

Universidad Nacional Autónoma de México

FACULTAD DE QUIMICA

92

Composición Química del Veneno
de Algunas Serpientes

T E S I S

Que Para Obtener el Título de:

Q U I M I C O

P r e s e n t a

René Vega de Blas

México, D. F.

1978



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

TESIS 1978

CLAS _____

A DE M.C. 438

431

FECHA _____

PROC _____



JURADO ASIGNADO ORIGINALMENTE SEGUN EL TEMA:

PRESIDENTE: **PROFA. GUADALUPE VELEZ PRATT**

VOCAL: **PROF. HELIO FLORES RAMIREZ**

SECRETARIO: **PROFA. YOLANDA CABALLERO ARROYO**

1er. SUPLENTE: **PROFA. PAULINA CASTRO ARDON**

2o. SUPLENTE: **PROF. LIBRADO ORTIZ ORTIZ**

SITIO DONDE SE DESARROLLO EL TEMA:

BIBLIOTECA DE LA FACULTAD DE QUIMICA
BIBLIOTECA DE LA FACULTAD DE MEDICINA, DEPTO. DE FISIOLOGIA
BIBLIOTECA DEL INSTITUTO DE QUIMICA
BIBLIOTECA DEL INSTITUTO DE BIOLOGIA
BIBLIOTECA DEL INSTITUTO NACIONAL DE HIGIENE

SUSTENTANTE: **RENE VEGA DE BLAS**

ASESOR DEL TEMA: **PROFA. YOLANDA CABALLERO ARROYO**

C O N T E N I D O

	<i>PAG.</i>
<i>ABREVIATURAS</i>	<i>8</i>
<i>CAPITULO I</i>	
<i>INTRODUCCION.</i>	<i>11</i>
<i>I.1 DISTRIBUCION GEOGRAFICA.</i>	<i>13</i>
<i>CAPITULO II</i>	
<i>GENERALIDADES.</i>	<i>22</i>
<i>II.1 EL VENENO.</i>	<i>23</i>
<i>II.2 PROPIEDADES FISICAS.</i>	<i>23</i>
<i>II.3 CONSTITUYENTES QUIMICOS.</i>	<i>24</i>
<i>CAPITULO III</i>	
<i>TOXINAS.</i>	<i>26</i>
<i>III.1 AISLAMIENTO.</i>	<i>27</i>
<i>III.2 SECUENCIA Y COMPOSICION AMINOACIDA.</i>	<i>41</i>
<i>III.3 ESTRUCTURA.</i>	<i>48</i>
<i>III.4 MODIFICACION QUIMICA.</i>	<i>53</i>
<i>4.1 UNION DISULFURO.</i>	<i>53</i>
<i>4.2 LISINA Y AMINOACIDOS CON NITROGENO TERMINAL.</i>	<i>56</i>
<i>4.3 RESIDUO DE ARGININA.</i>	<i>59</i>
<i>4.4 RESIDUO DE TIROSINA.</i>	<i>61</i>

	PAG.	
4.5	RESIDUO DE TRIPTOFANO.	62
4.6	GRUPOS CARBOXILO LIBRES.	63
4.7	RESIDUO DE HISTIDINA.	64
4.8	TOXINAS MARCADAS.	65
III.5	SINTESIS.	66
III.6	PROTEINAS BASICAS.	69

CAPITULO IV

	ENZIMAS.	72
IV.1	PROTEASAS Y ESTERASAS.	73
1.1	ACTIVIDAD COAGULANTE.	76
IV.2	FOSFOLIPASA A.	78
2.1	FOSFORILACION OXIDATIVA Y CADENA DE TRANSPORTE ELECTRONICO.	82
IV.3	COLINESTERASA.	84
IV.4	L-AMINOACIDO OXIDASA.	86
IV.5	NUCLEASAS.	89
5.1	DPN-pirofosfatasa.	94
5.2	5'-NUCLEOTIDASA.	96
5.3	ADENOSIN. TRIFOSFATASA ADENOSIN DIFOSFATASA Y PIROFOSFATASA.	99
5.4	FOSFATASAS NO ESPECIFICAS.	101
IV.6	HIALURONIDASA.	102

CAPITULO V

SUEROS.

107

CAPITULO VI

CONCLUSIONES.

112

BIBLIOGRAFIA.

115

ABREVIATURAS

(CM)-celulosa: Carboximetil celulosa.

pH : concentración de iones Hidrógeno.

°C : grado centígrado.

M : Molaridad.

NBS : N-Bromo succinimida.

HNB : 2, hidroxil-5-nitrobenzil.

NPS : 2, nitrofenil sulfonil.

TNM : Tetranitrometano.

EDC : 1-Etil-3(3-Dimetil aminopropil) Carbodiimida.

FITC : Isocianato de Fluoresceina.

TNBS : Sulfonato de Trinitrobenceno.

CHD : 1,2-Ciclohexanodiona.

Boc : Tert-butiloxicarbonil.

Z : Benziloxicarbonil.

Bzl : Benzil.

OBzl : o-Metoxibenzil.

