekiya F, Atoda H, Morita T. Isolation and characterization of an anticoagulant protein homologous to botrocetin from the venom of *Bothrops jararaca*. *Biochemistry* 1993; 32: 6892-6897.

98. Zingali RB, Jandrot-Perrus M, Guillin M, & Bonn C. Bothrojaracin, a new thrombin inhibitor isolated from *Bothrops jararaca* venom: characterization and mechanism of thrombin inhibition. *Biochemistry* 1993; 32: 10794-10802.
99. Monteiro RQ, Bock PE, Bianconi ML, Zingali RB. Characterization of bothrojaracin interaction with human prothrombin. *Protein Sci* 2001; 10: 1897-1904.
100. Castro HC, Dutra DL, Oliveira-Carvalho AL, Zingali RB. Bothroalternin, a thrombin inhibitor from the venom of *Bothrops alternatus*. *Toxicon* 1998; 36:1903-1912.
101. Oliveira-Carvalho AL, Guimarães PR, Abreu PA, Dutra DL, Junqueira-de-Azevedo IL, Rodrigues CR *et al.* Identification and characterization of a new member of snake venom thrombin inhibitors from *Bothrops insularis* using a proteomic approach. *Toxicon* 2008; 51:659-671.
102. Alvarado J, Gutiérrez JM. Anticoagulant effect of myotoxic phospholipase A2 isolated from the venom of the snake *Bothrops asper* (Viperidae). *Rev Biol Trop* 1988; 36:563-565.
103. Lobo de Araujo A, Kamiguti A, Bon C. Coagulant and anticoagulant activities of *Bothrops lanceolatus* (Fer de lance) venom. *Toxicon* 2001; 39:371-375.
104. Ketelhut DF, de Mello MH, Veronese EL, Esmeraldino LE, Murakami MT *et al.* Isolation, characterization and biological activity of acidic phospholipase A2 isoforms from *Bothrops jararacussu* snake venom. *Biochimie* 2003, 85:983-91.
105. Higuchi DA, Barbosa CM, Bincoletto C, Chagas JR, Magalhaes A, Richardson M *et al.* Pesquero JB, Araujo RC, Pesquero L. Purification and partial characterization of two phospholipases A2 from *Bothrops leucurus* (white-tailed-jararaca) snake venom. *Biochimie* 2007; 89:319-328.
106. Garcia Denegri ME, Acosta OC, Huancahuire-Vega S, Martins-de-Souza D, Marangoni S, Maruñak SL *et al.* Isolation and functional characterization of a new acidic PLA (2) Ba Spll RP4 of the *Bothrops alternatus* snake venom from Argentina. *Toxicon* 2010; 56:64-74.

107. Sánchez EF, Swenson S. Proteases from South American Snake Venoms Affecting Fibrinolysis Current Pharmaceutical Analysis 2007, 3: 147-157
108. Maruyama M, Sugiki M, Yoshida E, Mihara H, Nakajima N. Purification and characterization of two fibrinolytic enzymes from *Bothrops jararaca* (jararaca) venom. Toxicon 1992; 30:853-864.
109. Maruyama M, Sugiki M, Anai K, Yoshida E. N-terminal amino acid sequences and some characteristics of fibrinolytic/hemorrhagic metalloproteinases purified from *Bothrops jararaca* venom. Toxicon 2002; 40: 1223–1226.
110. Sugiki M, Maruyama M, Yoshida E, Mihara H, Kamiguti AS, Theakston DG. Enhancement of plasma fibrinolysis in vitro by jararhagin, the main haemorrhagic metalloproteinase in *Bothrops jararaca* venom. Toxicon 1995; 33:1605-1617.
111. Reichl AP, Mandelbaum FR. Proteolytic specificity of moojeni protease A isolated from the venom of *Bothrops moojeni*. Toxicon 1993; 31:187-194.
112. Assakura MT, Reichl AP, Asperti MCA, Mandelbaum FR. Isolation of the major proteolytic enzyme from the venom of the snake *Bothrops moojeni* (Caissaca). Toxicon 1985; 23: 691–706.
113. Serrano SMT, Matos NFC, Mandelbaum FR. Basic proteinases from *Bothrops moojeni* (caíçaca) venom-I. Isolation and activity of two serine proteinases MSPI and MSPII on synthetic substrates and platelet aggregation. Toxicon 1993^a; 31: 471–481.
114. Bernardes C P, Santos-Filho N A , Costa T R , Gomes M S , Torres F S. Costa J *et al.* Isolation and structural characterization of a new fibrin(ogen)olytic metalloproteinase from *Bothrops moojeni* snake venom Toxicon 2007; 51:574-584.
115. Gomes MS, Mendes MM, de Oliveira F, de Andrade RM, Bernardes CP, Hamaguchi A *et al.* BthMP: a new weakly hemorrhagic metalloproteinase from *Bothrops moojeni* snake venom. Toxicon 2009; 53:24-32.

116. Rodrigues VM, Soares AM, Guerra-Sá R, Rodrigues V, Fontes MR, Giglio JR. Structural and functional characterization of neuwiedase, a nonhemorrhagic fibrin(ogen)olytic metalloprotease from *Bothrops neuwiedi* snake venom. Arch Biochem Biophys 2000; 381:213-224.
117. Baldó C, Tanjoni I, Leon IR, Batista IFC, Della-Casa MS, Clissa PB *et al.* BnP1, a novel P-I metalloproteinase from *Bothrops neuwiedi* venom: biological effects benchmarking relatively to jararagin, a P-III SVMP. Toxicon 2008; 51: 54–65.
118. Marcussi S, Bernardes CP, Santos-Fincho NA, Mazzi MV, Oliveira CZ, Izidoro LM *et al.* Molecular and functional characterization of a new non-hemorrhagic metalloprotease from *Bothrops jararacussu* snake venom with antiplatelet activity. Peptides 2007; 28: 2328–2339.
119. Mazzi MV, Magno AJ, Amui SF, Oliveira CZ, Ticli FK, Stabeli RG *et al.* Molecular characterization and phylogenetic analysis of BjuMP- I: a RGD-P-III class hemorrhagic metalloprotease from *Bothrops jararacussu* snake venom. J Mol Graph Model 2007; 26: 69–85.
120. Bello CA, Hermogenes AL, Magalhaes A, Veiga SS, Gremski LH, Richardson M *et al.* Isolation and biochemical characterization of a fibrinolytic proteinase from *Bothrops leucurus* (white-tailed jararaca) snake venom. Biochimie 2006; 88:189-200.
121. Gomes MS, de Queiroz MR, Mamede CC, Mendes MM, Hamaguchi A, Honsi-Brandeburgo MI, Sousa MV, Aquino EN, Castro MS, de Oliveira F, Rodrigues VM. Purification and functional characterization of a new metalloproteinase (BleucMP) from *Bothrops leucurus* snake venom Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol 2011; 153:290-300.
122. Torres-Huaco FD, Ponce-Soto LA, Martins-de-Souza D, Marangoni S. Purification and characterization of a new weak hemorrhagic metalloproteinase BmHF-1 from *Bothrops marajoensis* snake venom. Protein J 2010; 29:407-16.
123. Patiño AC, Pereañez JA, Núñez V, Benjumea DM, Fernandez M, Rucavado A *et al.* Isolation and biological characterization of Batx-I, a weak hemorrhagic and fibrinogenolytic PI metalloproteinase from Colombian *Bothrops atrox* venom. Toxicon 2010; 56:936-943.

124. Sánchez EF, Schneider FS, Yarleque A, Borges MH, Richardson M, Figueiredo SG *et al.* A The novel metalloproteinase atroxlysin-I from Peruvian *Bothrops atrox* (Jergón) snake venom acts both on blood vessel ECM and platelets. Arch Biochem Biophys 2010; 496:9-20.
125. Cintra AC, De Toni LG, Sartim MA, Franco JJ, Caetano RC, Murakami MT *et al.* Batroxase, a new metalloproteinase from *B. atrox* snake venom with strong fibrinolytic activity. Toxicon. 2012; 60(1):70-82
126. Klöcking, HP, Hoffman A, Markwardt, F. Release of plasminógeno activator by batroxobin. Haemostasis 1987; 17:235-237.
127. Sugiki M, Yoshida E, Anai K, Maruyama M. Activation of single-chain urokinase-type plasminogen activator by a hemorrhagic metalloproteinase, jararafibrase I, in *Bothrops jararaca* venom. Toxicon 1998; 36:993-1000.
128. Sánchez EF, Santos CI, Magalhaes A, Diniz CR, Figueiredo S, Gilroy J, *et al.* Isolation of a proteinase with plasminogen-activating activity from *Lachesis muta muta* (bushmaster) snake venom. Arch Biochem Biophys 2000; 378:131-141.
129. Hermógenes AL, Richardson M, Magalhaes A, Yarleque A, Rodriguez E, Sánchez EF. Interaction of a plasminogen activator proteinase, LV-PA with human alpha2-macroglobulin. Toxicon 2006; 47(4):490-494.
130. Sánchez EE, Rodríguez-Acosta A, Cantu E, Guerrero B. Antivenoms and Coagulation. En: Kini R M, Clemetson K J, Markland F S, McLane M A, Morita Toxins and Hemostasis from Bench to Bedside. Editorial Springer Dordrecht Heidelberg London New York. 2010. Cap. 40.
131. Rosenfeld, G. 1971. Symptomatology, pathology and treatment of snake bites. *In*: South America. Venomous Animals and Their Venoms. Academic Press, New York, pp. 345–384.
132. Gutiérrez JM, Ownby C L. Skeletal muscle degeneration induced by venom phospholipases A2: insights into the mechanisms of local and systemic myotoxicity. Toxicon 2003; 42: 915–931.

133. Queiroz LS, Neto HS, Rodrigues-Simioni L, Prado-Franceschi J. Muscle necrosis and regeneration after envenomation by *Bothrops jararacussu* snake venom. *Toxicon* 1984; 22: 339–346.
134. Milani Jr. R, Jorge MT, Ferraz de Campos FP, Martins FP, Bousso A, Cardoso JLC *et al.*, *I.* Snake Bites by the jararacuc-u (*Bothrops jararacussu*): clinicopathological clinicopathological studies of 29 proven cases in São Paulo State, Brazil. *Q J Med* 1997; 90: 323–334.
135. Ribeiro L A, Albuquerque M J, de Campos V A , Katz G , Takaoka N Y , Lebrão M L *et al.* Deaths caused by venomous snakes in the State of São Paulo: evaluation of 43 cases from 1988 to 1993. *Rev Assoc Med Bras* 1998; 44: 312–318.
136. Girón ME, Salazar AM, Aguilar I, Pérez JC, Sánchez EE, Arocha-Piñango CL *et al.* Hemorrhagic, coagulant and fibrino(geno)lytic activities of crude venom and fractions from mapanare (*Bothrops colombiensis*) snakes. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* 2008; 147:113-121.
137. Rodríguez -Acosta A, Uzcátegui W, Azuaje R, Aguilar I, Girón ME. A clinical and epidemiological analysis of accidental bites by snakes of the genus *Bothrops* in Venezuela. *Rev Cuba Med Trop* 2000; 52:90–94.
138. Gutiérrez J M, Nunez 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* 1991; 55: 217–229
139. Gutiérrez JM, León G, Lomonte B. Pharmacokinetic-pharmacodynamic relationships of immunoglobulin therapy for envenomation. *Clin Pharmacokinet* 2003; 42:721-741.
140. Mathur A, Hong Y, Kemp BK, Barrientos AA, Erusalimsky JD. Evaluation of fluorescent dyes for the detection of mitochondrial membrane potential changes in cultured cardiomyocytes. *Cardiovasc Res* 2000; 46:126-38.
141. Guércio RA, Shevchenko A, Shevchenko A, López-Lozano JL, Paba J, Sousa MV *et al.* Ontogenetic variations in the venom proteome of the Amazonian snake *Bothrops atrox*. *Proteome Sci.* 2006; 4:11-17.

- 142.(Anonymous). National Institute of Health. Principles of laboratory animal care, USA. Pub. 85 No. 23: 1-112; 1985.
- 143.Hamburger V Hamilton H.A series of normal stages in the development of the chick embryo Dev Dyn 1992; 195:231-272.
- 144.Lowry OH, Rosembrough NJ, Farr AL, & Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. J Biol Chem 1951; 193:265-275.
- 145.Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD *et al*. Measurement of protein using bicinchoninic acid. Anal Biochem 1985; 150:76–85.
- 146.Simonian MH, Smith JA. Spectrophotometric and colorimetric determination of protein concentration. Curr Protoc Mol Biol 2006; Chapter 10: Unit 10.1A.
- 147.Laemmli U. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T-4. Nature 1970; 227:608–609.
- 148.Schägger H and von Jagow G. Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. Anal Biochem 1987; 166: 368-379.
- 149.Merril Carl. Gel-Staining Techniques. En: Deutscher MP, editor. Guide to protein purification. Method in Enzymology, Vol 182. San Diego: Academic Press; 1990. p. 477-494.
- 150.Garfin D. Isoelectric focusing. En: Deutscher MP, editor. Guide to protein purification. Method in Enzymology, Vol 182. San Diego: Academic Press; 1990. p. 459–477.
- 151.Spearman–Kärber, F. Alternative Methods of Analysis for Quantal Responses.In: Statistical Method in Biological Assay. Finney, D.J. Charles Griffin & Co. Ltd. Londres. 1978.
- 152.Kondo H, Kondo S, Ikesawa H , Murata, R, Oshaka A. Studies on the quantitative method for determination of hemorrhagic activity of Habu snake venom. Jpn J Med Sci Biol 1960; 13: 43-51.

153. Gutiérrez JM, Gené JA, Rojas G, Cerdas L. Neutralización of proteolytic and hemorrhagic activities of Costa Rican snake venoms by polyvalent antivenom. *Toxicon* 1985; 23: 887- 893.
154. Marsh N A, Arocha-Piñango C L. Evaluation of the fibrin plate method for estimating plasminogen activator. *Thromb Diathes Haemorrh* 1972; 28:75-88.
155. Carvajal Z, Arocha-Piñango CL. Estudio zimográfico de las fracciones purificadas del veneno de la *Lonomia achelous*. *Rev Iberoam Trombos Hemost* 1991; 4:182–184.
156. Mussoni L, Raczka E, Chmielewska J. *et al.* Plasminogen assay in rabbit and mouse plasma using the chromogenic substrate S-2251. *Thromb Res.* 1979; 15: 341-349.
157. Sánchez EF, Souza CT, Bello CA, Richardson M, Oliveira EB, Magalhaes A. Resolution of isoforms of mutalysin II, the metalloproteinase from bushmaster snake venom. *Toxicon* 2003; 41:1021-1031.
158. Austen D Rhymes I. A Laboratory Manual of blood coagulation. Osney Mead, Oxford, London: Blackwell Scientific Publications, 1975. p. 38. .
159. Rael ED, Martinez M, Molina O. Isolation of a fibrinolytic protease, M4, from venom of *Crotalus molossus molossus* (northern blacktail rattlesnake). *Haemostasis* 1992; 22:41-49.
160. Lucena S, Salazar AM, Gil A, Arocha-Piñango CL, Guerrero B The action of Lonomin V (*Lonomia achelous*) on fibronectin functional properties. *Thromb Res* 2008; 121:653-661.
161. Da Silveira RB, dos Santos Filho JF, Mangili OC, Veiga SS, Gremski W, Nader HB *et al.* Identification of proteases in the extract of venom glands from brown spiders. *Toxicon* 2002 ; 40:815-22.
162. Theakston RDG Reid HA Development of simple standard assay procedures for the characterization of snake venoms. *Bull WHO* 1983, 61:949-956.

163. Yamakawa, M. Nozaki and Z. Hokama, Fractionation of sakishima–habu (*Trimeresurus elegans*) venom and lethal hemorrhagic and edema forming activity of the fractions. In: A. Ohsaka, K. Hayashi and Y. Sawai, Editors, Animal, Plant and Microbial Toxins **vol. 1**, Plenum Press, New York (1976), p. 97.
164. Chromogenix [Página Web en línea]. Disponible: <http://www.chromogenix.com/> [Consulta: 2010, Febrero].
165. Guerrero B. Arocha-Piñango C L. Activation of human prothrombin by the venom of *Lonomia achelous* (Cramer) caterpillars. Thromb Res 1992; 66:169-177. .
166. Ouchterlony O. Diffusion-in-gel methods for immunological analysis. Prog Allergy. 1958; 5:1-78.
167. Urbaneja B, Gugig M, Bello R. 1975. Cultivo de tejidos animales. Trabajos de Laboratorio. Universidad Central de Venezuela, Facultad de Ciencias, Escuela de Biología, Caracas.
168. Álvarez M, Figueroa C, León I, Rodríguez M Cardiotoxicidad de cloroquina y protección con rojo de rutenio sobre corazón de embrión de pollo. Inf Med 2004; 6:121-128.
169. Stockert JC, Pinna-Seen E, Bella JL, Lisanti JA. DNA-binding fluorochromes: correlation c-banding of mouse metaphase chromosomes and hydrogen bonding to adenine-thymine base pairs. Acta Histochem 2005; 106:413-420.
170. Base de datos NCBI- consulta secuencias. [Página Web en línea]. Disponible: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>. Consulta: 2010, Diciembre].
171. Akao P K, Tonoli C C , Navarro M S , Cintra A C , Neto J R , Arni R K *et al.* Structural studies of BmooMPalpha-I, a non-hemorrhagic metalloproteinase from *Bothrops moojeni* venom Toxicon 2010; 55: 361-368.
172. Jeon O H Kim D S. Molecular cloning and functional characterization of a snake venom metalloprotease. Eur J Biochem 1999; 263: 526-533.

173. Sánchez EF, Diniz C R, Richardson M. The complete amino acid sequence of the haemorrhagic factor LHFII, a metalloproteinase isolated from the venom of the bushmaster snake (*Lachesis muta muta*) JOURNAL FEBS, Lett 1991; 282: 178-182
174. De Roodt AR, Litwin S, Vidal JC. Hemorrhagic activity of Bothrops venoms determined by two different methods and relationship with proteolytic activity on gelatin and lethality. Toxicon 2003; 41:949-958.
175. Kamiguti AS, Matsunaga S, Spir M, Sano-Martins IS, and Nahas L. Alterations of the blood coagulation system after accidental human inoculation by *Bothrops jararaca* venom. Braz J Med Biol Res 1986; 19:199-204.
176. Campbell JA, Lamar W.W. The Venomous Reptiles of the Western Hemisphere. Comstock Publishing Associates, Ithaca and London. 2004.
177. Chippaux JP, Williams V, and White J. Snake venom variability: methods of study, results and interpretation. Toxicon 1991; 29:1279-1303.
178. Minton SA, and Weinstein SA. Geographic and ontogenic variation in venom of the western diamondback rattlesnake (*Crotalus atrox*). Toxicon 1986; 24: 71-80.
179. Maruyama M, Kamiguti AS, Cardoso JL, Sano-Martins IS, Chudzinski AM, Santoro ML *et al.* Studies on blood coagulation and fibrinolysis in patients bitten by *Bothrops jararaca* (jararaca). Thromb Haemost 1990; 63:449- 453.
180. Gutiérrez JM, Chaves F, Bolaños R. Comparative study of venoms of newborn and adult specimens of *Bothrops asper*. Rev Biol Trop 1980; 28:341- 351.
181. Menezes MC, Furtado MF, Travaglia-Cardoso SR, Camargo AC, Serrano SM Sex-based individual variation of snake venom proteome among eighteen *Bothrops jararaca* siblings. Toxicon 2006; 47:304-312.

182. Antunes TC, Yamashita KM, Barbaro KC, Saiki M, Santoro ML. Comparative analysis of newborn and adult *Bothrops jararaca* snake venoms. *Toxicon* 2010; 56:1443-1458.
183. Alapé-Girón A, Flores-Díaz M, Sanz L, Madriga M, Escolano J, Sasa M *et al.* Studies on the venom proteome of *Bothrops asper*: Perspectives and applications. *Toxicon* 2009; 54: 938-948.
184. Aguilar I, Guerrero B, Salazar AM, Girón ME, Pérez JC, Sánchez EE, *et al.* Individual venom variability in the South American rattlesnake *Crotalus durissus cumanensis*. *Toxicon* 2007; 50: 214–224.
185. Queiroz GP, Pessoa LA, Portaro FC, Furtado Mde F, Tambourgi DV. Interspecific variation in venom composition and toxicity of Brazilian snakes from *Bothrops* genus. *Toxicon* 2008; 52:842-851.
186. Furtado MF. Biological and immunological properties of the venom of *Bothrops alcatraz*, an endemic species of pitviper from Brazil. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* 2005; 141:117-123.
187. Moura-da-Silva AM, Cardoso DF, Tanizaki MM. Differences in distribution of myotoxic proteins in venoms from different *Bothrops* species. *Toxicon* 1990; 28: 1293–1301.
188. Assakura MT, Silva CA, Mentale R, Camargo ACM, Serrano SMT. Molecular cloning and expression of structural domains of bothropasin, a P-III metalloproteinase from the venom of *Bothrops jararaca*. *Toxicon* 2003; 41: 217–227.
189. Gutiérrez J M, Lomonte B, León G, Alape-Girón A, Flores-Díaz M, Sanz L *et al.* Snake venomomics and antivenomics: proteomic tools in the design and control of antivenoms for the treatment of snakebite envenoming. *J. Proteomics* 2009; 72, 165– 182.
190. Swenson S, Markland FS Jr. Snake venom fibrin(ogen)olytic enzymes. *Toxicon* 2005;45:1021-1039.
191. Calvete JJ, Borges A, Segura A, Flores-Díaz M, Alape-Girón A, Gutiérrez JM *et al.* Snake venomomics and antivenomics of *Bothrops colombiensis*, a medically important pitviper of the *Bothrops atrox-asper*

complex endemic to Venezuela: Contributing to its taxonomy and snakebite management. J Proteomics 2009; 72:227-240.