MBzl : m-Metoxibenzil.

NO₂ : Nitro.

TAME : p-Tosil-L-Arginina metil ester.

TCA : Acido Tricloro Acético.

BAEE : Benzoil-L-Arginina etil ester.

EDTA : Acido Etilen Diamino Tetra Acético.

BAA : Benzoil Argininamida.

DEAE : Dietil Aminoetil Celulosa.
DPN⁺ : Difosforidin nucleótido.
DPNH : Difosforidin nucleótido.
FAD : Flavin Adenina Dinucleótido.
DNA : Acido Desoxirribonucleico.
RNA : Acido Ribonucleico.
AMP : Adenosin monofosfato
ADP : Adenosin difosfato.
ATP : Adenosin trifosfato.
DL50 : Dosis letal 50%
DE50 : Dosis efectiva 50%.
Ala : Alanina.
Arg ; Arginina.
Asn : Asparagina.
Asp : Acido Aspártico.
Cys : Cisteína.
Gln : Glutamina.
Gly : Glicina.
His : Histidina.
Ile : Isoleucina.
Leu : Leucina.
Lys : Lisina.
Met : Metionina.
Phe : Fenilalanina.
Pro : Prolina.

Ser : Serina.

Thr : Treonina.

Trp : Triptofano.

Tyr : Tيروسina.

Val : Valina.

CAPITULO I

INTRODUCCION

La razón primordial de efectuar ésta investigación bibliográfica sobre el veneno de serpientes, es la de despertar el interés por el estudio en nuestro país de estos venenos y poder tener un conocimiento de cada uno de los componentes del veneno de las especies de serpientes que más abundan en nuestro territorio.

La mayor parte de las serpientes venenosas están divididas en cuatro familias: Crotalidae, Viperidae, Elapidae e Hidrophiidae. En México solo existen serpientes que pertenecen a las familias Crotalidae y Elapidae, principalmente.

El veneno de estas serpientes es una mezcla compleja de componentes, principalmente proteínas con actividad biológica las cuales actúan sobre los tejidos nerviosos y musculares de la víctima.

Se han realizado numerosos estudios sobre la naturaleza de estas proteínas para entender su modo de acción; de ésta manera se han clasificado en: Proteínas con propiedades tóxicas, Proteínas con actividad enzimática y Proteínas con actividad biológica desconocida.

Se ha logrado separar las proteínas con propiedades tóxicas llamadas toxinas de las proteínas con actividad enzimática (enzimas), elucidar su composición y secuencia aminoácida con la finalidad de estudiar la relación que existe entre la estructura y la actividad biológica. Por otro lado, el estudio de las diferentes proteínas con actividad enzimática ha conducido al entendimiento de las muchas funciones que desempeñan para facilitar la entrada a las toxinas en los tejidos animales.

El progreso de la Química Orgánica en lo que se refiere a los adelantos a nivel de laboratorio, ha echo posible la síntesis de polipéptidos con actividad biológica. Así, se ha logrado sintetizar un polipéptido con propiedades tóxicas con la finalidad de comprobar los resultados obtenidos en las investigaciones realizadas y comprender de una manera clara y precisa la función biológica que presentan estas proteínas.

Una de las defensas que tiene el hombre para evitar, en su mayor parte, el daño que ocasionan estas proteínas, es la producción de sueros a partir del veneno mismo, mediante esquemas de inmunización en animales, principalmente en equinos. En el Instituto Nacional de Higiene se han realizado estudios sobre la obtención de sueros polivalentes que garanticen la supervivencia de una persona mordida, pero no se han obtenido resultados satisfactorios, porque no se tiene un conocimiento exacto de nuestra fauna herpetológica, así como de las especies de serpientes que causan un mayor número de víctimas.

Es necesario conocer la distribución geográfica de las especies de serpientes que existen en la República Mexicana y -- conocer datos estadísticos sobre su mordedura.

I.1 DISTRIBUCION GEOGRAFICA

Es conveniente mencionar la distribución geográfica de las serpientes venenosas de México para tener un mayor control -- en la distribución de los antivenenos correspondientes, con la -- finalidad de hacer llegar lo más pronto posible dicho antiveneno al lugar del accidente.

Por otra parte se debe definir un criterio para juzgar a las serpientes venenosas como tales.

Desde un punto de vista puramente científico, la mayoría de las serpientes deben ser consideradas como venenosas por tener a cada lado de la cabeza atras del ojo, una glándula supra labial más o menos desarrollada que produce una secreción viscosa capaz de ejercer una acción tóxica y destructiva a los tejidos animales.

Prácticamente, sin embargo, solo se consideran como venenosas aquellas que, al momento de la mordedura, inoculen más o menos profundamente en los tejidos animales la secreción viscosa de sus glándulas supralabiales.

Se puede asegurar que no hay lugar de la República Mexicana desprovisto de serpientes venenosas. Principalmente la -- gran altiplanicie y la vertiente del Pacífico estan habitadas -- por el género *Crotalus* de la familia *Crotalidae* (víboras de cascabel), que en menor proporción se encuentran en los estados de la vertiente del Golfo y en la región extrema del Sureste.