192. Daltry JC, Wuster W, and Thorpe RS. Diet and snake venom evolution. Nature 1996; 379:537-540.
193. Sasa M. Diet and snake venom evolution: can local selection alone explain intraspecific venom variation? Toxicon 1999; 37: 249-252.
194. Jorge M T, Ribeiro L A. Envenoming by the South American pit viper *Bothrops neuwiedi* Wagler. Ann Trop Med Parasitol 2000; 94: 731–734.
195. Jorge MT, Ribeiro LA. The epidemiology and clinical picture of an accidental bite by the South American rattlesnake (*Crotalus durissus*). Rev Inst Med Trop Sao Paulo 1992; 34: 347-354.
196. Rodríguez-Acosta A, Alonso R, Castro I, Aguilar I, Girón M E. Toxoid preparation from venom of *Bothrops colombiensis* (Central and South American snake). Arch Roum Path Exp Microbiol 1991; 50:209-214
197. Rodríguez-Acosta A, Uzcátegui W, Azuaje R, Girón M E and Aguilar I. Elisa Assays for the Detection of *Bothrops lanceolatus* Venom in Venezuelan Patient plasmas. Roum Arch Microbiol Immunol 1998, 57: 271-278.
198. Jiménez N, Escalante T, Gutiérrez JM, Rucavado A. Skin pathology induced by snake venom metalloproteinase: acute damage, revascularization, and re-epithelization in a mouse ear model. Invest Dermatol 2008; 128:2421-2428.
199. Kamiguti AS, Hay CR, Theakston RD, Zuzel M. Insights into the mechanism of haemorrhage caused by snake venom Metalloproteinases. Toxicon 1996; 34: 627–642.
200. Stocker W, Bode W. Structural features of a superfamily of zinc-endopeptidases: the metzincins. Curr Opin Struct Biol 1995; 5: 383-390.
201. Weinberg M L, Felicori L F, Bello C A, Magalhães H P, Almeida A P, Magalhães A *et al.* Biochemical properties of a bushmaster snake venom

serine proteinase (LV-Ka) and its kinin releasing activity evaluated in rat mesenteric arterial rings. J Pharmacol Sci 2004b; 96: 333–342.

202. Bogarin G, Morais F, Yamaguchi I K, Stephano M A, Marcelino J R. Neutralization of crotaline snake venoms from Central and South America by antivenoms produced in Brazil and Costa Rica. Toxicon 2000; 38:1429-1441.
203. Saldarriaga M M, Otero R, Nuñez V, Toro M F, Diaz A, Gutiérrez J M. Ontogenetic variability of *Bothrops atrox* and *Bothrops asper* snake venoms from Colombia. Toxicon 2003; 42: 405–411.
204. Salazar A M, Rodríguez-Acosta A, Girón ME, Aguilar I, Guerrero B. A comparative analysis of the clotting and fibrinolytic activities of the mapanare (*Bothrops atrox*) snake venom from different geographical areas in Venezuela. Thromb Res 2007; 120: 95-104.
205. Markland, F.S.Jr. Snake venom fibrinogenolytic and fibrinolytic enzymes: an updated inventory. Thromb. Haemost 1998; 79: 668-674.
206. Girón ME, Estrella A, Sánchez EE, Galán J, Tao WA, Guerrero B, *et al.* Purification and characterization of a metalloproteinase, Porthidin-1, from the venom of Lansberg's hog-nosed pitvipers (*Porthidium lansbergii hutmanni*). Toxicon 2011; 57:608-618. .
207. Clissa PB, Lopes-Ferreira M, Della-Casa MS, Farsky SH, Moura-da-Silva AM. Importance of jararhagin disintegrin-like and cysteine-rich domains in the early events of local inflammatory response. Toxicon 2006; 47:591-596.
208. Francis CW, Marder VJ, Martin SE () Plasmic degradation of crosslinked fibrin. I. Structural analysis of the particulate clot and identification of new macromolecular-soluble complexes. Blood 1980; 56:456-464.
209. Swenson S, Toombs CF, Pena L, Johansson J, Markland FS Jr. Alpha-fibrinogenases. Curr Drug Targets Cardiovasc Haematol Disord. 2004; 4:417-435.

210. Liang XX, Zhou YN, Chen JS, Qiu PX, Chen HZ, Sun HH. *et al.* Enzymological characterization of FII(a), a fibrinolytic enzyme from *Agkistrodon acutus* venom. *Acta Pharmacol Sin* 2005; 26:1474-1478.
211. Daoud E, Tu AT, el-Asmar MF. Mechanism of the anticoagulant, Cerastase F-4, isolated from *Cerastes cerastes* (Egyptian sand viper) venom. *Thromb Res* 1986; 41:791-799.
212. Gasmi A, Karoui M, Benlasfar Z, Karoui H, el Ayeb M, Dellagi K. Purification and characterization of a fibrinogenase from *Vipera lebetina* (desert adder) venom. *Toxicon* 1991; 29:827-836.
213. Rodríguez-Acosta A, Sánchez EE, Márquez A, Carvajal Z, Salazar AM, Girón ME *et al.* Hemostatic properties of Venezuelan *Bothrops* snake venoms with special reference to *Bothrops isabelae* venom. *Toxicon* 2010; 56:926-35.
214. Grams F, Huber R, Kress LF, Moroder L, Bode W. Activation of snake venom metalloproteinases by a cysteine switch-like mechanism. *FEBS Lett* 1993; 335:76-80.
215. Yurchenco P & Schittny J. Molecular architecture of basement membranes. *FASEB Journal* 1990, 4: 1577-1590.
216. Oliveira AK, Paes Leme AF, Asega AF, Camargo AC, Fox JW, Serrano SM. New insights into the structural elements involved in the skin haemorrhage induced by snake venom metalloproteinases. *Thromb Haemost* 2010; 104:485-97.
217. Ohsaka A, Just M & Habermann E. Action of snake venom hemorrhagic principles on isolated glomerular basement membrane. *Biochimica et Biophysica Acta* 1973; 323: 415-428.
218. Gutiérrez JM, Rucavado A, Escalante T, Díaz C. Hemorrhage induced by snake venom metalloproteinases: biochemical and biophysical mechanisms involved in microvessel damage. *Toxicon* 2005; 45:997-1011.

219. Baramova EN, Shannon JD, Bjarnason JB, Fox JW. Identification of the cleavage sites by a hemorrhagic metalloproteinase in type IV collagen. *Matrix* 1990; 10:91-97.
220. Baramova EN, Shannon JD, Fox JW, Bjarnason JB. Proteolytic digestion of non-collagenous basement membrane proteins by the hemorrhagic metalloproteinase Ht-e from *Crotalus atrox* venom. *Biomed Biochim Acta* 1991; 50:763-768.
221. Rucavado A, Lomonte B, Ovadia M, Gutiérrez J M. Local tissue damage induced by BaP1, a metalloproteinase isolated from *Bothrops asper* (terciopelo) snake venom. *Exp Mol Path* 1995; 63: 186–199.
222. Escalante T, Ortiz N, Rucavado A, Sanchez EF, Richardson M, Fox JW, *et al.* Role of collagens and perlecan in microvascular stability: exploring the mechanism of capillary vessel damage by snake venom metalloproteinases. *PloS One*. 2011; 6:e28017.
223. Lucena S, Arocha-Piñango C L, Guerrero B. Fibronectina. Estructura y funciones asociadas a la hemostasia. Revisión. *Invest Clin* 2007; 48: 249-262
224. Terra RM, Pinto AF, Guimarães JA, Fox JW. Proteomic profiling of snake venom metalloproteinases (SVMPs): insights into venom induced pathology. *Toxicon* 2009; 54:836-844.
225. Gutiérrez J M. Comprendiendo los venenos de serpientes: 50 años de investigaciones en América Latina. *Rev Biol Trop* 2002; 50: 377-394.
226. Kamiguti AS, Hay CR, Zuzel M. Inhibition of collagen-induced platelet aggregation as the result of cleavage of alpha 2 beta 1-integrin by the snake venom metalloproteinase jararhagin. *Biochem J* 1996; 320:635-641.
227. Estêvão-Costa MI, Diniz CR, Magalhães A, Markland FS, Sánchez EF. Action of metalloproteinases mutalysin I and II on several components of the hemostatic and fibrinolytic systems. *Thromb Res* 2000; 99:363-376.
228. Gutiérrez JM, Lomonte B. Phospholipase A2 myotoxins from *Bothrops* snake venoms *Toxicon* 1995; 33:1405-1424.

229. Moura-da-Silva A M, Laing G, Paine DMJI, Dennison JMTJ, Politi V., Crampton, JM, Theakston RDG. Processing of pro-tumor necrosis factor- α by venom metalloproteinases: a hypothesis explaining local tissue damage following snake bite. *Eur J Immunol* 1996; 26: 2000–2005.
230. Mora J, Mora R, Lomonte B, Gutiérrez JM. Effects of *Bothrops asper* snake venom on lymphatic vessels: insights into a hidden aspect of envenomation. *PLoS Negl Trop Dis* 2008; 2:e318.
231. Zychar BC, Dale CS, Demarchi DS, Gonçalves LR. Contribution of metalloproteases, serine proteases and phospholipases A2 to the inflammatory reaction induced by *Bothrops jararaca* crude venom in mice. *Toxicon* 2010; 55:227-234.
232. Gutiérrez JM, Rucavado A, Chaves F, Díaz C, Escalante T. Experimental pathology of local tissue damage induced by *Bothrops asper* snake venom. *Toxicon*. 2009; 54:958-975.
233. Teixeira C F , Landucci E C , Antunes E , Chacur M , Cury Y. Inflammatory effects of snake venom myotoxic phospholipases A2. *Toxicon* 2003; 42: 947–962.
234. Gremski LH, Chaim OM, Paludo KS, Sade YB, Otuki MF, Richardson M, Gremski W, Sánchez EF, Veiga SS. Cytotoxic, thrombolytic and edematogenic activities of leucurolysin-a, a metalloproteinase from *Bothrops leucurus* snake venom. *Toxicon* 2007, 50:120-134.
235. Rodrigues VM, Soares AM, Andrião-Escarso SH, Franceschi AM, Rucavado A, Gutiérrez JM, Giglio JR Pathological alterations induced by neuwiedase, a metalloproteinase isolated from *Bothrops neuwiedi* snake venom *Biochimie*. 2001; 83:471-479.
236. Rucavado A, Escalante T, Teixeira CF, Fernandes CM, Diaz C, Gutiérrez JM Increments in cytokines and matrix metalloproteinases in skeletal muscle after injection of tissue-damaging toxins from the venom of the snake *Bothrops asper*. *Mediators Inflamm* 2002, 11:121-8.
237. Moreira V, Dos-Santos MC, Nascimento NG, da Silva HB, Fernandes CM, D'Império Lima MR, Teixeira C. Local inflammatory events induced by *Bothrops atrox* snake venom and the release of distinct classes of inflammatory mediators *Toxicon*. 2012; 60:12-20.

238. Williams V, White J. Variation in the composition of the venom from a single specimen of *Pseudonaja textilis* (common brown snake) over one year. *Toxicon* 1992; 30: 202–206..
239. Shashidharamurthy R , Jagadeesha D K , Girish K S , Kemparaju K .Variations in biochemical and pharmacological properties of Indian cobra (*Naja naja naja*) venom due to geographical distribution. *Mol Cell Biochem* 2002; 229: 93-101.
- 240..Stern CD, Bachvarova R Early chick embryos *in vitro*. *Int J Dev Biol*. 1997; 41(2):379-87.
241. Sells PG, Laing GD, Theakston RD. An *in vivo* but insensate model for the evaluation of antivenoms (ED (50)) using fertile hens' eggs. *Toxicon*. 2001; 39:665-668.
242. Collares-Buzato CB, Le Sueur, LP, Cruz-Ho" fling, M.A, Impairment of the cell-to-matrix adhesion and cytotoxicity induced by *Bothrops moojeni* snake venom in cultured renal tubular epithelia. *Toxicol Appl Pharmacol* 2002; 181: 124–132.
243. Nascimento JM, Collares-Buzato CB, Hyslop S. 2004. Cytotoxic action of *Bothrops alternatus* snake venom in cultured MDCK cells. In: Abstract from Eighth Symposium of the Pan American Section of the International Society on Toxinology. Angra dos Reis, Rio de Janeiro, Brazil, pp. 129.
244. Damico DC, Nascimento JM, Lomonte B, Ponce-Soto LA, Joazeiro PP, Novello JC, Marangoni S, Collares-Buzato CB. Cytotoxicity of *Lachesis muta muta* snake (bushmaster) venom and its purified basic phospholipase A2 (LmTX-I) in cultured cells. *Toxicon* 2007; 49:678-692.
245. Salvesen G S, Dixit V M. Caspases: intracellular signaling by proteolysis. *Cell* 1997; 91: 443–446.
246. Boldin M P, Gorchakov T M, Goltsev Y V, Wallach D. Involvement of MACH, a novel MORT 1/FADD-interacting protease, in Fas/APO-1 and TNF receptor-induced cell death. *Cell* 1996; 85: 803–815. .
247. Orrenius S., Zhivotovsky B, Nicotera P. Regulation of cell death: the calcium apoptosis link. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2003; 4: 552–565.

248. Villalobos JC, Mora R, Lomonte B, Gutiérrez JM, Angulo Y. Cytotoxicity induced in myotubes by a Lys49 phospholipase A2 homologue from the venom of the snake *Bothrops asper*: evidence of rapid plasma membrane damage and a dual role for extracellular calcium. *Toxicol In Vitro* 2007; 21:1382-1389.
249. Mora R, Valverde B, Díaz C, Lomonte B, Gutiérrez J M. A Lys49 phospholipase A2 homologue from *Bothrops asper* snake venom induces proliferation, apoptosis and necrosis in a lymphoblastoid cell line. *Toxicon* 2005; 45: 651–660.
250. Diaz C, Valverde L, Brenes O, Rucavado, A, and Gutiérrez J M Characterization of Events Associated With Apoptosis/Anoikis Induced by Snake Venom Metalloproteinase BaP1 on Human Endothelial Cells *Journal of Cellular Biochemistry* 2005; 94:520–528.
251. Alves RM, Antonucci GA, Paiva HH, Cintra AC, Franco JJ, Mendonça-Franqueiro EP, et al. Evidence of caspase-mediated apoptosis induced by l-amino acid oxidase isolated from *Bothrops atrox* snake venom. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 2008; 151:542-50.
252. Masuda S, Hayashi H, Atoda H, Morita T, Araki S.. Purification, cDNA cloning and characterization of the vascular apoptosis-inducing protein, HV1, from *Trimeresurus flavoviridis*. *Eur J Biochem* 2001; 268:3339–3345.
253. Araki S, Masuda S, Maeda H, Ying MJ, Hayashi H. Involvement of specific integrins in apoptosis induced by vascular apoptosis-inducing protein. *Toxicon* 2002; 40:535–542.
254. Mederith J L, Fazelli B Schwartz M A. The extracellular matrix as a cell survival factor. *Mol Biol Cel* 1993; 4: 953-961.
255. Brenes O, Muñoz E, Roldán-Rodríguez R, Díaz C Cell death induced by *Bothrops asper* snake venom metalloproteinase on endothelial and other cell lines. 2010; *Exp Mol Pathol* 88:424-432.
256. Tanjoni I, Weinlich R, Della-Casa MS, Clissa PB, Saldanha-Gama RF, de Freitas MS, Barja-Fidalgo C, Amarante-Mendes GP, Moura-da-Silva AM Jararhagin, a snake venom metalloproteinase, induces a specialized

form of apoptosis (anoikis) selective to endothelial cells. Apoptosis 2005; 10:851-861.

ANEXOS

TABLAS

Tabla 1 Actividades Fibrinolítica, Hemorrágica, procoagulante y Letal de venenos bothrópicos.

Especie/Localidad	Actividad Fibrinolítica en placas de fibrina (mm²/µg)	Actividad Hemorrágica (DHM) µg/ratón	Actividad Procoagulante (UI Th/mg)		DL 50 (mg/kg)
			Plasma	Fibrinógeno	
<i>B. atrox</i>					
Parguasa	10,0 ± 1,1	2,5	30,7 ± 2,0	24,3 ± 0,7	4,0
Pto.Ayac-1	25,7 ± 4,1	5,6	17,5 ± 1,1	18,6 ± 0,2	6,1
Pto.Ayac-2	12,1 ± 1,1	5,6	35,2 ± 1,5	39,6 ± 1,4	7,9
Serr. Cuao	5,1 ± 0,7	4,6	28,0 ± 1,1	25,3 ± 0,4	8,3
<i>B. colombiensis</i>					
Caucagua	30,6±5,5	13,8	11,0 ± 0,7	14,0 ± 0,9	11,6
El Guapo	16,8±3,2	5,32	18,0 ± 1,2	31,0 ± 2,0	5,8
<i>B. venezuelensis</i>					
Ávila	11,0 ± 4,7	2,48	58,0±0,2	40,0 ± 0,1	6,39
Baruta	30,13 ± 8,9	1,15	36,0±0,1	5,5 ± 0,1	8,25
La Boyera	9,5 ± 4,9	1,36	20,0±0,1	20,0 ± 0,1	4,36

Tabla 2. Actividad procoagulante y DL₅₀ de veneno crudo y fracciones de Sephadex G-100 de *B. colombiensis* de El Guapo y Caucaagua.

Veneno crudo y fracciones	Actividad Procoagulante				Dosis Letal (DL 50) mg/kg
	Método Amidolítico (mUA/min/mg)		Método Coagulante (UI Trombina/mg)		
	S-2238 (Trombina)	S-2222 (Factor Xa)	Plasma	Fibrinógeno purificado	
El Guapo					
Crudo	568,0± 22,3	116,4± 1,9	18,0± 1,2	31,0± 2,0 ^a	11,6
S I	1168,2±48,5 ^b	208,0± 14,5 ^b	120,0± 2,1	46,0± 1,3 ^a	
S II	38,0± 1.1	1,7± 0,2	0	0	
Caucagua					
Crudo	502,0± 18,5	56,0± 1,0	11,0± 0,7	14,0± 0,9	5,8
S I	934,0± 43,4 ^b	146,0± 14,3 ^b	36,0± 1,8	46,0± 1,0	
S II	24,0± 7,5	6,3± 2,2	0	0	

Los datos son expresados como la Media ± DE, con n=4.

a Diferencias estadísticamente significativas entre los venenos crudos y las fracciones, p< 0,01.

b Diferencias estadísticamente significativas entre los sustratos (plasma vs fibrinógeno purificado), p< 0,01.

Tabla 3. Actividades Fibrinolítica y hemorrágica del veneno crudo y las fracciones de Sephadex G-100 de *B. colombiensis* de El Guapo y Caucaagua.

Veneno crudo y fracciones	Actividad		Actividad Amidolítica							DHM	
	fibrinolítica en		% Inh IMP	S-2302			S-2288			µg/ratón	% Inh IMP
	placas de fibrina			Calicreína			(t-PA)				
	mm²/ µg ^a			mUA/min/mg	ISP	IMP	mUA/min/mg	ISP	IMP		
				% Inh			% Inh				
El Guapo											
Crudo	16,8 ± 3,2	100		1126±51,0	21	0	542±20,1	82	0	5,32	78,6
SI	5,0 ± 1,7	100		1356±33,1	26	0	910±31,0 ^b	72	0	1,9	99,8
SII	20,3 ± 2,8 ^c	100		18,0±3,8	ND	ND	0	ND	ND	139,5	53,5
Caucagua											
Crudo	30,6 ± 5,5	100		446±24,1	41	0	266±12,4	75	9	13,8	94,8
SI	7,1 ± 1,6	100		1010±44,6	55	0	825±20,5 ^b	78	9	3,9	68,7
SII	19,9 ± 1,6 ^c	100		20,0±4,0	ND	ND	0	ND	ND	87,5	75,8

Los datos son expresados como la Media ± DE, con n=4.

N.D.: No determinado

IMP: Inhibidores de Metaloproteasas

ISP: Inhibidores de Serino proteasas

a La media de tres dosis (10,25 y 50 µg) de veneno

b Diferencias significativas entre el veneno crudo y las fracciones , p< 0,01

c Diferencias significativas entre las fracciones , p< 0,01

Tabla 4. Actividades fibrinolítica y hemorrágica de las fracciones F1, F2 y F3 provenientes de la cromatografía de intercambio catiónico sobre columna Mono S HR 10/10 del veneno de *B. colombiensis* de Caucaagua.

Fracciones	Actividad fibrinolítica Placa de fibrina (mm ² /μg)	Actividad hemorrágica 50 μg/animal (mm ²)
F1	9,52	28
F2	70,2	18
F3	64,4	229
Veneno crudo	30,6	250

Tabla 5. Esquema de Purificación y Rendimiento de las Colombienasas

	Proteína (mg)	Fracciones Activas	Recuperación (%)	Actividad fibrinolítica ^a (mm ² /μg) ^o
Veneno				
<i>B. colombiensis</i>	127,00		100	30,6
Mono S 10/10				
	12,11	F 2 (Tubos 43-49)	9,53	48,06
Phenyl-Sepharose				
	3,05	F 2-A (Tubos 29-55)	2,40	85,73
	0,39	F 2-B (Tubos 68-70)	0,31	131,25
Superosa (F 2-A)				
	2,44	Colombienasa-1 (Tubos 59-67)	1,92	94,16
Bio- Silect- SEC (F 2-B)				
	0,33	Colombienasa-2 (Tubos 39-45)	0,26	211,57

Tabla 6. Fragmentos secuenciados de las Colombienasas a partir del N-terminal.

	Fragmentos
Colombienasa-1	SFGESVR; HLELVVADHGMFK FYRPMD FYRC*PPM KC*SNLNTLR DENLLCEC*EP
Colombienasa-2	WELLLELDTSTR HLELVVADHGMFK SFGESVR YFRPC*P

Tabla 7. Identidad de las Colombienasas 1 y 2 con Metaloproteasas dependientes de zinc reportadas en la base de datos (170).

Venenos Bothr6picos	Actividad sobre cadenas de Fibrin6geno	Nombre	Porcentaje de Identidad (%)	Referencia
<i>B. moojeni</i>	$\alpha > \beta$	BmooMP α -I	92	171
<i>B. moojeni</i>	$\alpha > \beta$	BmooMpalfa-I	100	114
<i>B. leucurus</i>	$\alpha > \beta$	Leucurolisyn- A	100	120
<i>Agkistrodon halys brevicaudus</i>	α	Mt-d-I	100	172
<i>Agkistrodon halys brevicaudus</i>	Degrada gelatina y col6genos III y V	Mt-d	100	172
<i>Lachesis muta</i>	$\alpha > \beta$	LHF-II	100	173

Tabla 8. Actividad hemorrágica de fracciones obtenidas del veneno crudo *B. colombiensis* por cromatografía de intercambio catiónico, interacción hidrofóbica y exclusión molecular.

Fracciones	Área de hemorragia (mm ² /50 µg)
Veneno crudo	250,0
F1	28,0
F2	18,0
F3	229,0
F2-A	Negativa
F2-B	Negativa
Colombienasa-1	Negativa
Colombienasa-2	Negativa

Tabla 9. Actividad fibrinolítica de las Colombienasas en placas de fibrina

Veneno o fracción	Actividad fibrinolítica (mm ² / µg)	
	Plasminógeno ⁺	Plasminógeno ⁻
10 µg		
Veneno crudo	30,6	34,2
Colombienasa-1	46,2	38,0
Colombienasa-2	50,6	42,0

Tabla 10. Activación del plasminógeno por las Colombienasas.

Muestra	Absorbancia (405 nm)		
	10 min	15 min	30 min
Plasminógeno (10 µg)			
+ 0,1 UI Streptoquinasa	1,046	1,376	1,381
+ Colombienasa-1 (2 µg)	0,074	0,082	0,084
+ Colombienasa-2 (2 µg)	0,075	0,106	0,116

Tabla 11. Actividad fibrinolítica en placas de fibrina de las Colombienasas en presencia de inhibidores de proteasas.