En la región tropical húmeda y boscosa de los estados del Golfo hacia el Sur de la república, habita el género *Bothrops* ó *Nauyacas*, que se distribuyen ampliamente por Centro y Sudamérica.

A este género pertenece la especie *Bothrops atrox*, serpiente que junto con la especie *Crotalus terrificus* causan muchas

víctimas. Sin embargo la cascabel *Crótalus durissus*, tiene un ve
no muy tóxico, que aparentemente, no induce a la formación de
anticuerpos en los caballos y su antiveneno, por consiguiente, -
es poco efectivo; esto la hace una de las serpientes más peligro
sas de la región (Tamaulipas) y del mundo.

Existe otro género, el género *Micrurus* al que pertene-
cen las serpientes vulgarmente conocidas como Coralillos, género
perteneciente a la familia *Elapidae* que se encuentra en casi to-
do nuestro territorio y su área de dispersión se extiende por el
norte a los Estados Unidos y por el sur hasta Argentina.

Actualmente se han registrado en la República Mexicana
476 especies y subespecies de serpientes, de las cuales 72 son -
venenosas. Las que causan mayor número de intoxicación por morde-
dura son las serpientes de la familia *Crotalidae* a la que perte-
necen, como ya señalamos, los géneros *Bothrops* y *Crótalus*, sien-
do el estado de Oaxaca el de mayor porcentaje (22.6%) de mortali-
dad por mordedura de serpiente.

Con las siguientes tablas podremos observar mejor la -
distribución geográfica y la estadística de mortalidad por morde-
dura en la República Mexicana. (1)(2)(3)(3a)

NOTA: Las estadísticas de mortalidad por mordedura de
serpiente por estados de la República Mexicana -
de 1970 a 1973 están en proceso.

TABLA No.1 DISTRIBUCION GEOGRAFICA DE LAS ESPECIES DE SERPIENTES

FAMILIA CROTALIDAE		FAMILIA ELAPIDAE	
<i>Agkistrodon bilineatus</i>	X	<i>Micrurus euryxanthus</i>	NW
<i>Bothrops atrox</i>	X	<i>Micrurus bernadi</i>	W
<i>Bothrops bicolor</i>	S	<i>Micrurus browni</i>	S
<i>Bothrops dunni</i>	S	<i>Micrurus diastema</i>	E
<i>Bothrops godmani</i>	S	<i>Micrurus distans</i>	W
<i>Bothrops lansbergi</i>	S	<i>Micrurus elegans</i>	E
<i>Bothrops nasutus</i>	E	<i>Micrurus ephippifer</i>	W
<i>Bothrops nigroviridis</i>	S	<i>Micrurus fitzingeri</i>	SE
<i>Bothrops nummifer</i>	SE	<i>Micrurus fulvius</i>	NE
<i>Bothrops schlegelli</i>	S	<i>Micrurus laticollaris</i>	SW
<i>Bothrops sphenophrys</i>	S	<i>Micrurus latifasciatus</i>	S
<i>Bothrops undulatus</i>	SE	<i>Micrurus nigrocinctus</i>	S
<i>Bothrops yucatanicus</i>	E	<i>Micrurus nuchalis</i>	SE
<i>Crótalus atrox</i>	N		
<i>Crótalus basiliscus</i>	W		
<i>Crótalus catalinensis</i>	NW		
<i>Crótalus cerastes</i>	NW		
<i>Crótalus cerastes</i>	S		
<i>Crótalus durissus</i>	S		
<i>Crótalus enyo</i>	NW		
<i>Crótalus exsul</i>	NW		
<i>Crótalus intermedius</i>	S		
<i>Crótalus lepidus</i>	N		
<i>Crótalus mitchellii</i>	NW		
<i>Crótalus molossus</i>	X		
<i>Crótalus polystictus</i>	NWC		
<i>Crótalus pricei</i>	NW		
<i>Crótalus pusillus</i>	SW		
<i>Crótalus ruber</i>	NW		
<i>Crótalus scutulatus</i>	X		
<i>Crótalus stejnegeri</i>	NW		
<i>Crótalus tigris</i>	N		
<i>Crótalus tortugensis</i>	NW		
<i>Crótalus transversus</i>	C		
<i>Crótalus triseriatus</i>	X		
<i>Crótalus viridis</i>	N		
<i>Crótalus willardi</i>	NW		
<i>Sistrurus catenatus</i>	N		
<i>Sistrurus ravus</i>	SC		

Simbolos:

X: ampliamente distribuida
 S: Sur
 N: Norte

E: Este
 W: Oeste
 C: Meseta Central

TABLA No. 2

MORTALIDAD POR MORDEDURA DE SERPIENTE
DE LA REPUBLICA MEXICANA
1960 - 1973

AÑOS	NUMERO DE DEFUNCIONES	TASA POR 100 000 Habs.
1960	148	0.41
1961	157	0.43
1962	186	0.52
1963	136	0.38
1964	144	0.40
1965	144	0.40
1966	166	0.46
1967	173	0.48
1968	164	0.45
1969	136	0.38
1970	149	0.41
1971	152	0.42
1972	123	0.34
1973	118	0.32
T O T A L	2096	0.41