Muestra	Actividad fibrinolítica (mm ² / 5 ug)		
	Control	IMP (% Inhibición)	ISP (% Inhibición)
Colombienasa-1	470,8	13 (97,21)	209 (55,41)
Colombienasa-2	1057,85	230,19 (78,24)	470,64 (55,51)

Tabla 12. Acción de las Colombienasas sobre agregación plaquetaria inducida por ADP y Colágeno.

	ADP % de Agregación	Colágeno % de Agregación
Colombienasa-1	83,33±1,53	72,00±4,00
Control	74,00±1,00	67,33±5,51
Colombienasa-2	70,00±15,00	74,33±6,51
Control	71,33±1,53	67,00±3,00

Tabla 13. Actividad procoagulante de las Colombienasas por método coagulante.

	Actividad Procoagulante (UI Th/mg)	
Veneno crudo o fracciones (0,1 mg/mL)	Plasma	Fibrinógeno purificado
Veneno crudo	11,0±0,7	14,0±0,9
Colombienasa-1	No coagula	No coagula
Colombienasa-2	No coagula	No coagula

Tabla 14. Actividades biológicas de venenos de *Bothrops* venezolanos separados por especie y localidad

Especie	Localidad geográfica	DHM	DL 50	Actividades					Coagulante (UI Th/mL)	
				Fibrinolítica en placas de fibrina (mm²/10 µg)	Amidolítica (mUA/min/µg)			Plasma	Fibrinógeno puro	
					Trombina (S-2238)	Factor X (S-2222)	Calicreína (S-2302)			
<i>B. atrox</i>	Parguasa	2,5	4,0	100	438	294	25	30,7	24,3	
<i>B. atrox</i>	P.Ayacucho 1	5,6	6,1	257	190	126	48	17,5	18,6	
<i>B. atrox</i>	P.Ayacucho 2	5,6	7,9	121	473	177	27	35,2	39,6	
<i>B. atrox</i>	Serranía Cuao	4,6	8,3	51	383	235	28	28,0	25,3	
<i>B. colombiensis</i>	El Guapo	5,3	11,6	168	568	116	1126	18,0	31,0	
<i>B. colombiensis</i>	Caucagua	13,8	5,8	306	502	56	446	11,0	14,0	
<i>B. venezuelensis</i>	Ávila	2,5	6,4	110	618	0	116	58	40,0	
<i>B. venezuelensis</i>	Baruta	1,15	8,3	301	532	206	115	36	5,5	
<i>B. venezuelensis</i>	La Boyera	1,36	4,4	95	556	216	121	20	20,0	
<i>B. isabellae</i> ‡	Trujillo	9	5,9	500	132	21	125	ND	ND	

DHM: La mínima cantidad de proteína (µg) que produce un área de hemorragia de 10 mm.

DL 50: Dosis letal media expresada en mg/kg.

‡: Rodríguez y col., 2010

Tabla 15. Propiedades de las α -fibrinogenasas aisladas del veneno de *Bothrops colombiensis*.de Caucaagua.

Propiedades	Colombienasa- 1	Colombienasa- 2
Masa molecular (Da)	23.074,31	23.078,80
Punto isoeléctrico (pI)	6,0	6,2
Inhibidores	EDTA, EGTA, 1,10 fenantrolina y DTT.	EDTA, EGTA, 1,10 fenantrolina y DTT.
Metal involucrado en la actividad	Zinc	Zinc
Enlaces disulfuro	Presentes	Presentes
Actividad Fibrinolítica (Placa)	94,16 mm ² /μg	211,57 mm ² /μg
Degradación de fibrina	α , β y γ degradadas en 24 h	α , β y γ degradadas en 24 h
Actividad fibrinogenolítica	A α en 5 min, B β en 120 min γ no sufre alteración	A α en 15 min; B β en 15 min; γ en 120 min
Actividad activadora de plasminógeno con plasminógeno purificado	Negativo	Negativo
Actividad gelatinolítica	Negativo	Positivo
Degradación de proteínas de matriz extracelular y membranas basales		
Colágeno tipo IV	Negativo	Negativo
Fibronectina	Positivo	Positivo
Laminina	Negativo	Negativo
Actividad Amidolítica	Negativo	Negativo
Actividades biológicas		
Hemorrágica	Negativo	Negativo
Edematizante	12,66%	8,45%
Coagulante	Plasma o Fg	Plasma o Fg
Hemolítica	Incoagulables	Incoagulables
Agregación Plaquetaria	Negativo	Negativo
Citotóxica	Negativo	Negativo
Reconocimiento inmunológico	Positivo	Negativo

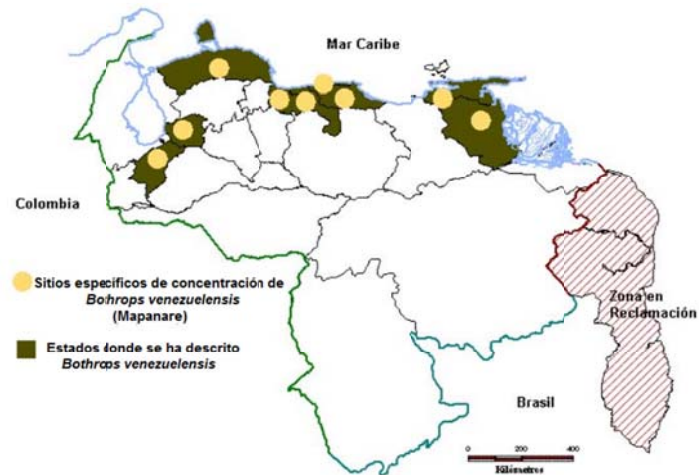
FIGURAS



B.colombiensis



B. atrox



B.venezuelensis

Figura 1. Distribución geográfica del género *Bothrops spp* en Venezuela (6).

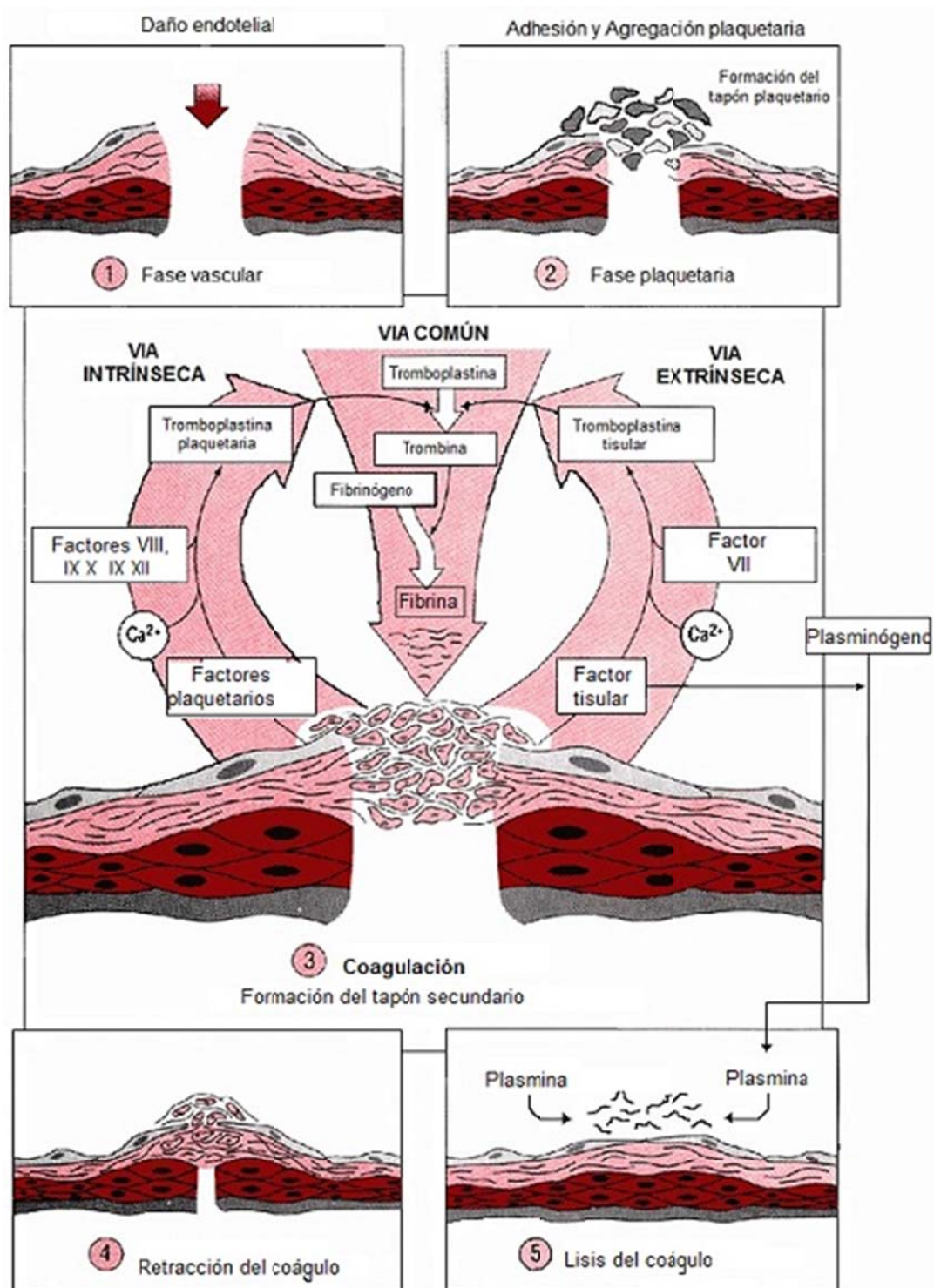


Figura 2. Esquema del sistema hemostático (24).

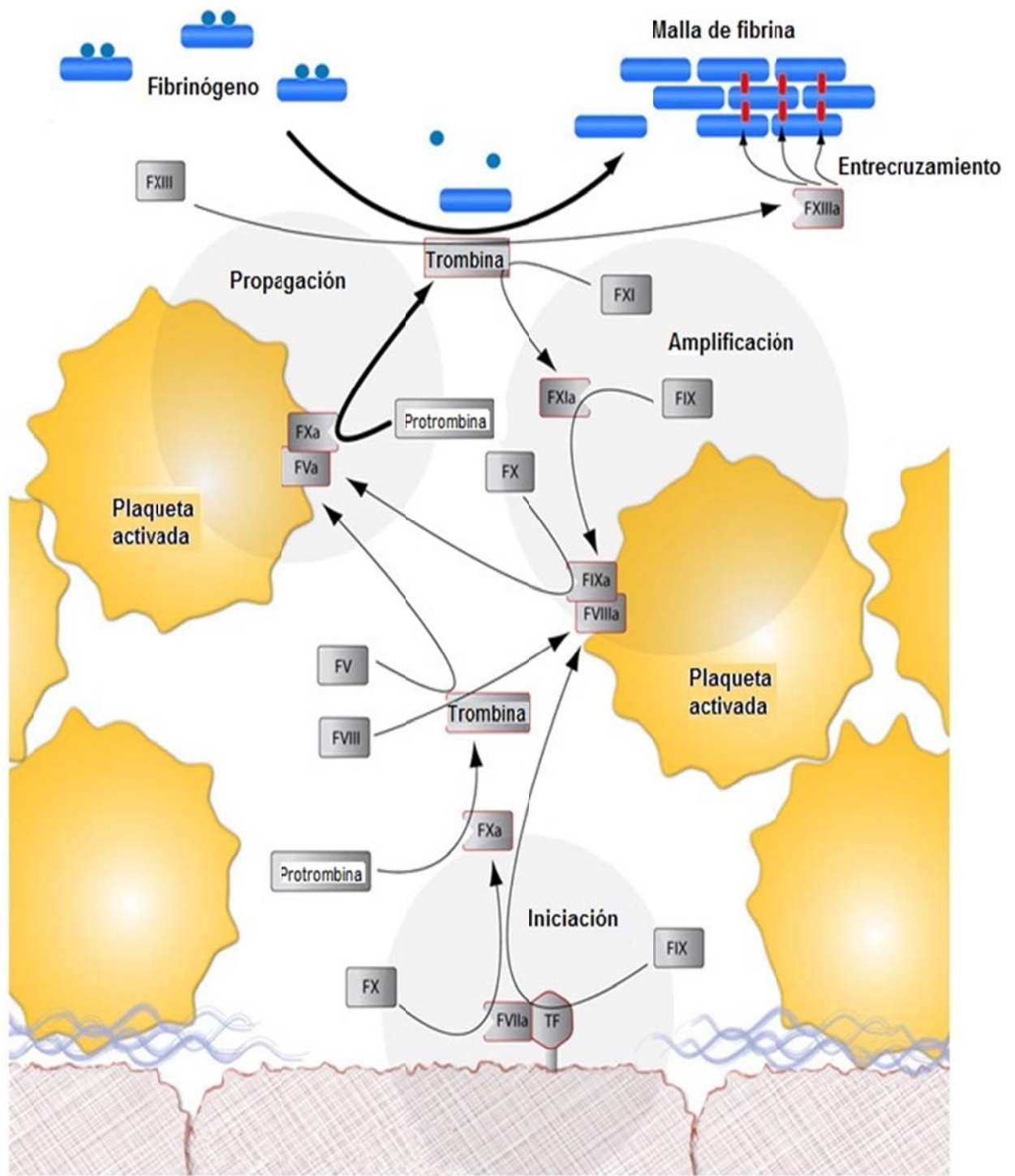


Figura 3. Modelo celular de la coagulación. Fase de *iniciación*, ocurre en las células portadoras de factor tisular (subendotelial); en la fase de *amplificación* el sistema se prepara para la producción a gran escala de trombina y fase de *propagación*, ocurre en la superficie plaquetaria y resulta en la producción de grandes cantidades de trombina (24).

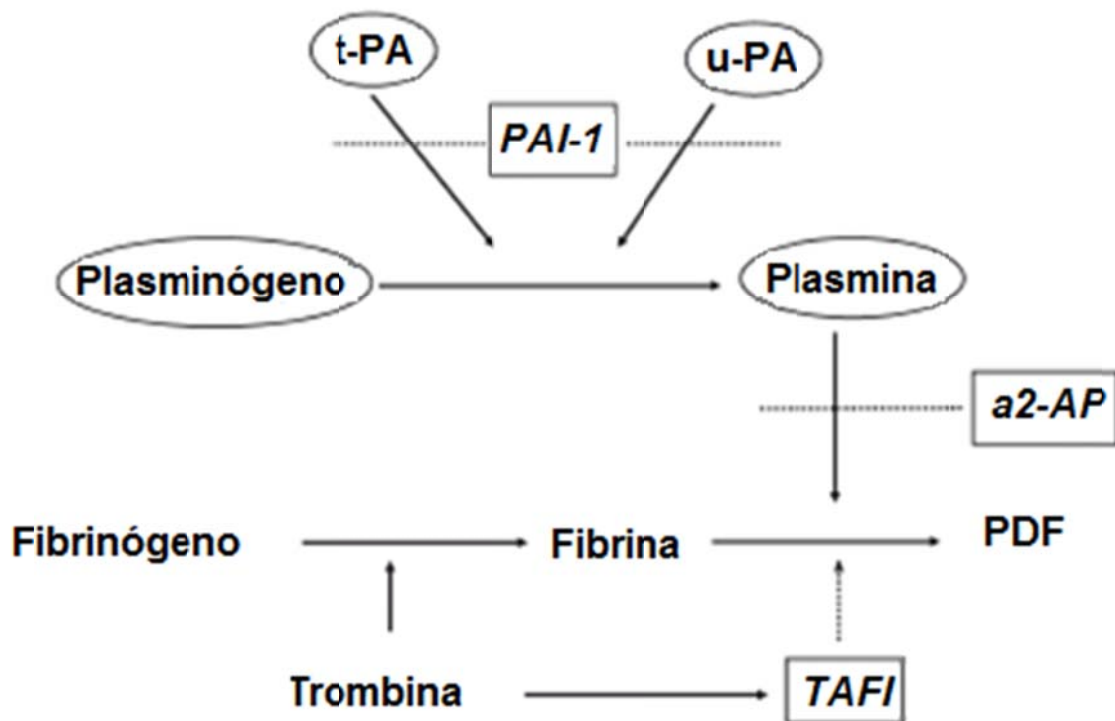


Figura 4. Degradación de la fibrina por el sistema fibrinolítico. El plasminógeno es activado por el activador del plasminógeno tipo tisular (t-PA) o por el tipo uroquinasa (u-PA). Estas enzimas son reguladas por el inhibidor de activador del plasminógeno-1 (PAI-1). La plasmina degrada la fibrina en productos de degradación (FDP) y es regulada por la α 2-antiplasmina (α 2- AP). La trombina convierte el fibrinógeno a fibrina y además activa el inhibidor de fibrinólisis activable por trombina (TAFI), el cual inhibe la fibrinólisis por modificación de su sustrato la fibrina (23).

HEMOSTASIA Y VENENOS BOTHRÓPICOS

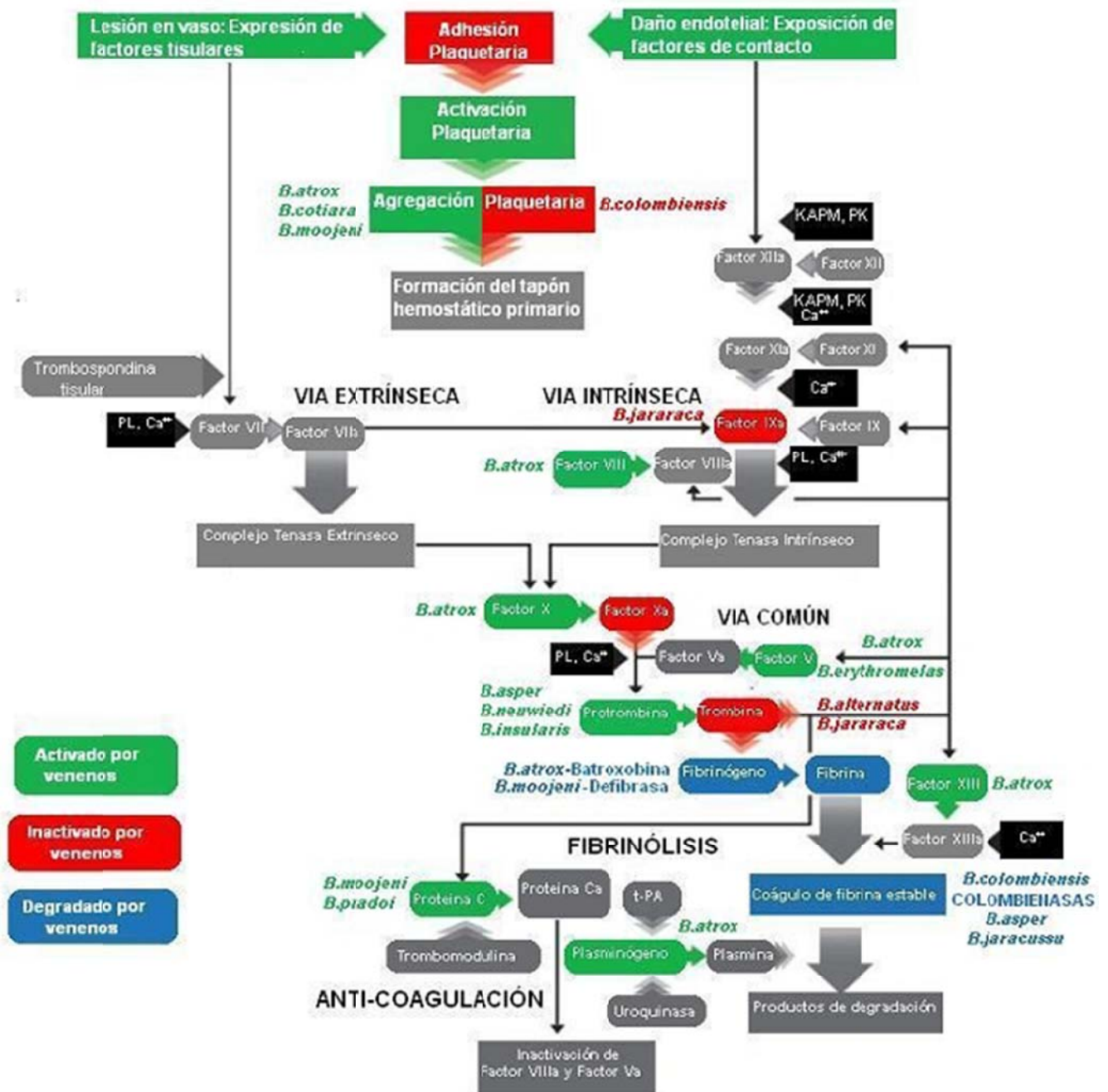


Figura 5 Esquema del sistema hemostático y los sitios de acción de algunos componentes de venenos bothróticos en dicho sistema (130).

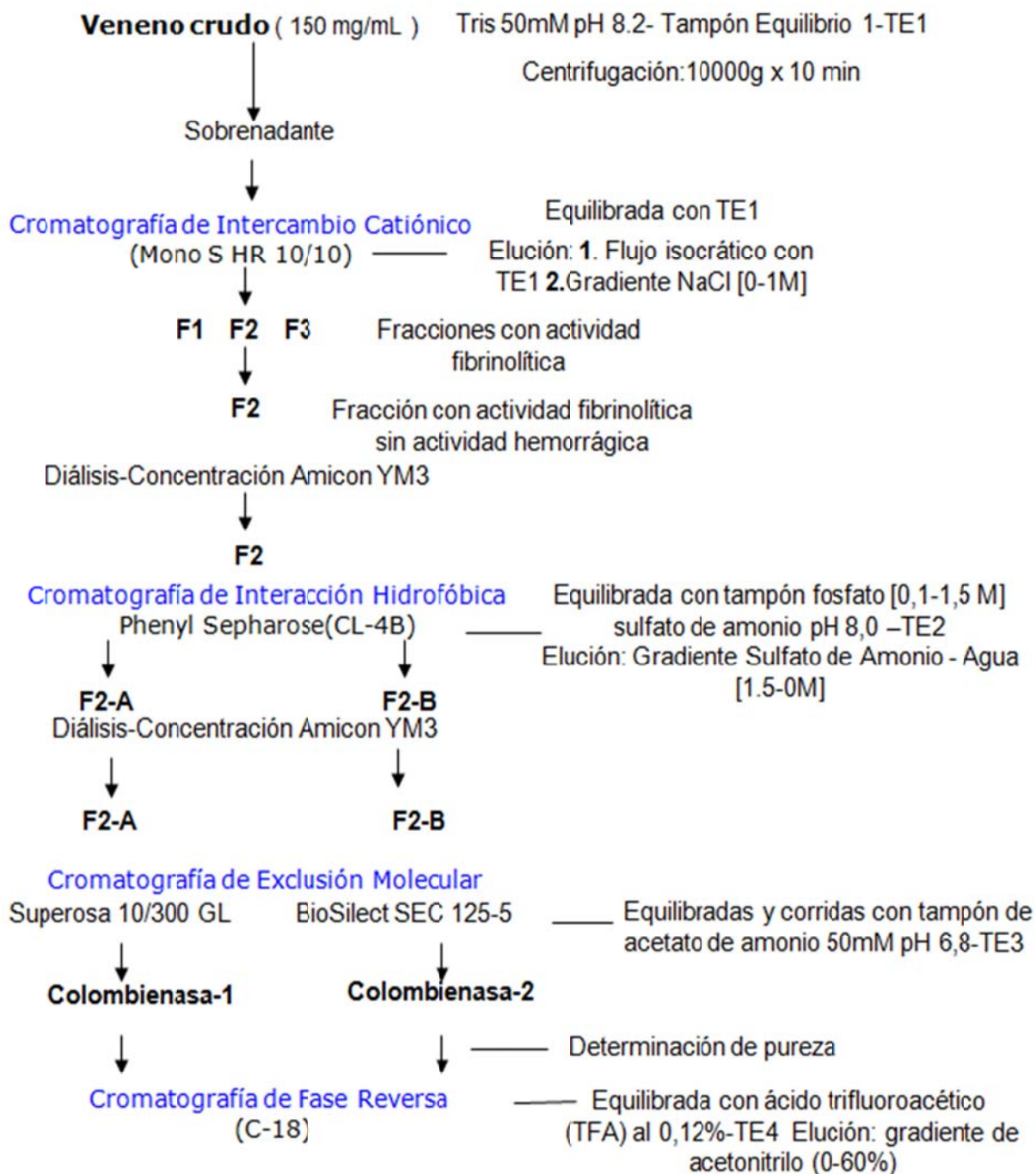


Figura 6. Esquema de fraccionamiento de veneno crudo de *B.colombiensis*-Caucagua para la obtención de fracciones purificadas con alta actividad fibrinolítica.

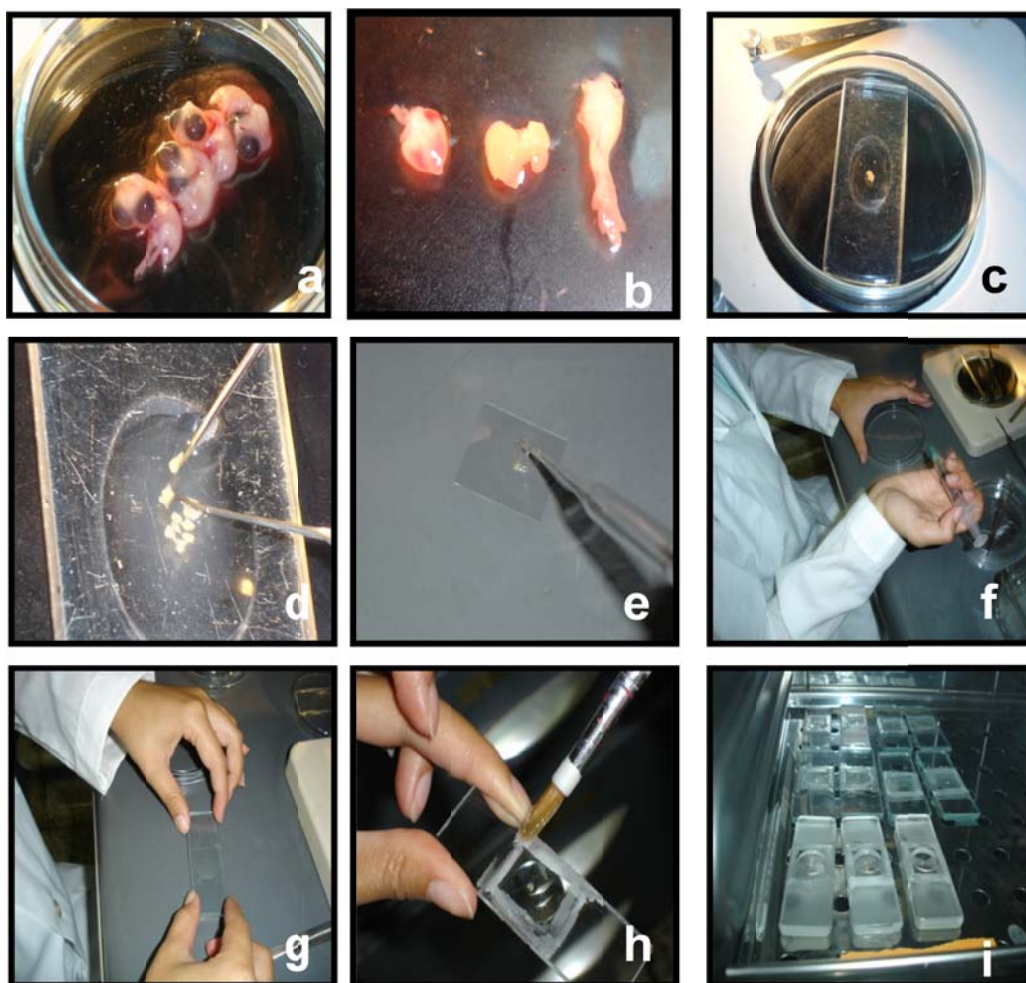


Figura 7. Montaje de Cultivos. Obtención de Monocapa. **a.** Embriones disecados. **b.** Corazón, hígado y miembro inferior de embrión de pollo. **c.** Explante de órgano. **d.** Dispersión de los explantes. **e.** Mezcla solución Tyrode: Plasma pollo. **f.** Selección del explante. **g.** Colocación en lámina excavada. **h.** Sellado de la lámina con parafina. **i.** Cultivo en estufa a 37°C (168).

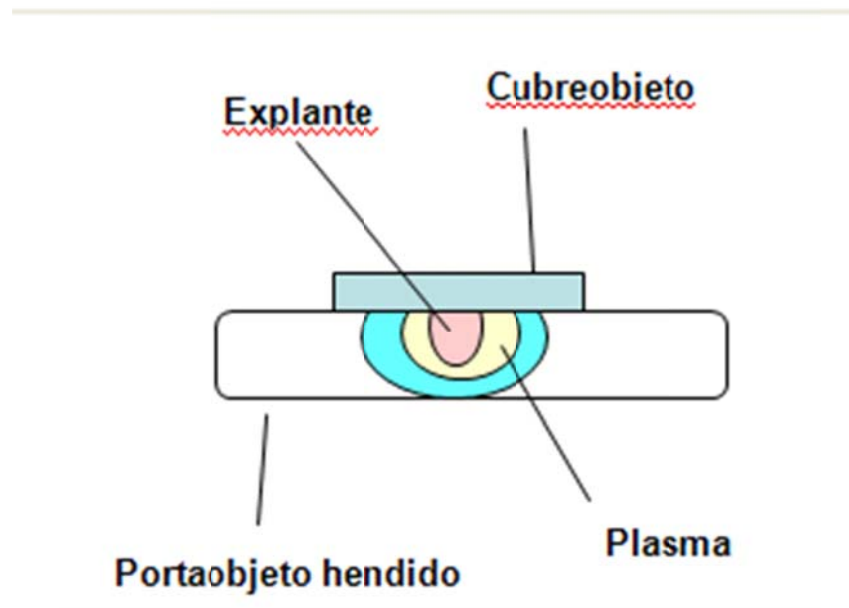
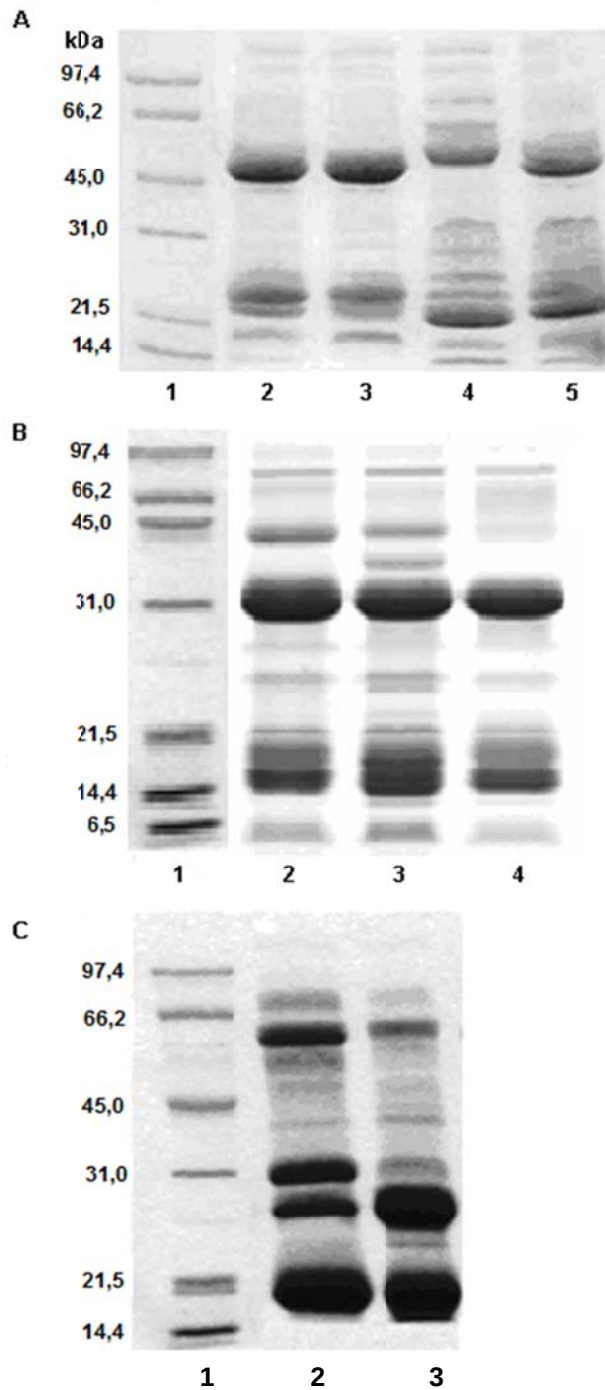


Figura 8. Cultivo en "gota pendiente". Método de cultivo celular *in vitro* que consiste en la obtención de una monocapa celular a partir de un fragmento de tejido o explante en oposición a la fuerza de gravedad. La monocapa se produce por la migración de las células del tejido hacia el sustrato (vidrio con plasma) y por la división de las mismas (168).



A Veneno de *B. atrox*. **Carril: 1.** Marcadores de peso molecular; **Venenos de localidades: 2.** Parguasa; **3.** Puerto Ayacucho 1; **4.** Serranía del Cuao; **5.** Puerto Ayacucho 2.

B Veneno de *B. venezuelensis*. **Carriles: 1.** Marcadores de peso molecular; **Venenos de localidades: 2.** Ávila; **3.** Baruta; **4.** La Boyera.

C Veneno de *B. colombiensis*. **Carriles: 1.** Marcadores de peso molecular; **venenos de Localidades: 2.** El Guapo **3.** Caucagua.

Figura 9. Perfil electroforético de venenos de *Bothrops* de diferentes especies y localidades. SDS-PAGE (12%) de venenos (50 µg) bajo condiciones reducidas. Coloración con azul de Coomassie.

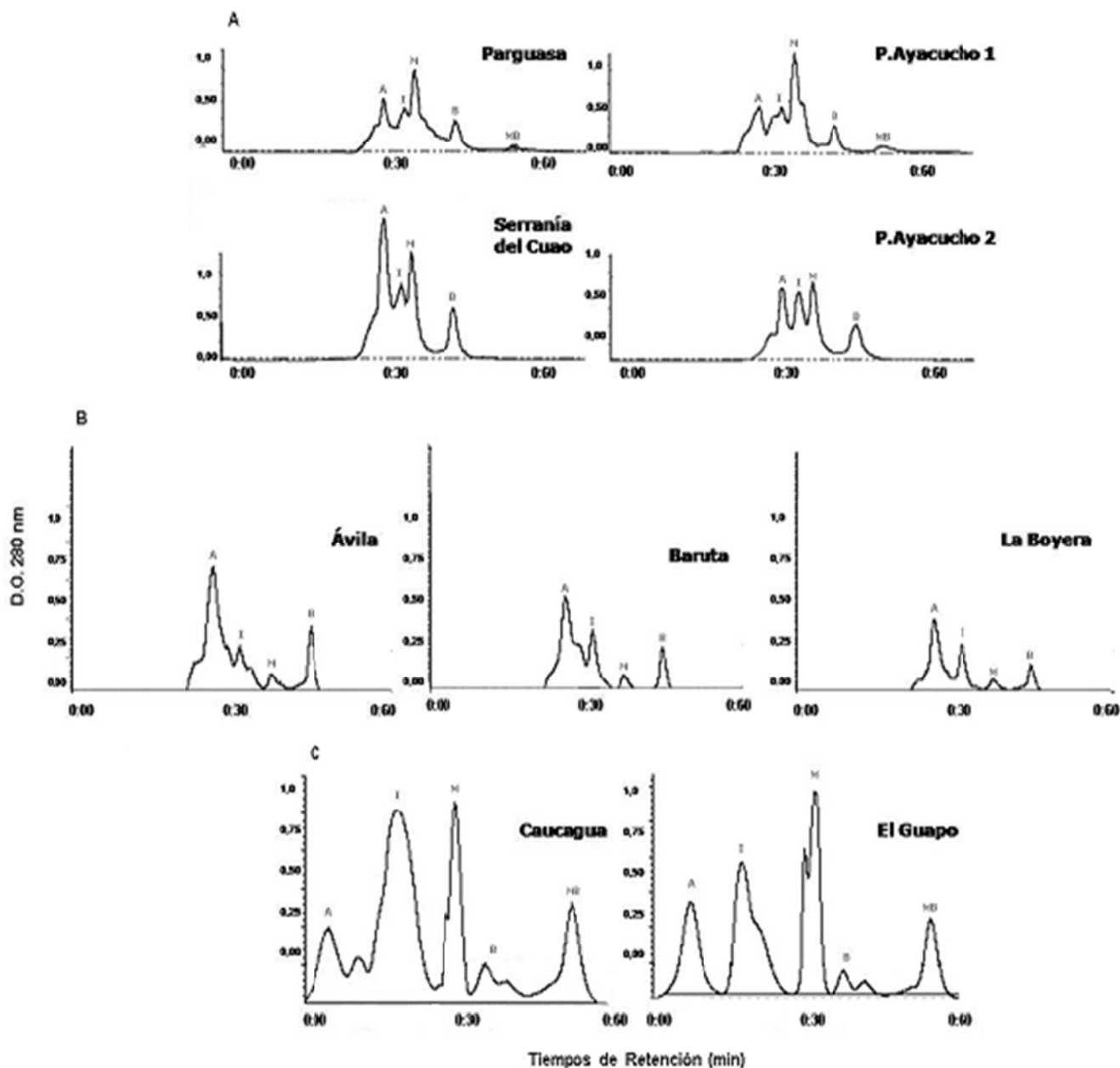


Figura 10. Cromatogramas obtenidos por exclusión molecular de venenos bothrópicos. *B. atrox*, columna: Protein-Pak™ 300 sw. Velocidad de flujo: 0,4 mL/min. *B. venezuelensis* y *B. colombiensis*, columna Superose H12-HR. Velocidad de flujo 0,3 mL/min. Tampón de equilibrio acetato de amonio 50 mM, pH 6,9. Densidad óptica a 280 nm.

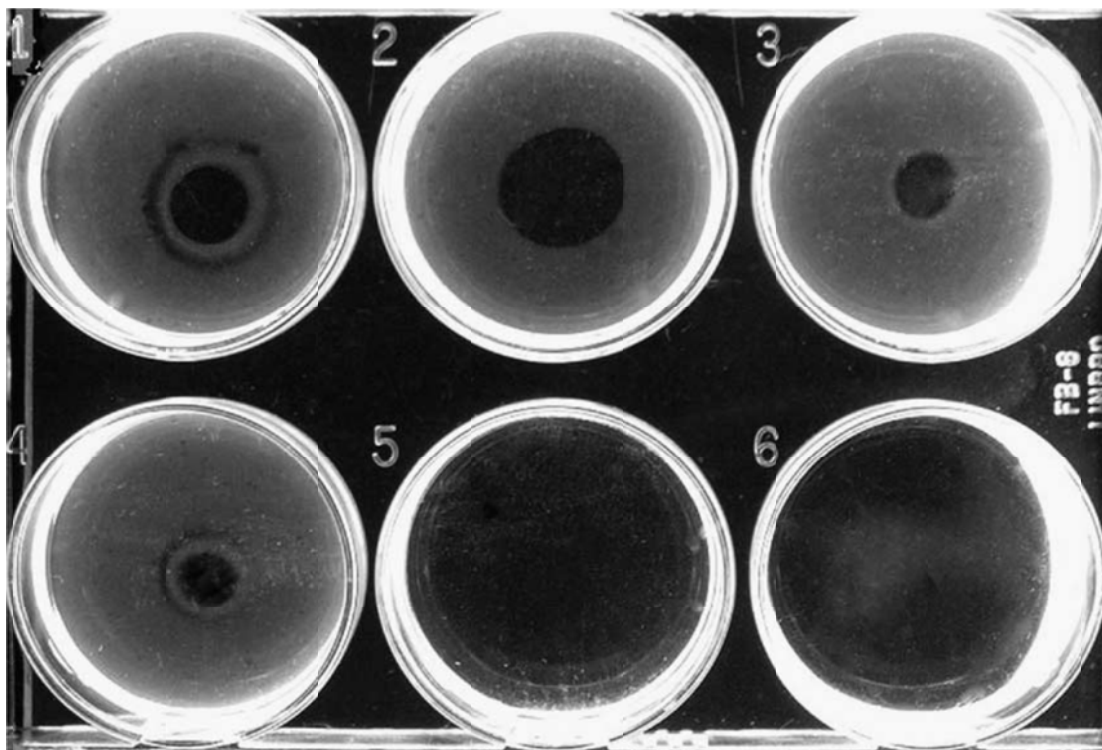


Figura 11. Actividad fibrinolítica del veneno de *B. atrox* (10 μg / placa de fibrina-plasminogeno⁺). Muestras: Localidades (1) Parguasa; (2) Puerto Ayacucho 1; (3) Serranía del Cuao; (4) Puerto Ayacucho-2; (5) Control positivo t-PA; (6) Control positivo Plasmina

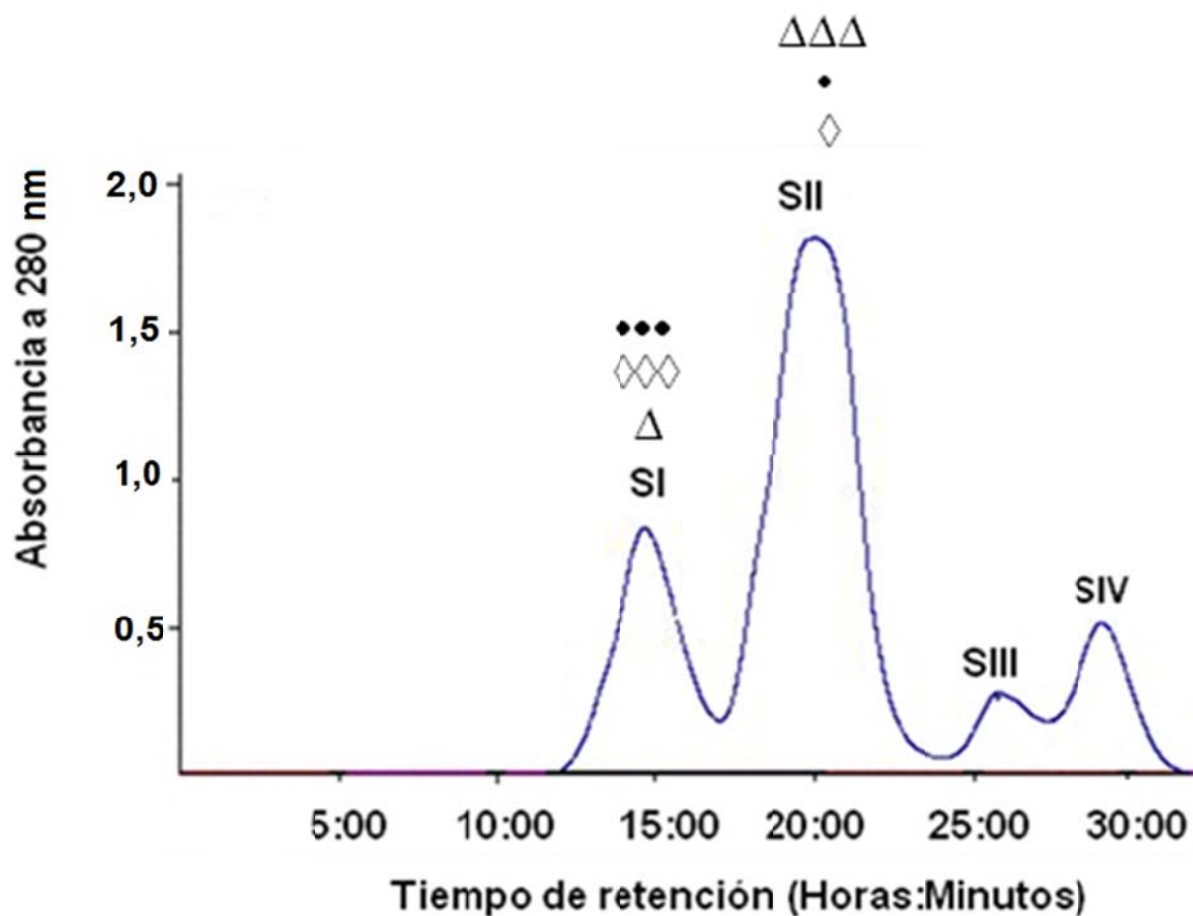


Figura 12. Cromatograma del veneno de *B. colombiensis* Cauagua (350 mg/4 mL) sobre la columna de Sephadex G-100 (2,5 X 97 cm) equilibrada con tampón acetato de amonio 50 mM, pH 6,9 Velocidad de flujo de 0,3 mL/min. Absorbancia a 280 nm. Actividades: (Δ) fibrinolítica, (•) coagulante y (◊) hemorrágica.