TABLA No. 3

MORTALIDAD POR MORDEDURA DE SERPIENTE EN DIEZ
ESTADOS DE LA REPUBLICA MEXICANA CON TASAS
PROMEDIO MAS ALTAS

1960 - 1969

No. de ORDEN	ENTIDAD FEDERATIVA	DEFUNCIONES 1960-1969	TASA POR 100000 H.
1.	Quintana Roo	21	3.24
2.	Oaxaca	347	1.77
3.	Tabasco	88	1.48
4.	Hidalgo	111	0.97
5.	Chiapas	117	0.85
6.	San Luis Potosi	96	0.76
7.	Veracruz	224	0.71
8.	Yucatan	50	0.69
9.	Puebla	138	0.60
10.	Campeche	12	0.58
República Mexicana		1554	0.37

TABLA No. 4

DIEZ ESTADOS DE LA REPUBLICA MEXICANA
CON PROMEDIOS MAS ALTOS DE DEFUNCIONES
POR MORDEDURA DE SERPIENTES

1960 - 1969

No. de ORDEN	ENTIDAD FEDERATIVA	PROM. DEF. 1960-1969	%
1.	Oaxaca	35	22.4
2.	Veracruz	22	14.2
3.	Puebla	14	9.0
4.	Chiapas	12	7.7
5.	Hidalgo	11	7.1
6.	San Luis Potosi	10	6.5
7.	Tabasco	9	5.8
8.	Michoacan	5	3.2
9.	Yucatan	5	3.2
10.	Jalisco	4	2.6
S U M A		127	81.6
República Mexicana		155	100.0

TABLA No. 5

*MORTALIDAD POR GRUPOS DE EDAD
 POR MORDEDURA DE SERPIENTE
 DE LA REPUBLICA MEXICANA
 1960 - 1973

*Tasa por 100 000 habs.

ANOS	GRUPOS DE EDAD										TOTAL			
	0 - 4		5 - 14		15 - 24		25 - 44		45 - 64		65 y más		No.	Tasa
	No.	Tasa	No.	Tasa	No.	Tasa	No.	Tasa	No.	Tasa	No.	Tasa		
1960	4	0.07	21	0.21	31	0.46	54	0.67	30	0.76	8	0.60	148	0.41
1961	12	0.21	34	0.34	31	0.46	45	0.56	25	0.63	10	0.75	157	0.43
1962	40	0.70	23	0.23	28	0.42	51	0.63	33	0.84	11	0.83	186	0.52
1963	11	0.19	26	0.26	19	0.28	44	0.55	23	0.58	13	0.98	136	0.38
1964	6	0.11	36	0.36	25	0.37	38	0.47	28	0.71	10	0.75	144	0.40
1965	11	0.19	22	0.22	21	0.31	37	0.46	40	1.01	13	0.98	144	0.40
1966	12	0.21	28	0.28	27	0.40	54	0.67	31	0.79	14	1.05	166	0.46
1967	29	0.51	25	0.25	30	0.45	45	0.56	28	0.71	18	1.35	173	0.48
1968	22	0.39	24	0.24	28	0.42	43	0.53	31	0.79	16	1.20	164	0.45
1969	17	0.30	20	0.20	23	0.34	36	0.45	26	0.66	14	1.05	136	0.38
1970	24	0.42	19	0.19	23	0.34	38	0.47	29	0.73	16	1.20	149	0.41
1971	32	0.56	21	0.21	22	0.33	33	0.41	31	0.79	13	0.98	152	0.42
1972	14	0.25	22	0.22	24	0.36	35	0.43	19	0.48	9	0.68	123	0.34
1973	15	0.26	9	0.09	25	0.37	40	0.50	20	0.51	9	0.68	118	0.32
Total	249	0.31	330	0.23	357	0.38	593	0.53	394	0.71	174	0.93	2096	0.41

TABLA No. 6

DEFUNCIONES POR GRUPOS DE EDAD POR MORDEDURA
DE SERPIENTE
DE LA REPUBLICA MEXICANA

1960 - 1973

GRUPOS DE EDAD	TOTAL	
	No.	%
0 - 4	249	11.9
5 - 14	330	15.7
15 - 24	358	17.1
25 - 44	593	28.3
45 - 64	392	18.7
64 y más	174	8.3
T O T A L	2096	100.0

TABLA No. 7

DIAGNOSTICO MEDICO EN LAS DEFUNCIONES
 POR MORDEDURA DE SERPIENTE
 DE LA REPUBLICA MEXICANA

1960 - 1973

AÑOS	CON DIAG. MED.		SIN DIAG. MED.		TOTAL	
	No.	%	No.	%	No.	%
1960	23	15.5	125	84.5	148	100
1961	51	32.5	106	67.5	157	100
1962	41	22.0	145	78.0	186	100
1963	49	36.0	87	64.0	136	100
1964	58	40.3	86	59.7	144	100
1965	56	38.9	88	61.1	144	100
1966	60	36.1	106	63.9	166	100
1967	63	36.4	110	63.6	173	100
1968	52	31.7	112	68.3	164	100
1969	40	29.4	96	70.6	136	100
1970	61	42.3	88	61.1	149	100
1971	74	48.6	78	51.3	152	100
1972	No existe el dato		No existe el dato			
1973	40	33.8	78	66.1	118	100
TOTAL	668	33.8	1305	66.1	1973	100