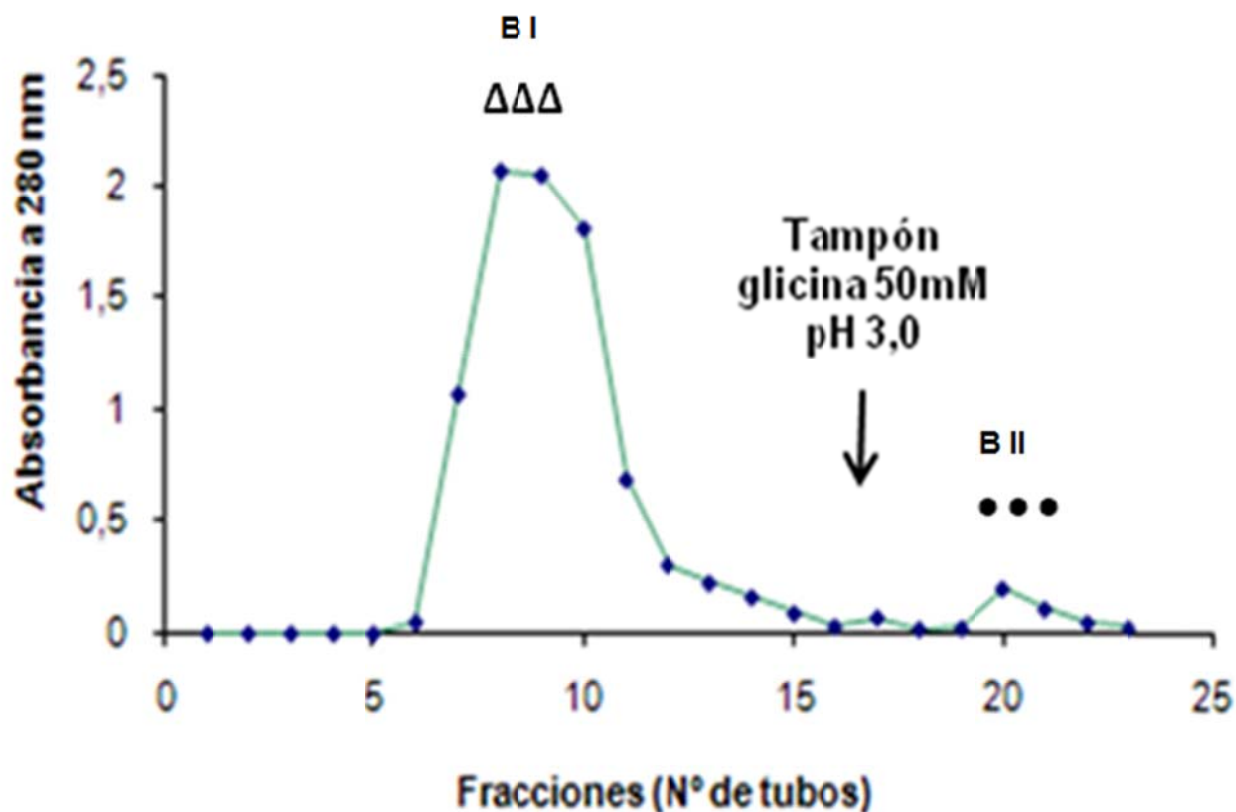


Figura 13. Cromatograma de la fracción SII obtenida del veneno *B. colombiensis* Caugagua (12 mg/1mL) sobre columna Benzamidine/Sepharose™ 4 Fast Flow (1 mL), equilibrada con tampón Tris-HCl 50 mM pH 7,4. Material retenido fue eluído con tampón glicina 50 mM, pH 3,0. Fracciones de 0,5 mL fueron neutralizadas con 50 μ L de tampón Tris 1M, pH 9,0. Velocidad de flujo de 1 mL/min. Actividades: (Δ) fibrinolítica y (•) coagulante.

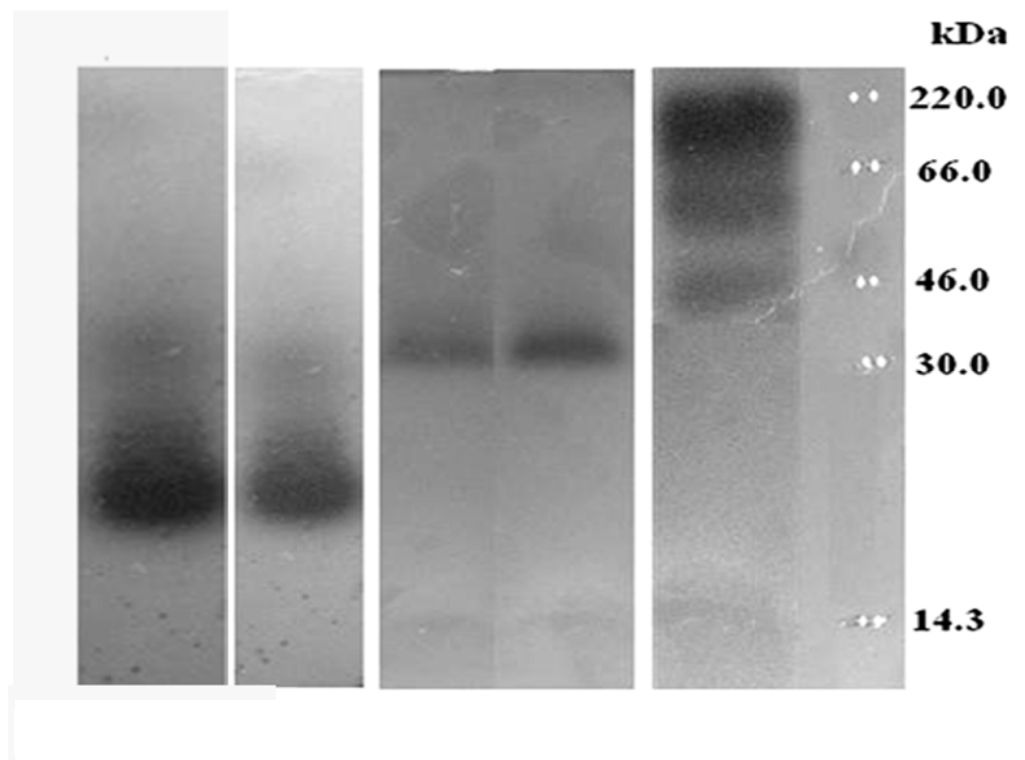


Figura 14. Zimograma de fibrina del veneno crudo de *B. colombiensis* y fracciones cromatográficas SII. Carriles: 1) veneno de Cauca; 2) veneno de El Guapo; 3) SII de Cauca; 4) SII de El Guapo; 5) Plasmina; 6) Marcadores de PM..

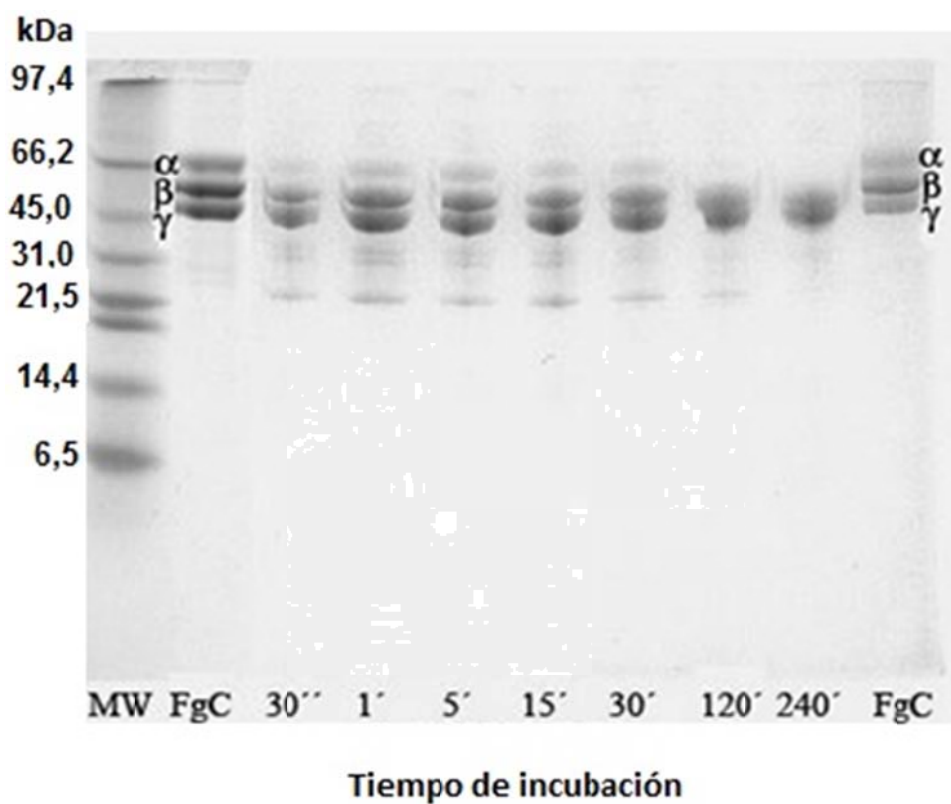


Figura 15. Actividad fibrinogenolítica de la fracción SII de veneno de *B.colombiensis*-Caucagua (Benzamidine Sepharose™ 4 Fast Flow) a la relación 100:1 y diferentes tiempos de incubación. Muestras (50 µg). Electroforesis en presencia de SDS (gel al 10%) en condiciones reducidas. Coloración con azul de Coomassie. MW: Marcadores de peso. FgC: Cadenas α, β y γ del Fg.

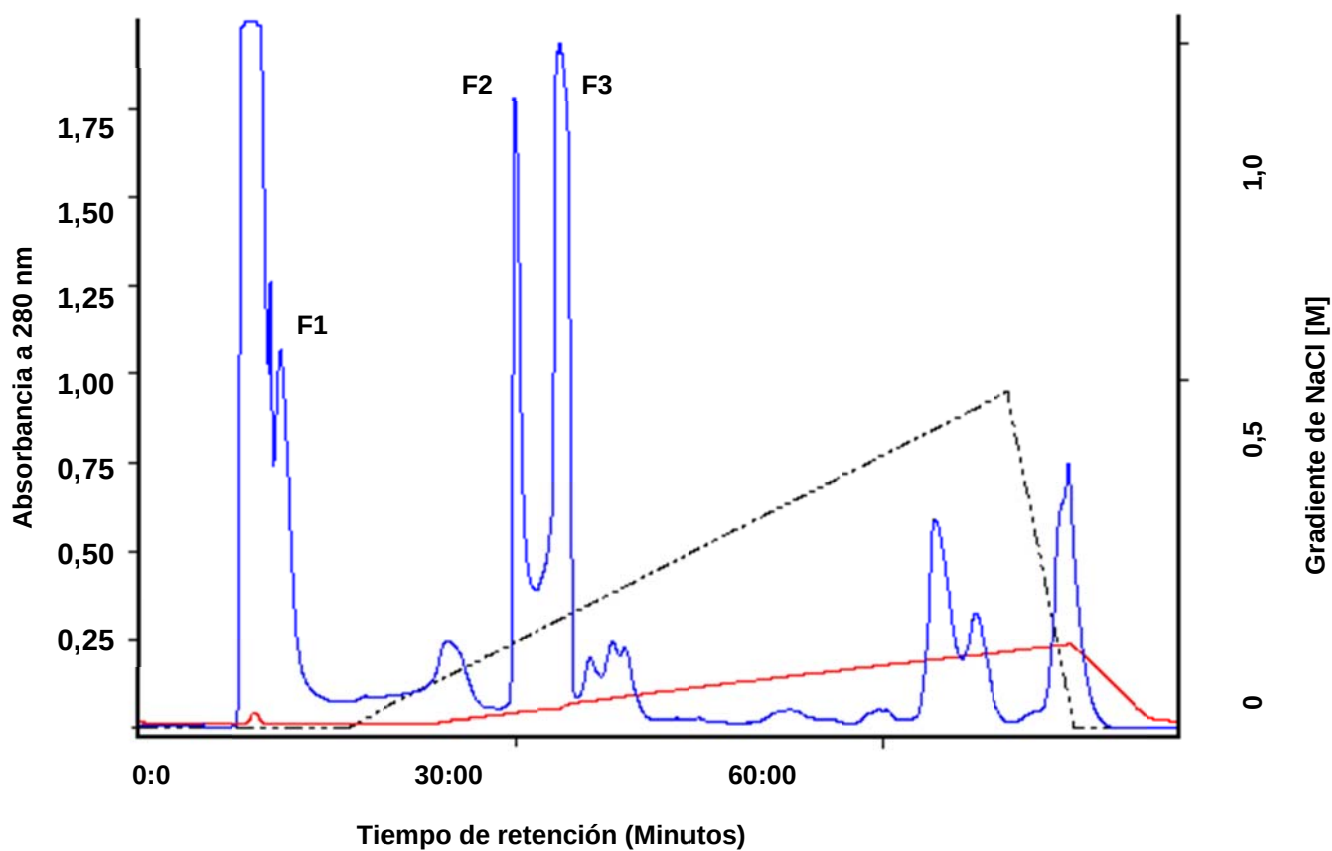


Figura 16. Cromatograma del veneno crudo de *B. colombiensis* (150 mg/1 mL) sobre columna de intercambio catiónico Mono S HR 10/10. Tampón de equilibrio Tris-HCl 50 mM, pH 8,2. Elución con un gradiente de NaCl de 0-1M. Velocidad de flujo de 1,5 mL/min. Fracciones de 1mL. Absorbancia a 280 nm. F1, F2 y F3: Fracciones con actividad Fibrinolítica.

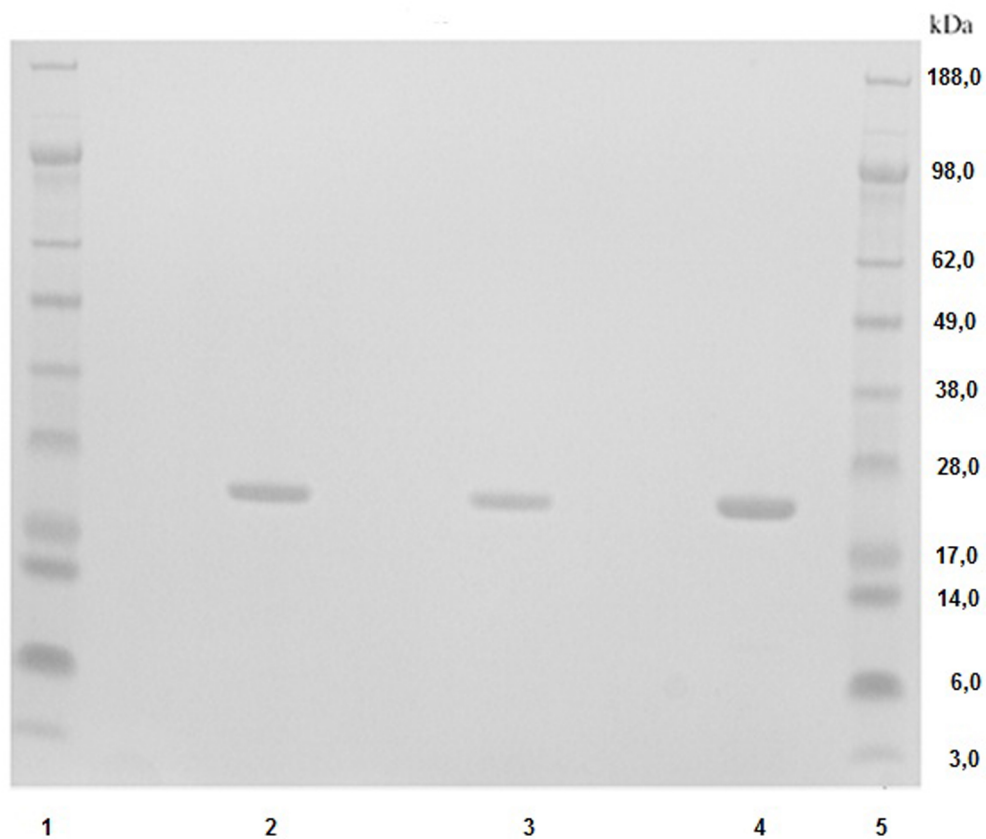


Figura 17. Perfil electroforético, SDS-PAGE (4-12%) en condiciones reducidas, de las fracciones F1, F2 y F3 (10 μ g) provenientes de cromatografía de intercambio catiónico de veneno de *B. colombiensis*. Coloración con azul Coomassie. **Carriles: 1 y 5.** Marcadores de PM de amplio rango (See Blue Plus 2-Invitrogen); **2) F2; 3) F1; 4) F3.**

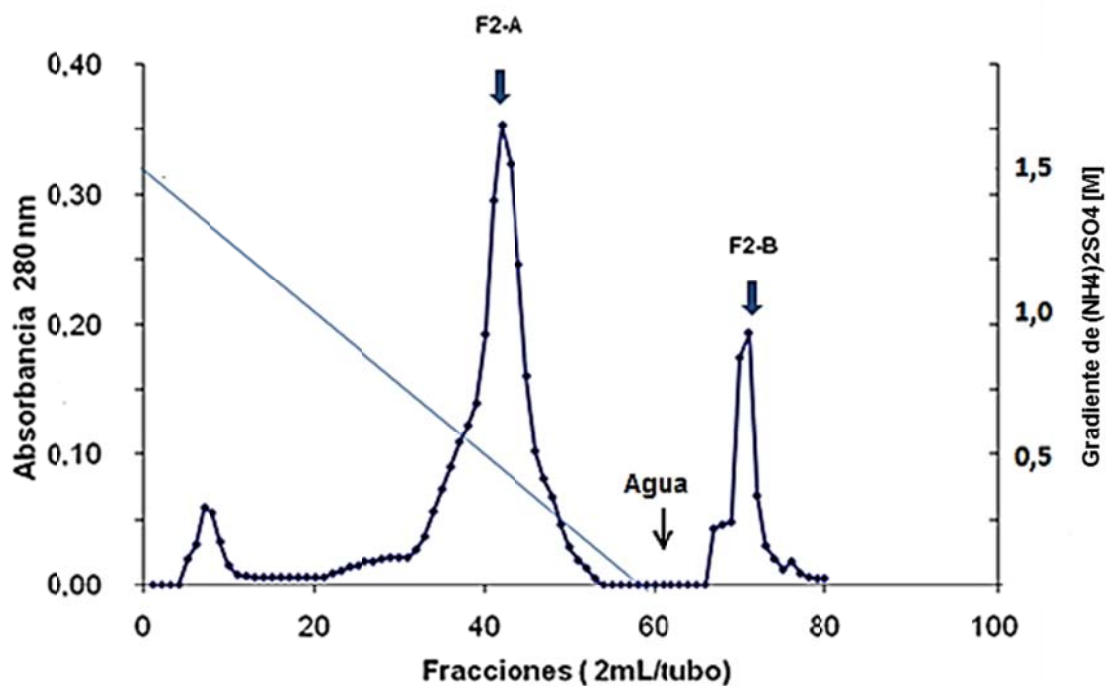


Figura 18. Cromatograma de F2 por columna de Phenyl Sepharose CL-4B (13 mg/1,5 mL). Tampón de equilibrio: fosfato 0,1 M + sulfato de amonio 1,5 M, pH 8,0. Elución con un gradiente lineal (1,5-0 M) de sulfato de amonio, seguido de agua. Velocidad de flujo 1,0 mL/min. Fracciones de 2 mL. F2-A y F2 -B: Fracciones con actividad fibrinolítica.

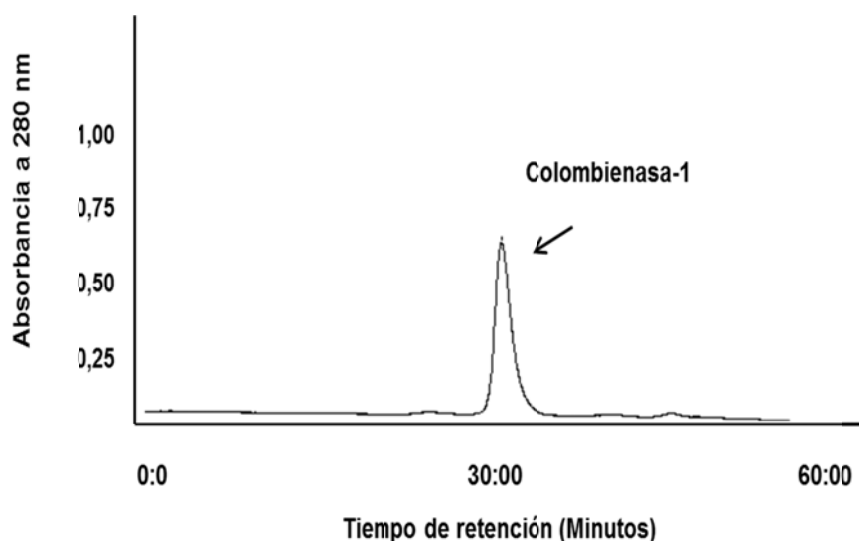


Figura 19. Cromatograma de F2-A (1,3 mg/100 µL) por columna de exclusión molecular Superose 12 10/300GL. Tampón de equilibrio acetato de amonio 50 mM, pH 6,8. Velocidad de flujo de 0,5 mL/min. Fracciones de 0,25 mL. La flecha (←) muestra la fracción con actividad fibrinolítica.

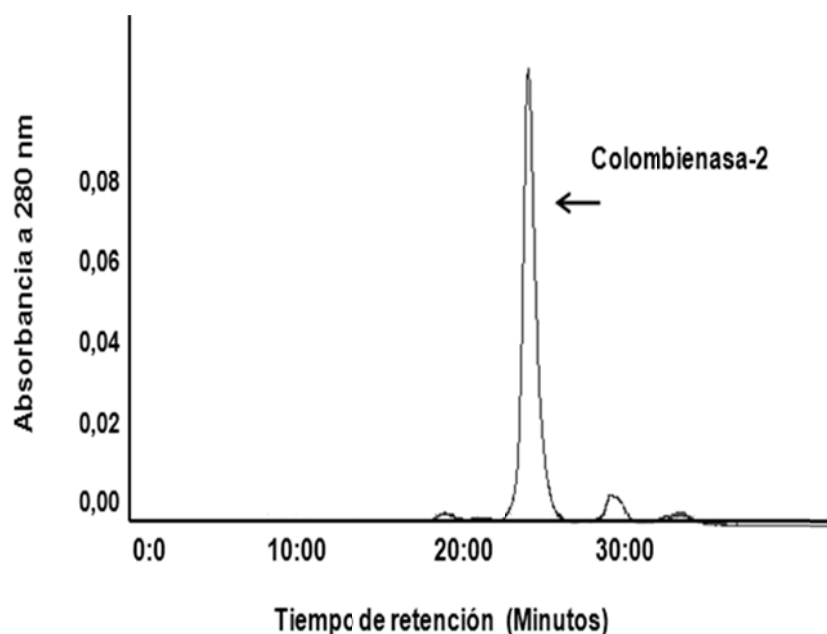


Figura 20. Cromatograma de F2-B (1,3 mg/50 µL) sobre columna de exclusión molecular Bio-Silect SEC 125-5 (Bio-Rad). Tampón de equilibrio acetato de amonio 50 mM, pH 6,8. Velocidad de flujo de 0,4 mL/min. Fracciones de 0,25 mL. La flecha (←) muestra la fracción con actividad fibrinolítica.

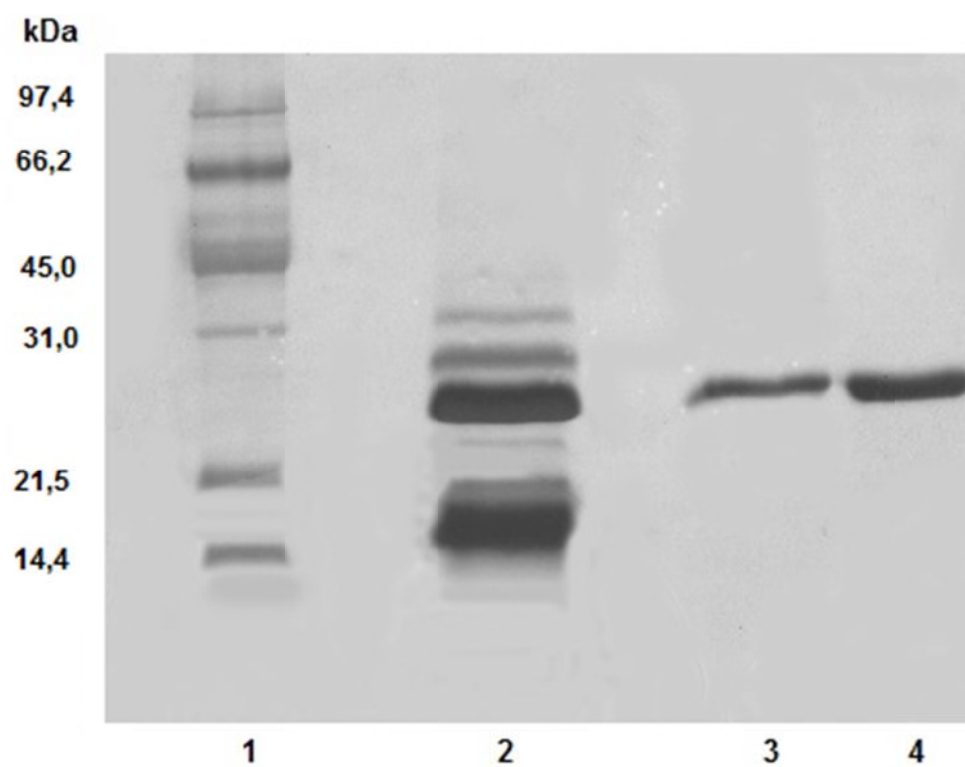


Figura 21. Perfil electroforético de las Colombienasa-1 y Colombienasa-2. SDS-PAGE en Gel al 15%, en condiciones reducidas, tinción con nitrato de plata. Carriles: **1:** Marcadores de PM; **2:** fracción F2 (22 µg); **3:** Colombienasa-1 (3 µg); **4:** Colombienasa-2 (4 µg).

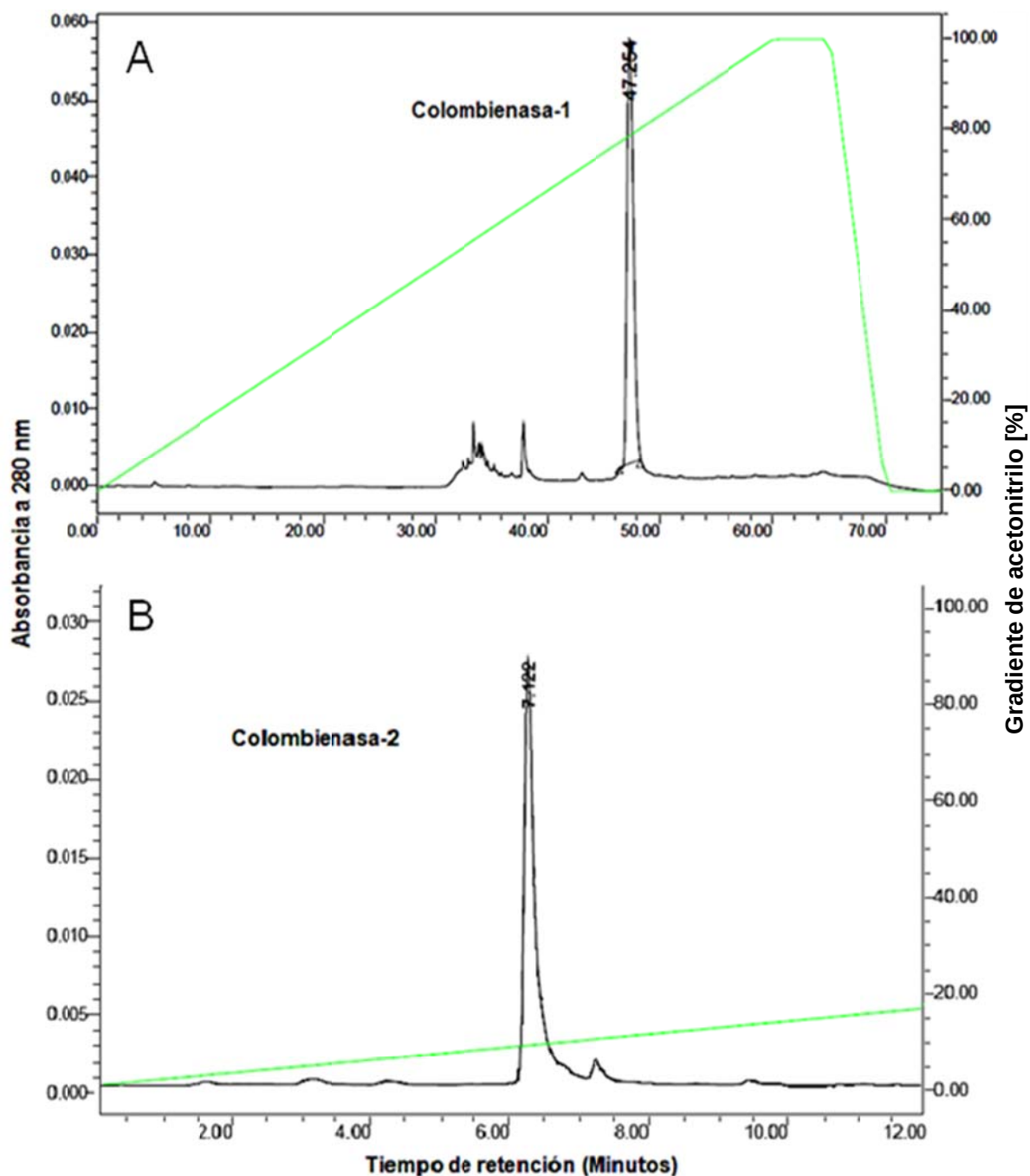


Figura 22. Cromatogramas de las fracciones Colombienasa-1 y Colombienasa-2 por columna Simmetry® C-18 por CLAR-RP, de (A): Colombienasa-1 (26,1 µg/200 µL de TFA 0,12%) y (B): Colombienasa-2 (7,23 µg/ 200 µL de TFA 0,12%). Elución: Tampón A: 0,12% TFA en agua; Tampón B: 60% de acetonitrilo y 40% de TFA al 0,12% en 60 minutos. Elución a una velocidad de flujo de 1 mL/min y a temperatura ambiente.

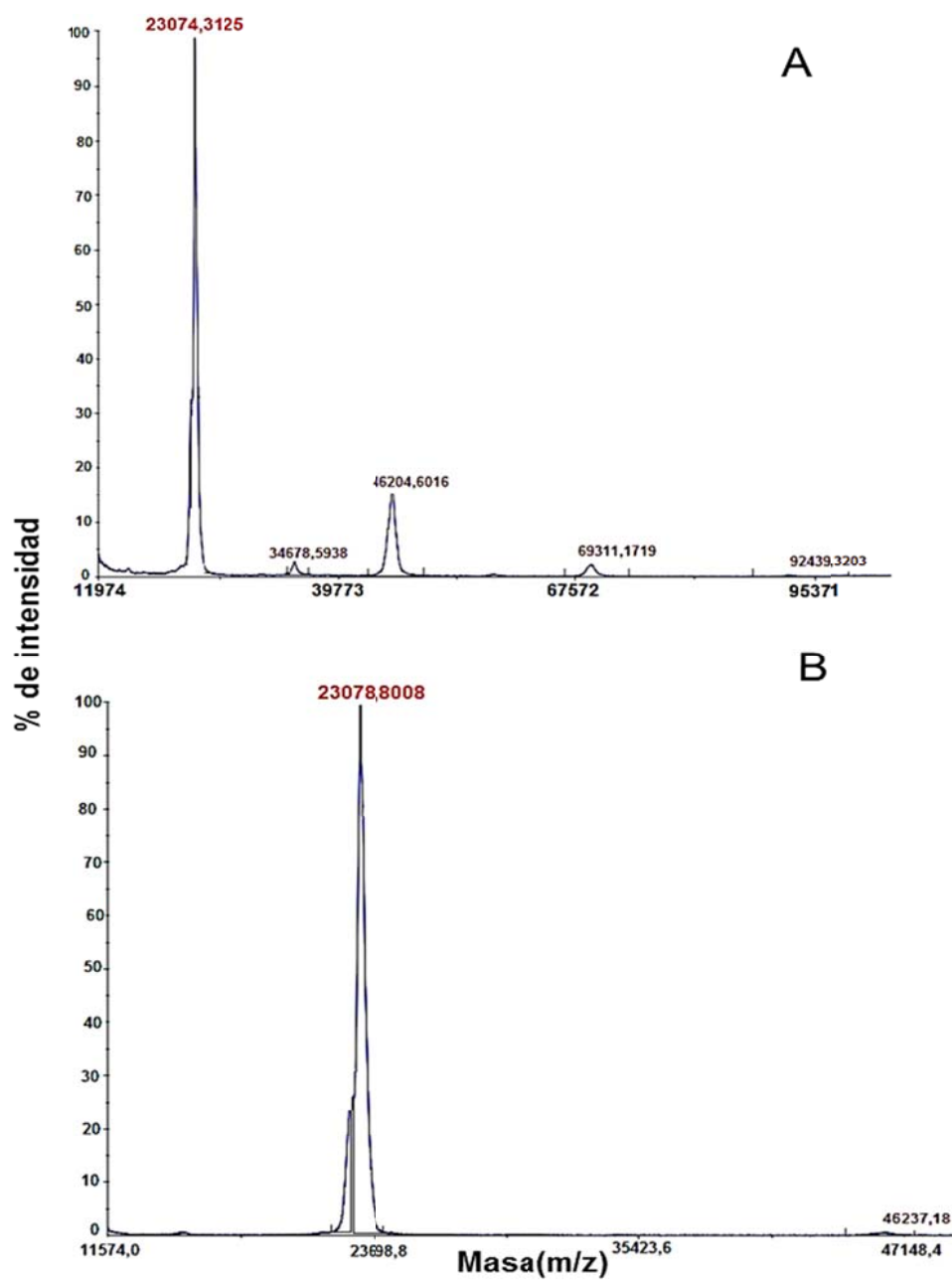


Figura 23. Masa molecular determinada por MALDI TOF-TOF de Colombienasas. **A.** Colombienasa - 1 de 23.074,31 Da. **B.** Colombienasa - 2 de 23.078,80 Da.

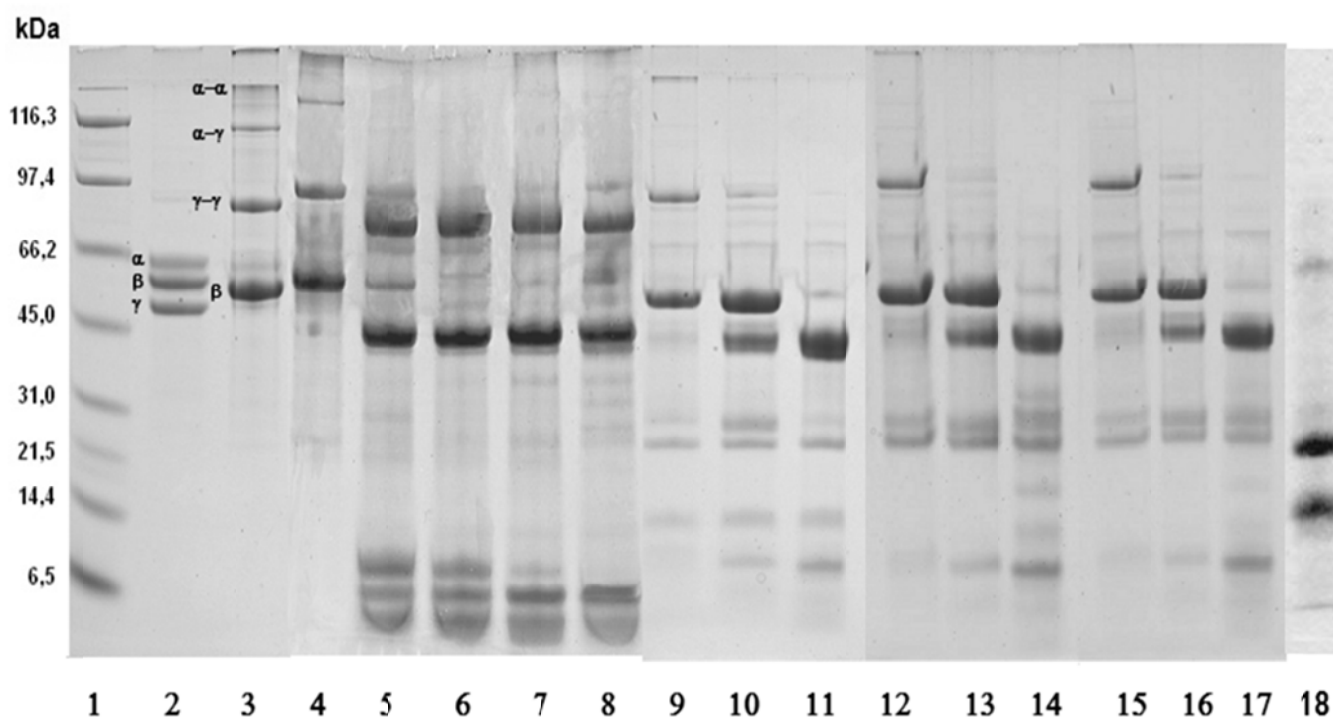
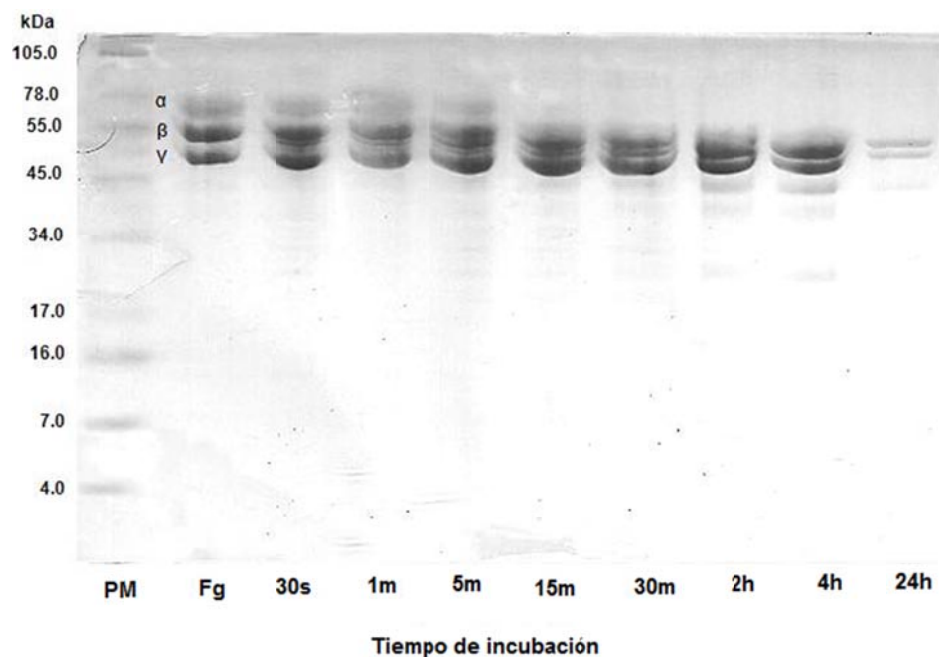
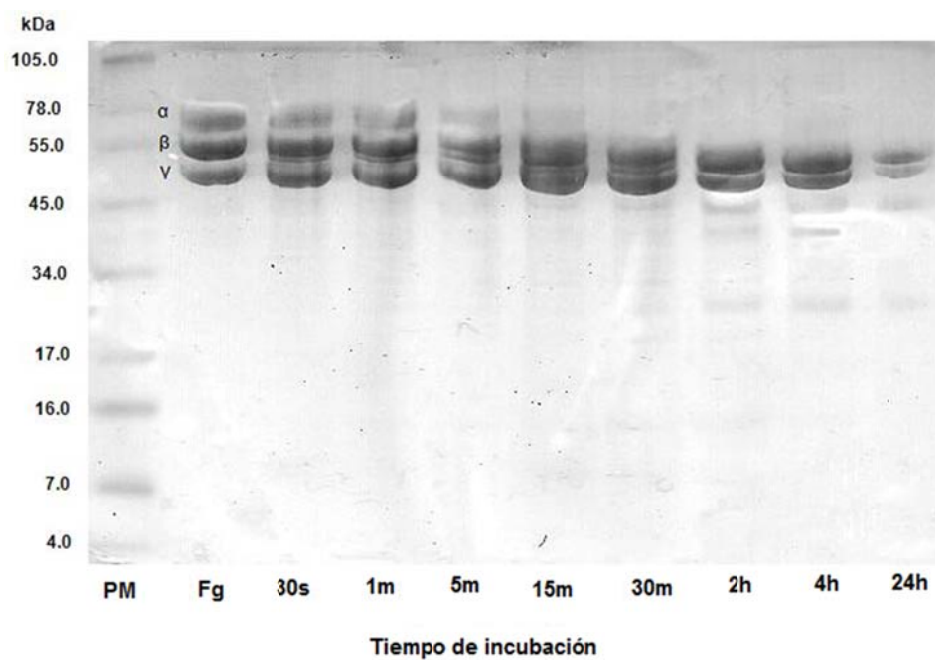


Figura 24. Degradación de fibrina XLX por veneno de *B. colombiensis* y las Colombienasas 1 y 2. PAGE-SDS (Tris/Tricina) al 7% en condiciones reducidas. **1.** Marcadores de PM; **2.** Cadenas del Fg- 30 µg, **3.** Fibrina XLX- 60 µg, **4-8.** Fibrina XLX (60 µg) + Plasmina (2 µg) a 0, 30 y 90 minutos, 3 y 24 h de incubación, respectivamente; **9-11.** Fibrina XLX (60 µg) + Veneno de *B. colombiensis* (5 µg) a 30 minutos, 4 y 24 h de incubación, respectivamente; **12-14.** Fibrina XLX (60 µg) + Colombienasa-1 (5 µg) a 30 minutos, 4 y 24 h de incubación, respectivamente, **15-17.** Fibrina XLX (60 µg) + Colombienasa-2 (5 µg) a 30 minutos, 4 y 24 h de incubación, respectivamente. **18.** Veneno crudo de *B. colombiensis* (5 µg). Coloración con Azul de Coomassie.



A



B

Figura 25. Actividad fibrinogenolítica de las Colombienasas-1 (A) y Colombienasa- 2. (B), a la relación 100:0.1 y a 37°C y diferentes tiempos de incubación. SDS-PAGE (Tris/Tricina) al 10% en condiciones reducidas. Fg (25 µg), Coloración Azul de Coomassie.

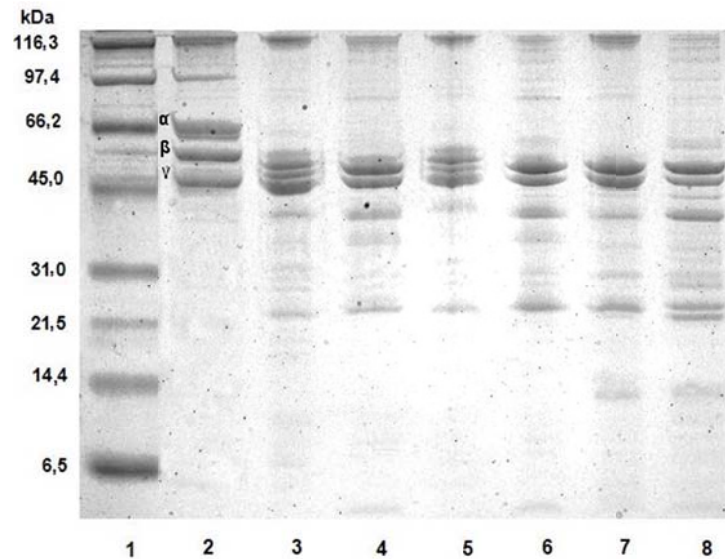


Figura 26. Actividad fibrinogenolítica de Colombienasa -1. SDS-PAGE (Tris/tricina) gel al 10% en condiciones reducidas. Los carriles muestran: **1.** Marcadores de PM; **2.** Cadenas de Fg (25 µg/carril); **3 y 4.** Fibrinógeno incubado con Colombienasa-1.: a la relación 100:0,5 por 5 y 60 minutos; **5-6:** a la relación 100:1 por 5 y 60 minutos; **7-8:** a la relación 100:5 por 5 y 60 minutos, respectivamente. Coloración de Azul de Coomassie.

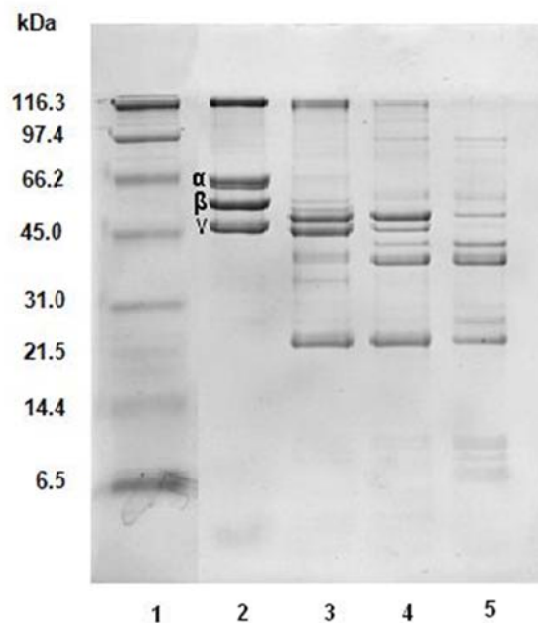


Figura 27. Actividad fibrinogenolítica de Colombienasa -2 a la relación 100:1. SDS-PAGE (Tris/tricina) gel al 10% en condiciones reducidas. **1.** Marcadores de PM; **2.** Cadenas de Fg (25 µg/carril); **3-5:** Fibrinógeno incubado con Colombienasa-2 durante 5, 30 y 120 minutos respectivamente. Coloración de Azul de Coomassie.