CAPITULO II

GENERALIDADES

II.1 EL VENENO

El veneno, en general, es una compleja mezcla de componentes principalmente proteínas que constituyen de un 90 a un 92% de su peso seco, muchas de ellas con actividad enzimática conteniendo más de un principio tóxico, los cuales son polipéptidos -- fuertemente básicos.

Los materiales orgánicos no proteicos, fósforo inorgánico e iones metálicos y no metálicos, son componentes que entran en menor proporción.

El veneno varía en contenido y composición en los diferentes géneros y especies. El veneno del *crótalus* y *bothrops* es un líquido ligeramente espeso, amarillo, sin olor y de sabor debilmente estíptico. Al secarse forma especie de cristales de diversos tamaños, no es completamente soluble en agua destilada; a baja concentración, un alto porcentaje permanece sin disolver, pero a concentraciones altas, cerca del 85% se disuelve. Sin embargo, la solubilidad aumenta en soluciones salinas. (4)

II.2 PROPIEDADES FISICAS

En el cuadro siguiente se dan algunas propiedades físicas del veneno seco perteneciente a las familias *Crotalidae* y *Elapidae*. (4)

PROPIEDADES	FAMILIA ELAPIDAE	FAMILIA CROTALIDAE
Solubilidad en H ₂ O destilada	99.5%	80%
Solubilidad en soluciones salinas	99.5%	95%
p ^H de la solución en H ₂ O destilada	6.6-7.0	5.5
Viscosidad relativa	1.5-2.5	2.0

II.3 CONSTITUYENTES QUIMICOS

El análisis del veneno de las serpientes dió un panorama general de los constituyentes químicos, como se puede observar en la siguiente tabla:

TABLA No.8 CONSTITUYENTES QUIMICOS

CONSTITUYENTE	FAMILIA ELAPIDAE	FAMILIA CROTALIDAE
Nitrógeno total	17%	12%
Proteínas	94%	90%
Fósforo total	9.4/100 mg.	14.0/100 mg.
Fósforo inorgánico total	5.5/100 mg.	5.5/100 mg.
Albúmina	_____	_____
Globulina	_____	_____
Iones metálicos: Na	_____	1.86%
K	_____	0.22%
Zn	4.6%	0.078%
Ca	_____	0.45%
Mg	_____	0.12%
Fe	0.028%	0.049%
Co	_____	0.007%
REFERENCIA	(4)	(5)

El nitrógeno fué determinado por el método de Kjeldahl, el por ciento de proteína fué estimado por el método de Biuret -- (6), el fósforo total se determinó usando el método de Fiske y - Subbarow (7) con una modificación de Bartlett (8); mientras que el fósforo inorgánico fué determinado siguiendo el método de - - Karl-Kroupa (9). Los iones metálicos fueron determinados por el uso de un espectrofotómetro de absorción atómica.

Estos datos indican, que aparte del nitrógeno proteico (90%), existe también nitrógeno no proteico que puede exhibir actividad biológica. El estudio del contenido del fósforo, nos - muestra la presencia de compuestos fosforilados; el fósforo inorgánico es totalmente despreciable, no se conoce si éste fósforo es un producto de degradación ó es un constituyente del veneno.

Al comenzar los estudios de los venenos se pensaba que la toxicidad era ejercida por las enzimas presentes en el veneno pero después de varias investigaciones se logró diferenciar la toxicidad de la actividad enzimática. De esta manera se logró hacer una clasificación de los constituyentes proteicos agrupándolos en tres grupos principales: a) Proteínas con propiedades tóxicas (Toxinas), b) Proteínas con actividad enzimática (Enzimas) y c) Proteínas con actividad biológica desconocida.

GAPITULO III

TOXINAS

La mayoría de los trabajos desarrollados durante los últimos años, están relacionados con una sola familia, la familia Elapidae y particularmente el género *Naja* al que pertenecen las Cobras; en la República Mexicana no existe ninguna especie de Cobra, pero la similitud que puede existir entre el veneno de las cobras y los coralillos (pertenecen a la misma familia) puede ser una base para estudiar al veneno de estos últimos. Por otra parte, el estudio del veneno de una familia, sirve como guía para el estudio de otro veneno de la misma familia ó de otra diferente, porque las técnicas usadas para ese fin son iguales.

El veneno de una serpiente es una compleja mezcla de diferentes compuestos, la mayoría de ellos son proteínas con actividad enzimática. Durante los últimos años han sido separadas y perfectamente caracterizadas más de diez enzimas. (10)(11)(12) Varios investigadores han tratado de relacionar la toxicidad de un veneno con la actividad enzimática; pero muchas de estas investigaciones fueron echas sin haber separado y purificado a las enzimas.