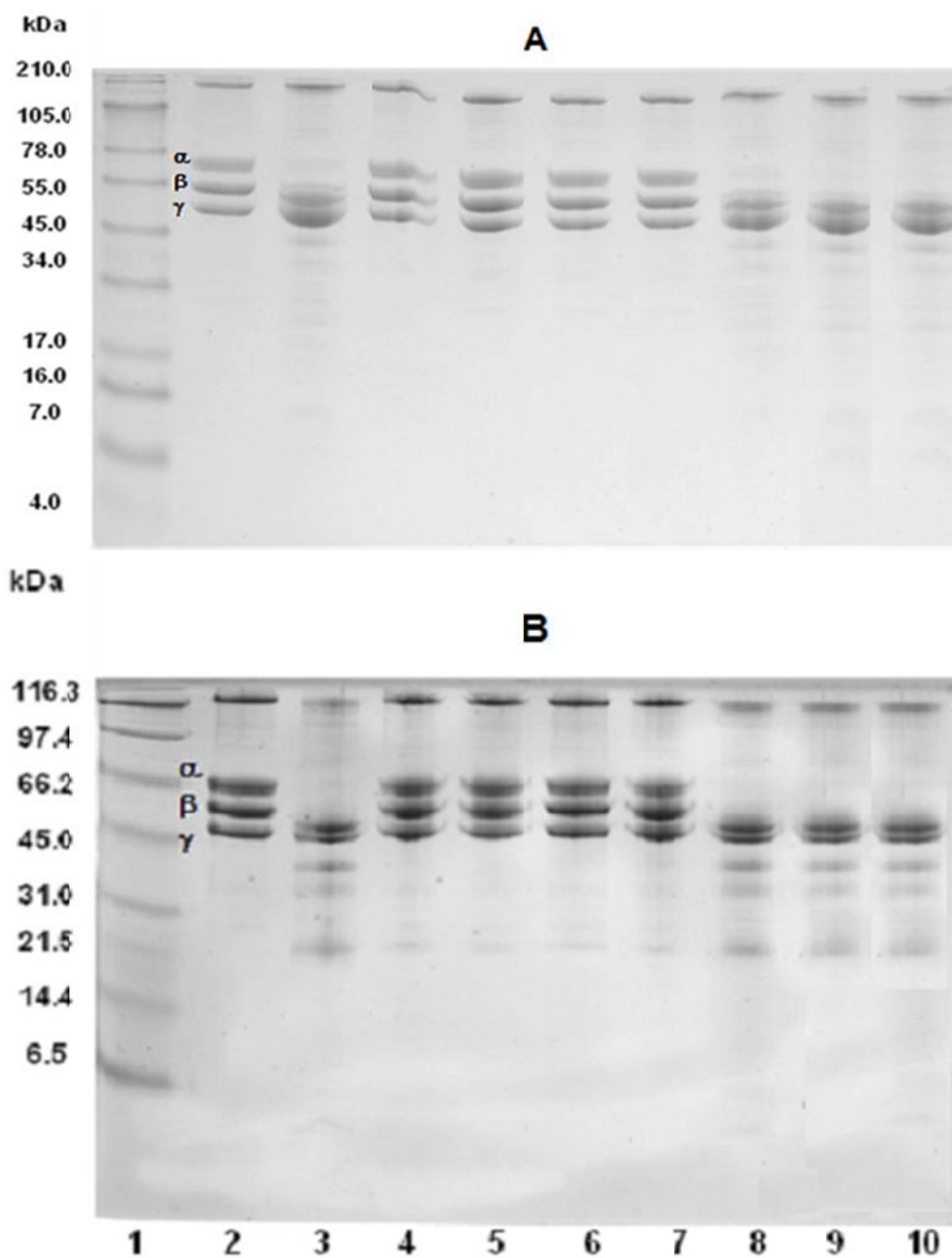


Figura 28. Actividad fibrinogenolítica de las Colombyenases -1 y 2, a la relación 100:0,2 y 30 min de incubación, en presencia de inhibidores de proteasas. SDS-PAGE (Tris/tricina) en gel al 10% en condiciones reducidas. **A.** Colombyenasa 1; **B.** Colombyenasa 2. Líneas 1. Marcadores de PM; 2: Cadenas del Fg; 3-10: Fg + Colombyenasa: 3: Sin inhibidores; 4: +EDTA 10mM; 5: +EGTA 10mM; 6: +1,10 fenantrolina 10mM; 7: +DTT 2mM; 8: +Benzamidina 10mM; 9: + PMSF 10mM; 10: + Aprotinina 100UI/mL. Tiempo de pre-incubación con los inhibidores: 30 min. Coloración de Azul de Coomassie.

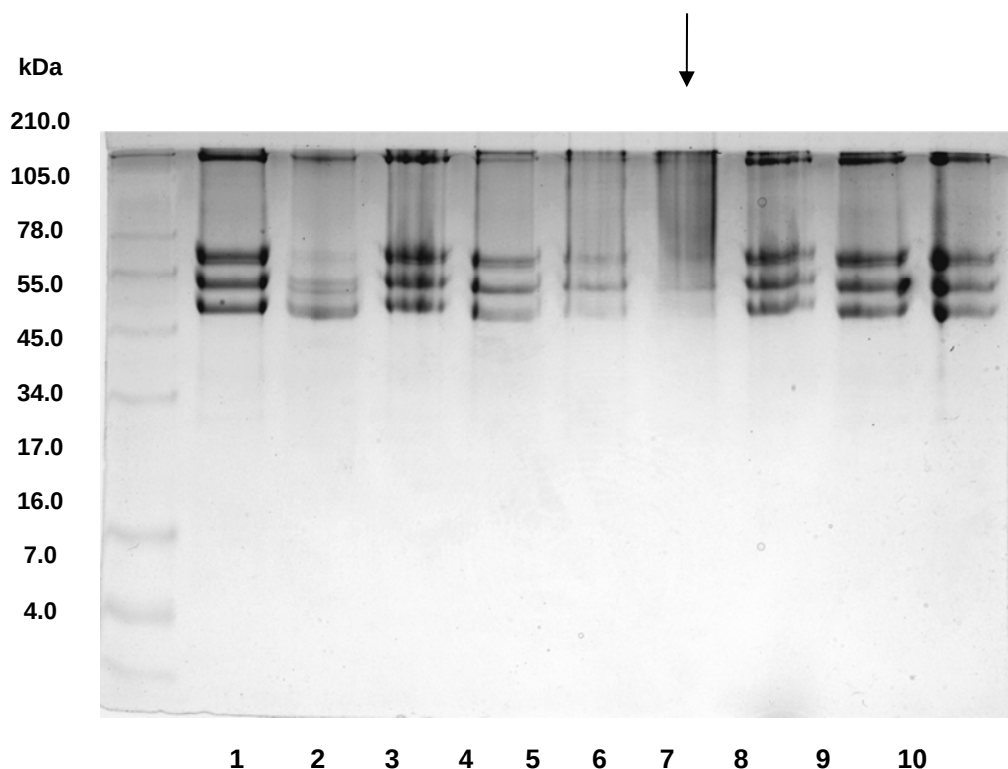


Figura 29. Actividad fibrinogenolítica de Colombienasa -1 en la relación 100:0,1, 30 min de incubación, en presencia de inhibidores de proteasa y de iones metálicos. SDS-PAGE (Tris/tricina) gel al 10% en condiciones reducidas. Lineas: **1.** Marcadores de PM; **2:** Cadenas del Fg (25 µg); **3-10:** Fg+Colombienasa-1: **3:** Sin inhibidores, **4** + EDTA 10mM; **5:** +EDTA 10mM +2,5 mM Zn; **6:** +EDTA 10mM +5 mM Zn; **7:** +EDTA 10m +10 mM Zn; **8:** +EDTA 10mM +2.5 mM Ca; **9:** +EDTA 10mM +5.0 mM Ca; **10:** 1+EDTA 10mM +10 mM Ca. Coloración de Azul de Coomassie. La flecha muestra como el ion Zn (10 mM) revierte el efecto del inhibidor (). →

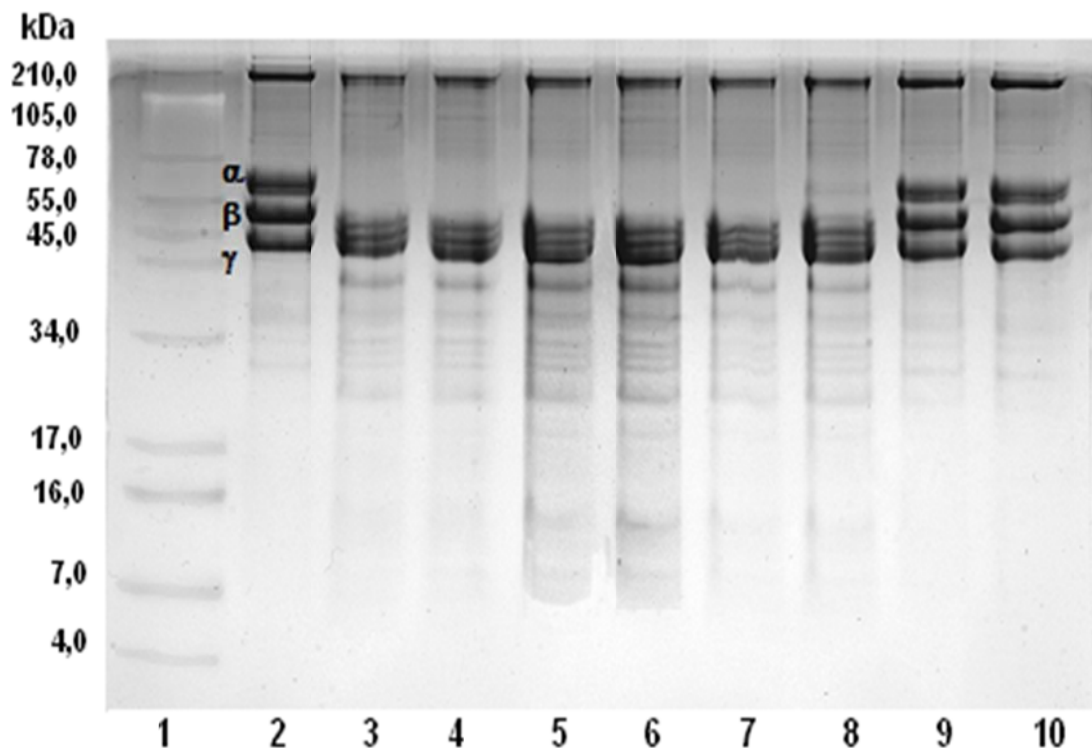


Figura 30. Actividad fibrinogenolítica de Colmbienasa -1, a la relación 100:0,2 y 30 min de incubación a diferentes temperaturas. SDS-PAGE (Tris/tricina) gel al 10% en condiciones reducidas. Líneas: **1.** Marcadores de PM; **2:** Cadenas del Fg (25µg); **3-10:** Fg + Colmbienasa-1: **3-4:** incubación a 4°C por 30 min y 2 h; **5-6:** incubación a 25°C por 30 min y 2 h; **7-8:** incubación 37°C por 30 min y 2 h; **9-10:** incubación a 56°C por 30 min y 2 h, respectivamente. Coloración de Azul de Coomassie.

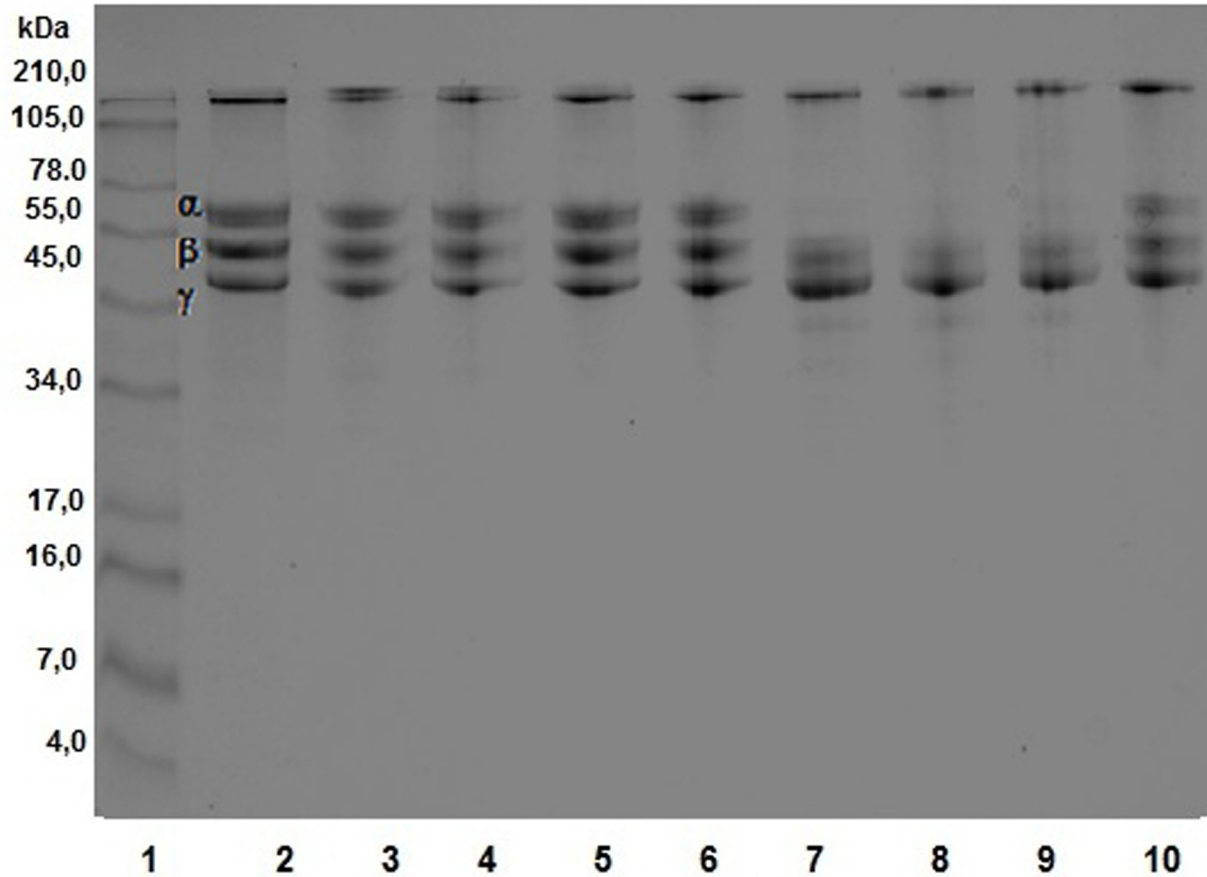


Figura 31. Actividad fibrinogenolítica de Colombienasa-2, a la relación 100:1, incubación por 30 minutos a 25 °C y diferentes pHs. SDS-PAGE (Tris/tricina) gel al 10% en condiciones reducidas. Los carriles muestran: 1. Marcadores de PM; 2: Cadenas del Fg (25 μ g); 3-10: Fg + Colombienasa-2, preincubada a pH 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 y 10 respectivamente. Coloración de Azul de Coomassie.

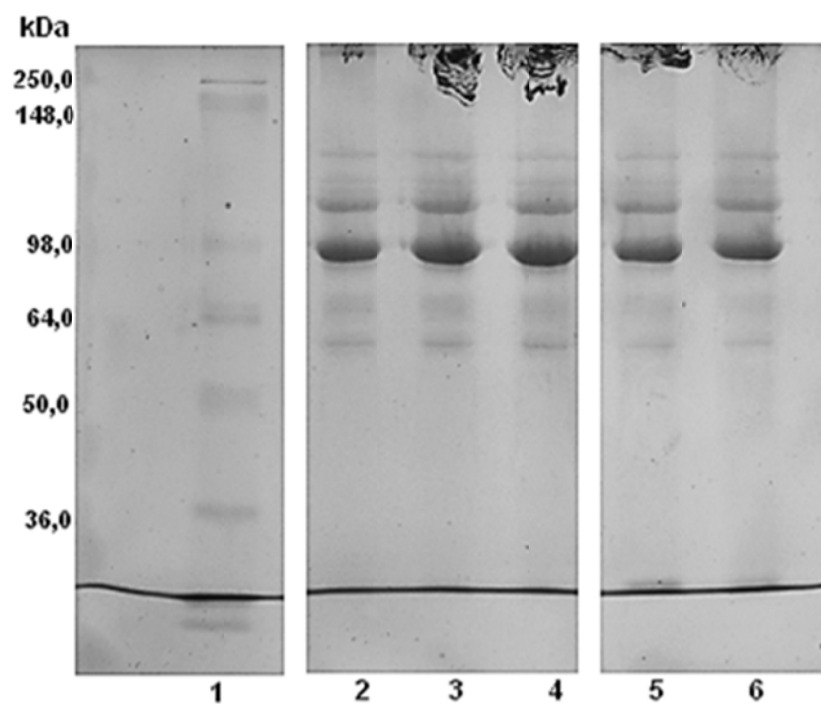


Figura 32. Efecto de la Colombyenasa-1 sobre el colágeno tipo IV de membranas basales de placenta humana. Relación 50:1 y 25 °C. SDS-PAGE (Laemmli) Gel en gradiente 5-10% y condiciones reducidas. Carriles: **1:** Marcadores de PM; **2-6:** 40 µg de colágeno tipo IV: **2:** fresco, **3:** 2 h de incubación a 25°C; **4:** 24 h de incubación a 25°C; **5:** + 0,8 µg Colombyenasa-1, 2 h de incubación a 25°C, **6:** + 0,8 µg Colombyenasa-1, 24 h de incubación a 25°C. Coloración con azul de Coomassie.

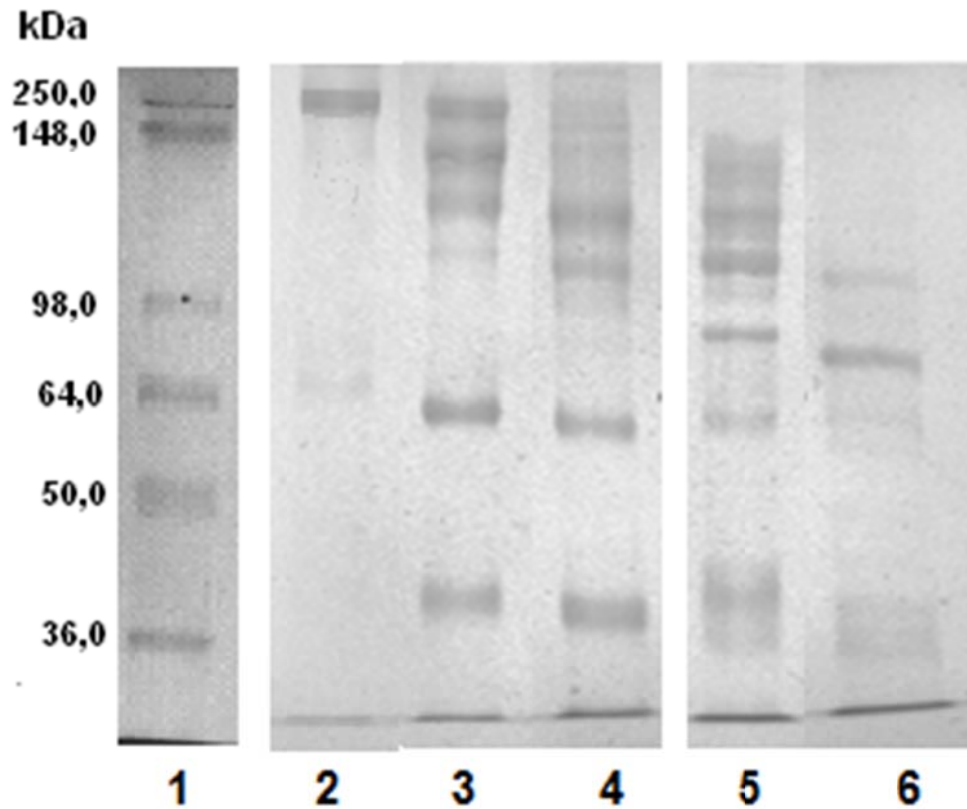


Figura 33. Efecto de la Colmbienasa-1 sobre la fibronectina plasmática humana. Relación 50:1 y 37 °C. SDS-PAGE (Laemmli) gel al 7.5% en condiciones reducidas. Carriles: **1:** Marcadores de PM; **2-6:** 5 µg de fibronectina: **2:** fresca; **3:** 2 h de incubación a 37 ° C; **4:** 24 h de incubación a 37 ° C; **5:**+ Colmbienasa-1 por 2 h de incubación a 37 ° C; **6:** + Colmbienasa-1 por 24 h de incubación a 37 ° C. Coloración con azul de Coomassie.

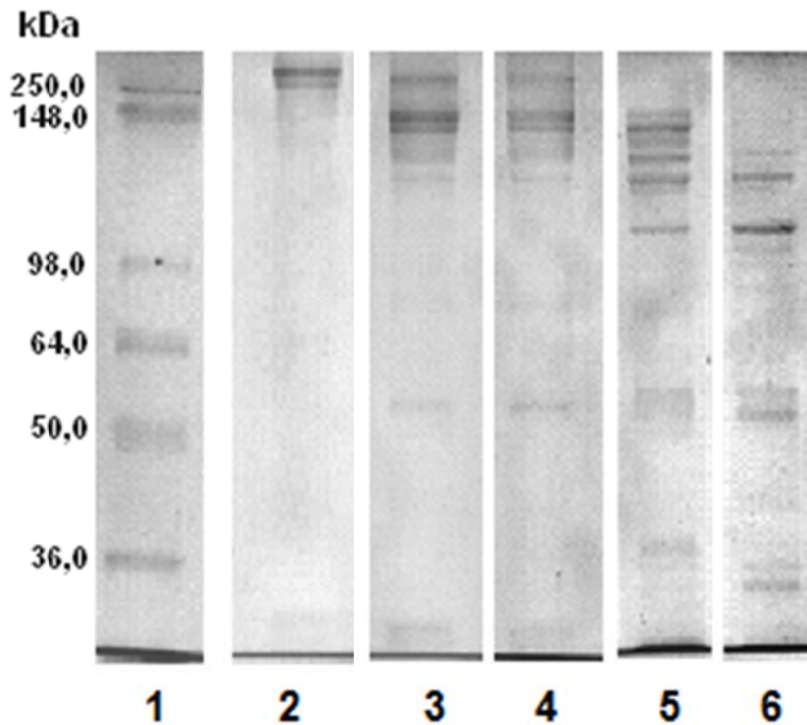


Figura 34. Efecto de la Colombyenasa-2 sobre la fibronectina plasmática humana. Relación 50:1 y 37 °C. SDS-PAGE (Laemmli) gel al 7.5% en condiciones reducidas. Carriles: **1:** Marcadores de PM; **2-6:** 5 µg de fibronectina: **2:** fresca; **3:** 2 h de incubación a 37 ° C; **4:** 24 h de incubación a 37 ° C; **5:**+ Colombyenasa-2 por 2 h de incubación a 37 ° C; **6:** + Colombyenasa-2 por 24 h de incubación a 37 ° C. Coloración con azul de Coomassie.