En una serie de estudios (13)(14)(15) sobre los venenos de serpientes, la toxicidad del veneno fué diferenciada de la actividad enzimática (16)(17)(18) y fué probado que el efecto letal se debe a polipéptidos de bajo peso molecular y térmicamente estables llamados Toxinas (19)(20), sin embargo, el envenenamiento ocurre por la acción combinada de todos los componentes del veneno. (21)(22)

Para poder conocer la naturaleza de las substancias tóxicas se deben tener en cuenta los siguientes puntos: (1) Aislamiento y purificación de las toxinas responsables de la toxicidad del veneno; (2) la Determinación de sus estructuras y; (3) la Clarificación de la relación entre la toxicidad y la estructura.

III.1 AISLAMIENTO

Las toxinas pertenecientes a la familia Elapidae, especialmente las que corresponden al género *Naja*, han sido estudiadas ampliamente; a estas toxinas se les conoce como Neurotoxinas por tener propiedades neurotóxicas.

TABLA No. 9 COMPOSICION AMINOACIDA DE LAS NEUROTOXINAS TIPO I

Género Especie Subespecie	Naja Naja Atra	Naja Nigri- collis	N. Naja Oxiana	N. Nivea	N. Haje Haje	N. Haje	N. Nivea	N. Melano- leuca	Hemachatus Hemachatus	Dendroaspis Polylepis Polylepis			
Nombre Aminoácido	F-1	Cobro- toxina	Toxina α	Toxi- na δ	Toxi- na α	I	Toxinas II	II'	Toxi- na β	Toxi- na δ	Toxinas II	IV	Toxina α
Ac. Aspártico	8	8	7	8	7	7	7	5	5	7	9	5	5
Treonina	8	8	8	6	7	7	6	5	5	7	7	9	5
Serina	4	4	2	4	4	4	4	3	3	4	3	4	4
Ac. Glutámico	7	7	6	8	7	7	8	7	5	7	5	8	5
Prolina	2	2	5	4	4	4	4	4	3	4	5	4	2
Glicina	7	7	5	5	5	5	5	6	6	5	5	5	5
Alanina	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1
Hemicistina	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8
Valina	1	1	2	2	1	1	1	2	2	2	1	1	2
Metionina	—	—	—	—	—	—	1	1	1	1	—	—	—
Isoleucina	2	2	3	2	3	3	5	5	5	3	3	1	4
Leucina	1	1	2	2	1	1	—	—	—	—	2	2	—
Tirosina	2	2	1	1	1	1	1	2	2	1	1	1	4
Fenilalanina	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Lisina	3	3	6	5	6	6	6	6	7	6	4	6	6
Histidina	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	3
Arginina	5	6	3	4	4	4	4	4	6	3	5	4	5
Triptofano	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Residuos Totales	61	62	61	61	61	61	61	61	61	61	61	61	60
N-terminal	Leu	Leu	Leu	Leu	Leu	Leu	Leu		Met	Met	Leu	Leu	Arg
C-terminal	Asn	Asn	Asn	Asn	Asn	Asn			Arg	Asn	Asn	Lys	Tyr
Referencia	29	31	32	32b	34	33	139	138	138	39	139	140	141

TABLA No. 10 COMPOSICION AMINOACIDA DE LAS NEUROTOXINAS TIPO II

Género Especie Subespecie	Naja Naja	Naja Naja Naja	Naja Naja Naja	Naja Naja Siamensis	Naja Naja Kaouthia	Naja Melano- leuca	Naja Haje	Naja Nivea	Dendroaspis Polylepis Polylepis	Ophiofagus Hannah	Bungarus Multicinctus			
Nombre Aminoácido	Toxi- na A	Toxi- na 3	Toxi- na 4	Cobra Negra	Toxi- na 3	Toxina b	Toxi- na III	Toxi- na α	Toxi- na γ	Toxi- na δ	Toxi- na a	Toxi- na b	α-Bungaro- toxina	
Ac. Aspártico	9	9	9	9	9	9	10	10	9	7	7	7	9	4
Treonina	9	9	9	9	9	9	8	7	5	6	6	9	9	7
Serina	3	3	4	3	3	3	3	3	3	4	4	3	4	6
Ac. Glutámico	1	1	1	1	1	1	1	3	1	6	5	4	2	5
Prolina	6	6	6	6	6	6	6	6	6	4	5	7	6	8
Glicina	5	5	5	5	4	4	4	5	5	5	5	4	5	4
Alanina	2	2	2	2	3	3	4	3	3	4	4	4	3	5
Hemicistina	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
Valina	4	4	4	4	4	4	5	4	5	3	3	5	3	5
Metionina	—	—	—	—	—	—	—	1	2	—	—	—	—	1
Isoleucina	5	5	4	5	5	5	4	4	3	3	4	3	3	2
Leucina	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2
Tirosina	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	2	2
Fenilalanina	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	2	1	2	1
Lisina	4	4	4	5	5	5	4	4	6	9	10	6	8	6
Histidina	1	1	1	1	1	1	1	—	1	—	—	—	1	2
Arginina	6	6	6	5	5	5	5	5	6	4	3	4	3	3
Triptofano	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	2	3	2	1
Residuos Totales	71	71	71	71	71	71	71	71	71	72	72	73	73	74
N-terminal	Ile	Ile	Ile	Ile	Ile	Ile	Ile	Ile	Ile	Arg	Arg	Thr	Thr	Ile
C-terminal	Pro	Pro	Pro	Pro	Pro	Pro	Pro	Ser	Arg	Arg	Pro	His	Gly	
Referencia	28	29	29	32b	29	32b	139	138	34	141	141	142	142	143

Esta familia es originaria de Asia y Africa y las neurotoxinas aisladas tienen 61-62 ó 71-74 restos de aminoácidos y pueden ser agrupadas convenientemente de acuerdo a este número de restos; el primer grupo fué designado como Neurotoxinas tipo I ó cortas y el segundo grupo como Neurotoxinas tipo II ó largas (Tablas 9,10). Probablemente su pequeño tamaño molecular y su fuerte carga positiva explican su baja actividad antigénica (23) (24) y su rápida adsorción cuando son aplicadas a los tejidos conjuntivos de los mamíferos. (25)

Las neurotoxinas tipo I contienen 8 hemicistinas o 4 puentes disulfuro; una conclusión notable, es que todas las neurotoxinas tipo I de la familia Elapidae son similares de especie a especie y de origen geográfico. Las toxinas pertenecientes a la familia Crotalidae no han sido investigadas tanto como las de la familia Elapidae, su composición en aminoácidos está resumida en la Tabla No.11; generalmente tienen pesos moleculares más altos que los de la familia Elapidae, con excepción de la crotamina.

Un veneno contiene más de un componente tóxico, en muchos casos un veneno ha sido simultáneamente estudiado por diferentes investigadores (Tabla No.12) y así nos encontramos con diferentes nombres asignados a una misma toxina, por ejemplo, la toxina F-1 (Tabla No.9) aislada del veneno de la serpiente *Naja naja atra*, es idéntica a la cobrotoxina aislada por Yang y colaboradores (26)(27). La toxina A (28) es idéntica a la toxina 3 ó 4 de Karlsson (Tabla No.10). (29)

Yang (30) aisló un polipéptido neurotóxico designado como cobrotoxina del veneno de la serpiente *Naja naja atra*. Ha sido separado en estado cristalino por una precipitación con sulfato de amonio seguida de una cromatografía sobre una columna de carboximetil celulosa (CM-celulosa) y después una cristalización.

La celulosa se preparo por un lavado de una solución de cloruro de sodio 0.5M e hidróxido de sodio 0.5M. Posteriormente se lavó con agua, se suspendió en una solución buffer de acetato de sodio 0.005M, pH 5.8 y se introdujo en una columna.

La fracción tóxica del veneno separada por una precipitación con sulfato de amonio, fué sujeta a la cromatografía; para ello se usaron 320 mg. de la fracción en 5 ml. de la solución

TABLA No.11 COMPOSICION AMINOACIDA DE OTRAS TOXINAS

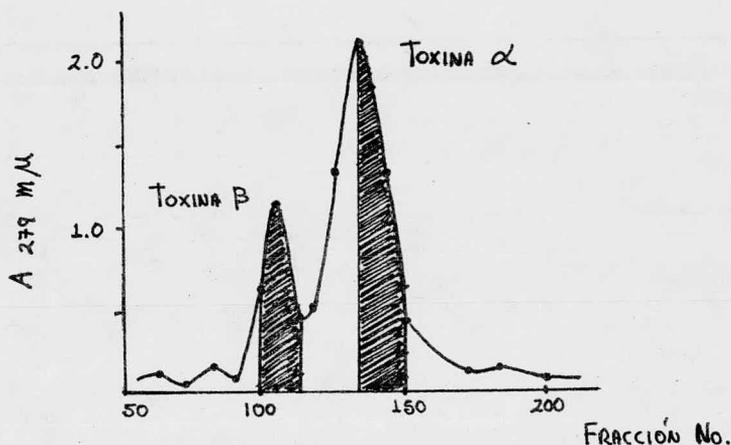
Género Especie Subespecie	Cróталus Terrificus Terrificus	Cróталus Durrisus Terrificus			
Nombre	Crotoxina	Crotoxina	Crotoxina Protefna Acida	Crotoxina Protefna Básica	Crotamina
Aminoácido					
Ac. Aspártico	24	19	10	9	3
Treonina	11	10	4	6	—
Serina	12	11	5	6	3
Ac. Glutámico	15	20	13	8	2
Prolina	12	10	5	5	4
Glicina	20	18	9	10	5
Alanina	12	11	5	6	—
Hemicistina	14	21	11	11	4
Valina	4	3	1	2	—
Metionina	4	2	1	2	1
Isoleucina	6	7	3	4	1
Leucina	7	7	1	7	1
Tirosina	14	11	3	9	1
Fenilalanina	16	8	3	6	2
Lisina	12	11	2	9	11
Histidina	4	3	1	2	3
Arginina	13	10	10	8	2
Triptofano	6	3	1	2	3
Residuos Totáles	206	185	88	112	46
N-terminal					
C-terminal					
Referencia	144	145	145	146	73