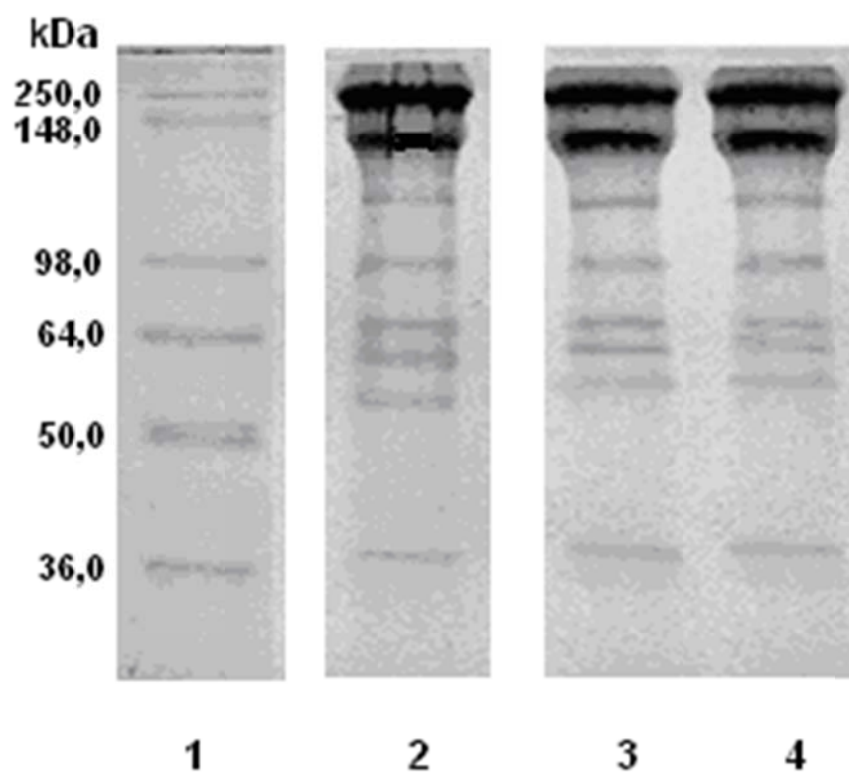


Figura 35. Acción de la Colombienasa-1 sobre la laminina de membranas basales de sarcomas murino. Relación 50:1 y 37 °C. SDS-PAGE (Laemmli) gel al 7,5% en condiciones reducidas. Carriles: **1:** Marcadores de PM; **2-4:** 15 µg de laminina: **2:** fresca; **3:** + Colombienasa-1 a 2 de incubación; **4:** + Colombienasa-1 a 24 h de incubación. Coloración con azul de Coomassie.

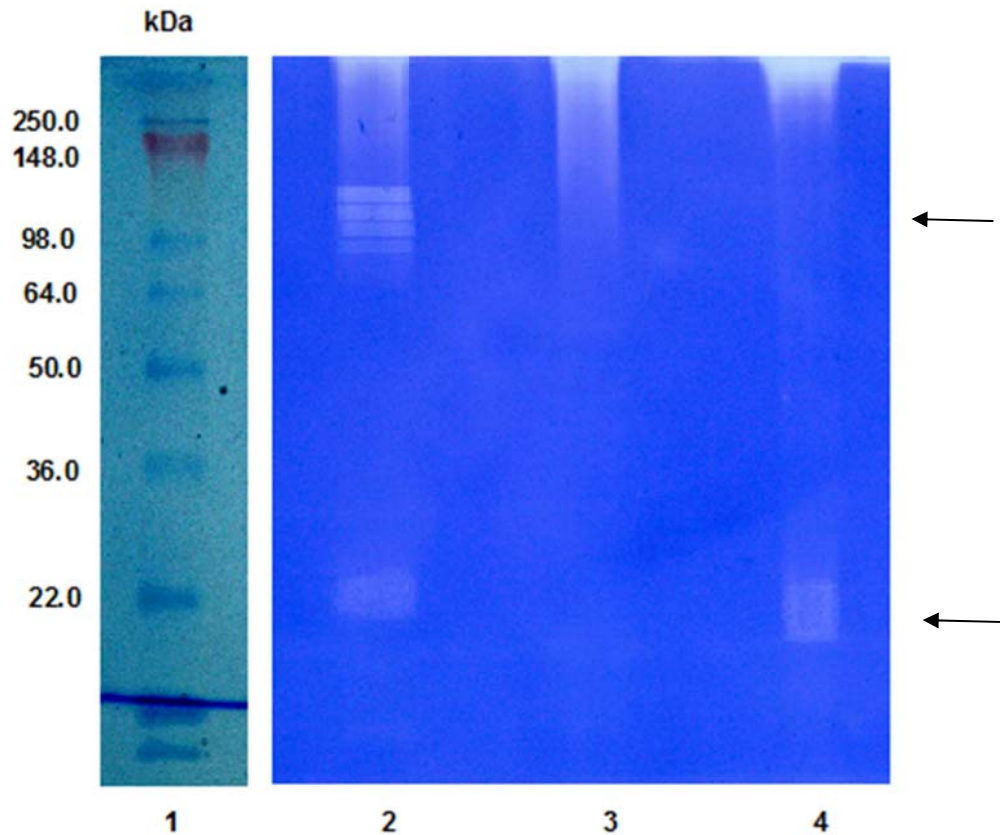


Figura 36. Actividad gelatinolítica de las y Colombienasas Zimograma sobre acrilamida-gelatina (acrilamida 7,5 % y gelatina de piel porcina 1 mg/mL copolimerizada en el gel). Área claras: presencia de actividad gelatinolítica. Carriles: **1:** Marcadores de peso molecular; **2:** 5 µg de veneno total, **3:** 5 µg de Colombienasa-1, **4:** 5 µg de Colombienasa-2. Gel incubado durante 24 h a 37°C, Coloración con azul de Coomassie.

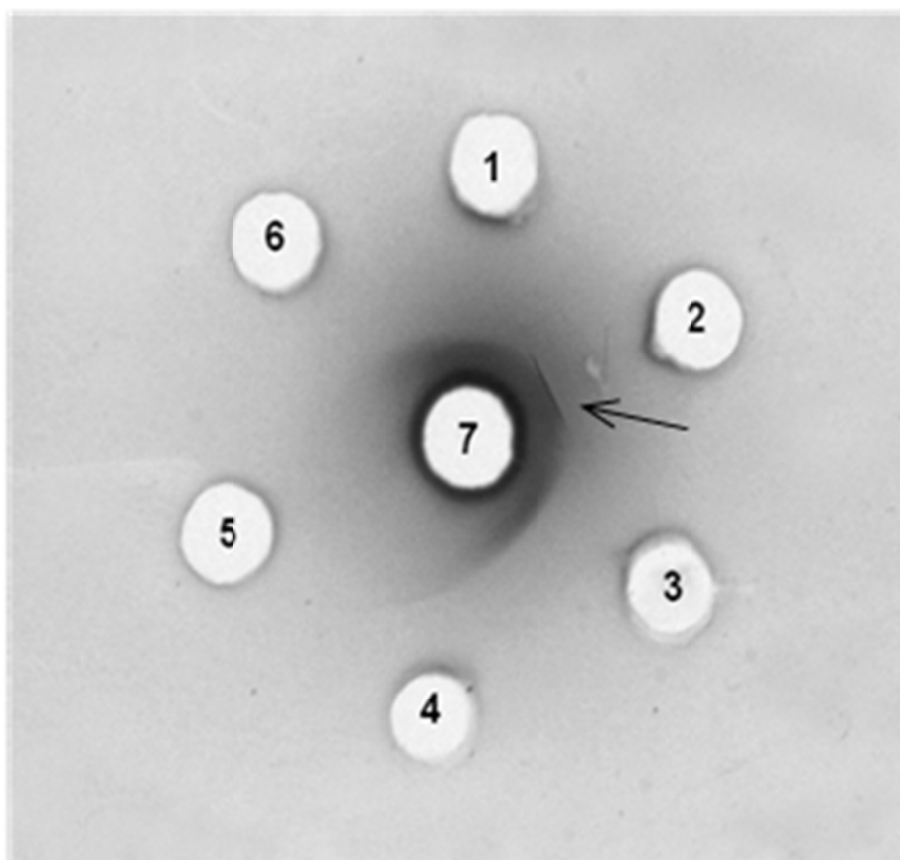


Figura 37. Reconocimiento de las Colmbienasas por el SAOP. Inmunodifusión doble sobre gel de agarosa al 2%. Diez micro litros de SAOP fueron colocados en pozo central (Pozo 7), 26,1; 13,05 y 6,53 $\mu\text{g/pozo}$ de Colmbienasa-1 en los pozos 1, 2 y 3 respectivamente y 17,0; 8,5 y 4,25 $\mu\text{g/pozo}$ de Colmbienasa-2 en los pozos 4, 5 y 6 respectivamente. El gel fue incubado 24 horas a 37° C, lavado con solución salina 0,9% y coloreado con Azul de Coomassie.

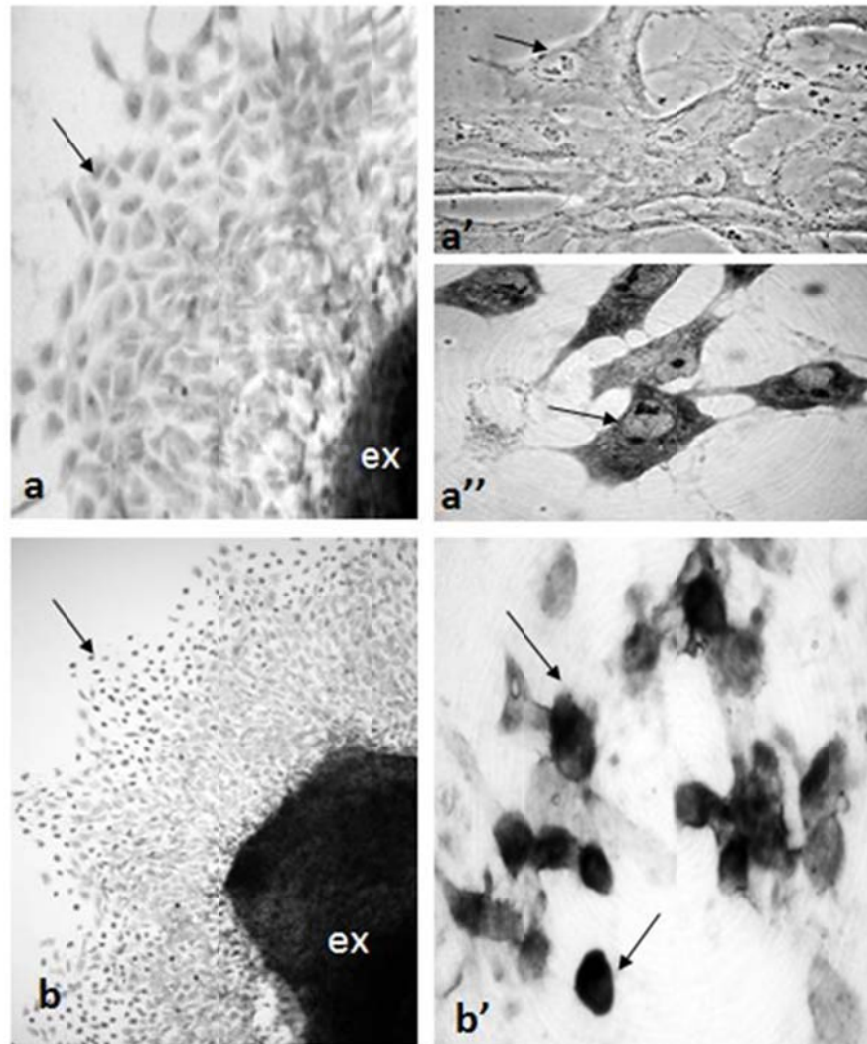


Figura 38. Expresión morfológica del efecto tóxico del veneno crudo de *B. colombiensis* sobre mioblastos cardíacos. a) Monocapa control; a') células vivas; a'') células fijadas; b) células tratadas con veneno crudo; b') células completamente condensadas e intensamente contrastadas (Tinción H/E-100X).

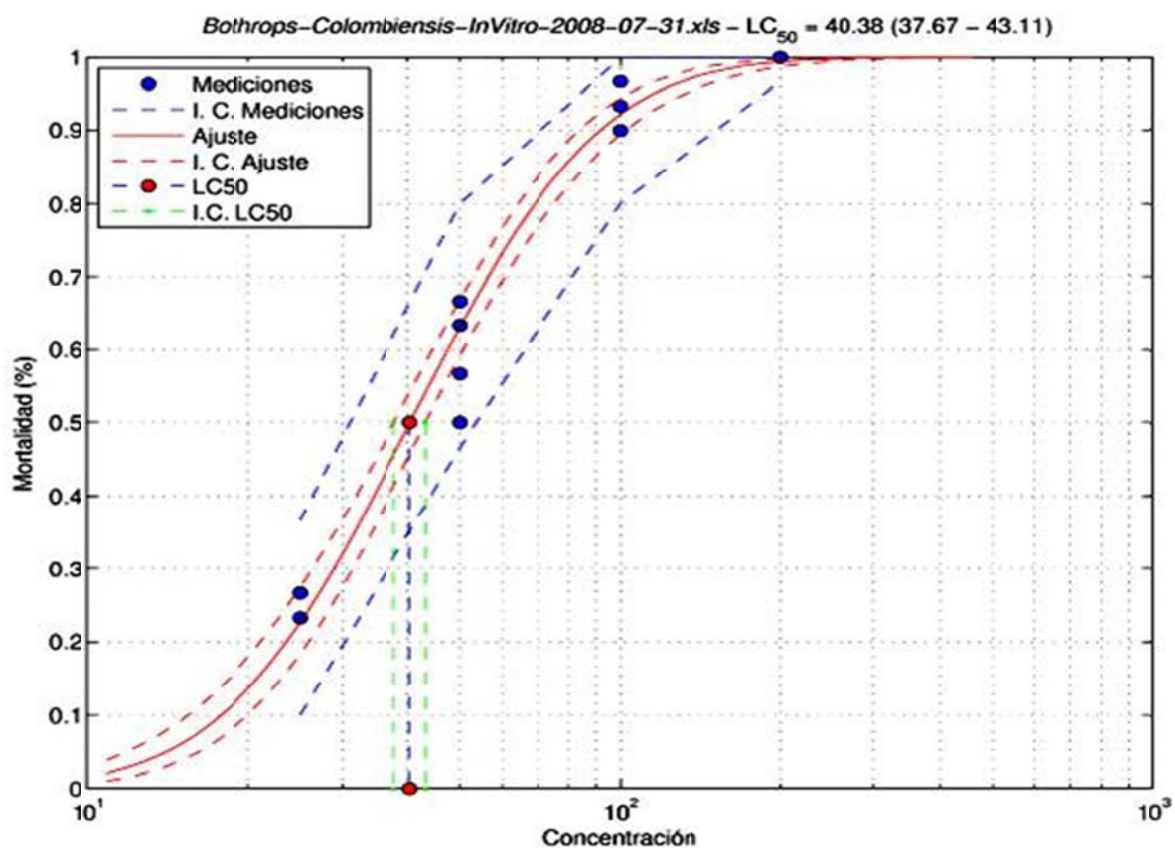


Figura 39. Curva dosis-respuesta del veneno crudo de *B. colombiensis* sobre mioblastos cardiacos. Porcentaje de mortalidad de mioblastos cardiacos según las concentraciones de veneno crudo de *B.colombiensis*. Se destaca la concentración letal cincuenta (CL_{50}), la concentración subletal de 37,67 µg/mL y supraletal de 43,11 µg/mL. I.C. intervalos de confianza. Cuatro (4) campos sobre la monocapa del cultivo con 30 células / campo.

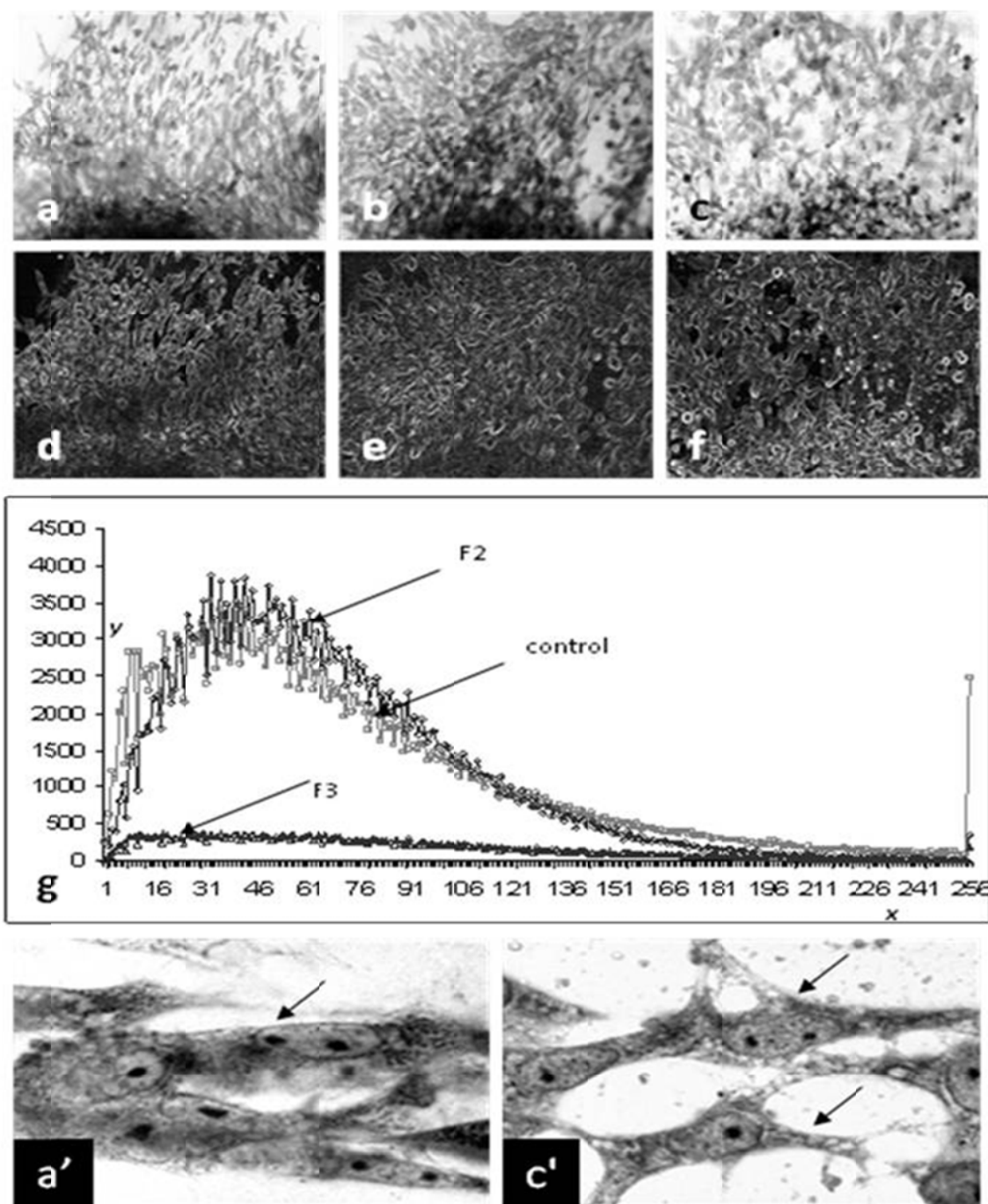


Figura 40. Expresión morfológica del daño inducido por fracciones fibrinolíticas F2 y F3 del veneno crudo de *B. colombiensis*. Fibra muscular de embrión de pollo en “gota pendiente”. a-a’) Monocapa control 10X-100X; tratados por 60 min con: b), fracción F2; c-c’) : fracción F3; d-e-f) imágenes digitales contrastadas en escala de grises. g) histograma en escala de grises.

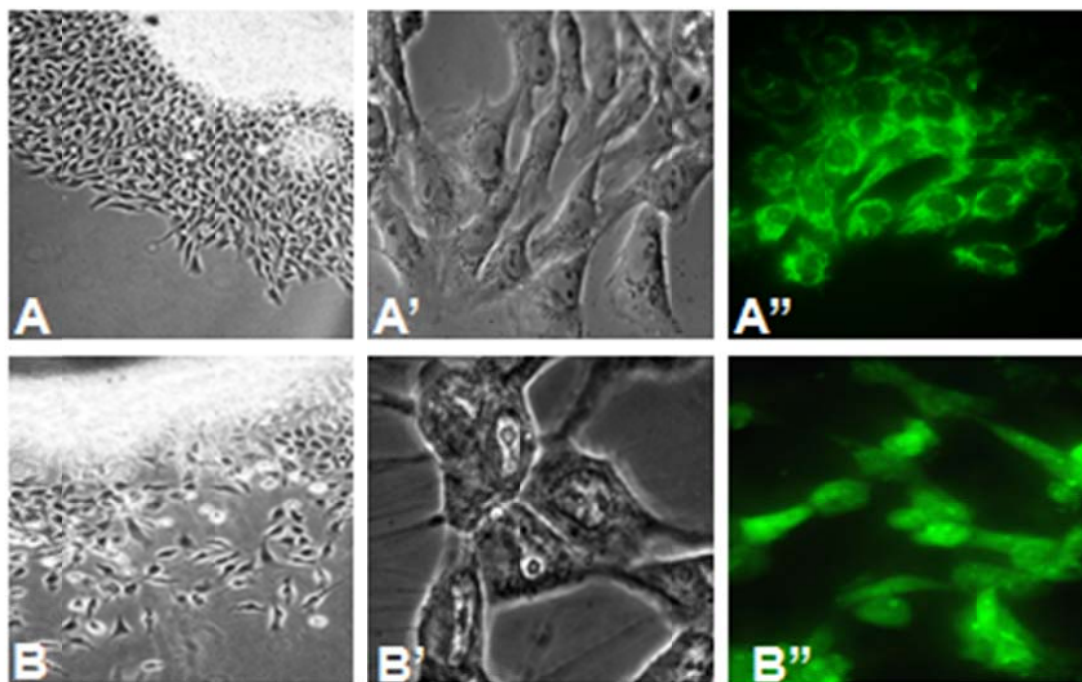


Fig.A-A'.Monocapa de mioblastos cardiacos cultivados en Gota pendiente. Control. (Contraste de fases 10 y 40X)

Fig.B-B'. Monocapa de mioblastos cardiacos tratados 60 min, con la CL₅₀ 40,38 µg/100µL, de veneno crudo de *B. colombiensis*. (Contraste de fases 10 y 40X)

Fig. A''-B''. Monocapa de mioblastos cardiacos, controles y tratados, incubados con DIOC₁, en solución Tyrode, 1 min, lavados 3x con Tyrode y observados en microscopio de fluorescencia con excitación Azul (λ_{exc} Azul. 460).

Fig.C-D. Monocapas de mioblastos tratados con Colombienasa- 1(Col-1) y Colombienasa-2 (Col-2). Ambos fueron incubadas con DIOC₁ en iguales condiciones.

Figura 41. Expresión morfológica de mioblastos tratados con veneno de *B. colombiensis* y las Colombienasa-1 y Colombienasa-2.