buffer de acetato de sodio 0.005M, PH 5.8, aplicandose a la columna de cromatografía (2 x 26.5 cm.), la cual fué equilibrada posteriormente con el mismo buffer. Después de la completa adsorción la elución fué conducida incrementando la concentración de la sal y el PH. Cada fracción de 5ml. fué recolectada en un rango de 20 ml. por hora y la concentración de la proteína fué determinada por el método de Folin. La fracción que dió mayor contenido de proteína fué sometida a otra cromatografía siguiendo la misma técnica para una purificación mayor de la toxina.

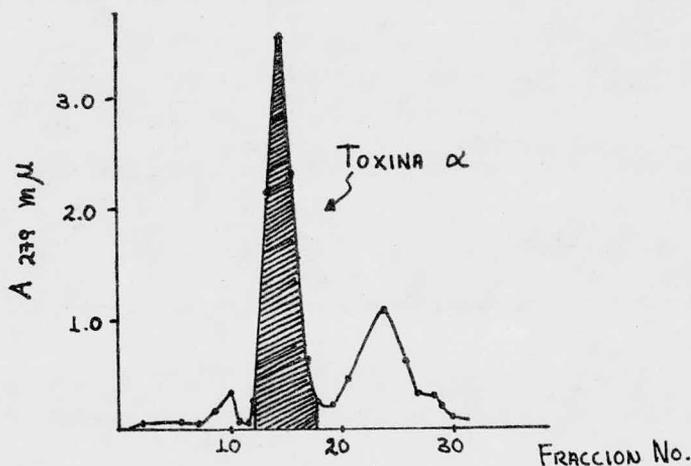
Para la cristalización de la toxina, se añadió sulfato de amonio a la fracción de mayor contenido en proteína hasta la precipitación de la toxina. Después de 5 horas bajo refrigeración, los cristales empezaron a formarse, separándose por centrifugación, fueron disueltos en una pequeña cantidad de agua para una recristalización con sulfato de amonio; la recristalización se hizo tres veces más.

La toxina mostró ser homogénea y tiene una letalidad 6-7 más grande que el veneno original y constituye la principal proteína tóxica en los venenos de las cobras. Los estudios químicos (31) han mostrado que la cobrotoxina es una pequeña proteína básica, consistente de una cadena peptídica simple de 62 residuos de aminoácidos, con cuatro puentes disulfuro intracatenarios, con leucina como aminoácido N-terminal y asparagina como carboxilo terminal. La toxina está compuesta de 15 aminoácidos comunes y carece de alanina, metionina y fenilalanina. La secuencia aminoácida completa y la posición de los puentes disulfuro en la cobrotoxina también ha sido establecida (Tabla No.9,14) -- fig. 3. (26)

Dos tipos de toxinas α han sido aisladas del veneno de la especie *Naja nigricollis* y *Naja haje haje* respectivamente; el primer aislamiento se hizo por cromatografía de intercambio iónico sobre amberlita IRC-50 (32), de acuerdo al siguiente procedimiento: 1.10g. de veneno fueron disueltos en 10 ml. de una solución buffer fosfato de sodio 0.03M, PH 7.3; la solución fué clarificada por centrifugación y se aplicó a una columna de sephadex G-75 (3.2 x 80 cm.). La elución se hizo con el mismo buffer a 17.5 ml. por hora y el eluyente fué colectado en fracciones de 10 ml., leyéndose a 279 m μ y obteniéndose la siguiente gráfica.

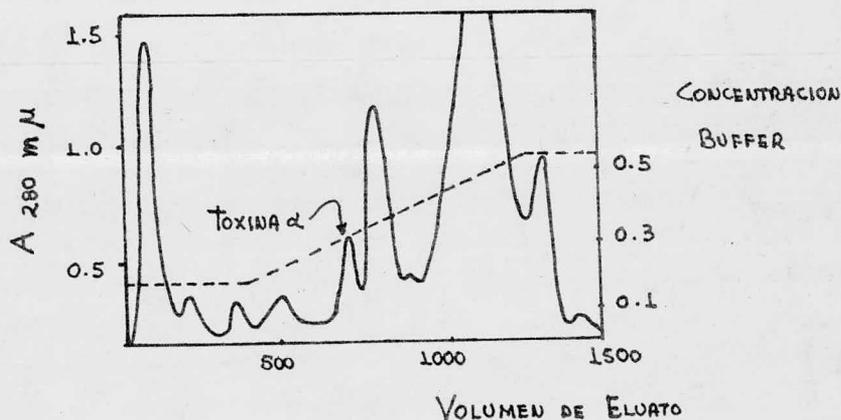


Las fracciones que contienen toxina α (area sombreada) - fueron mezcladas y la solución (250 ml.) fué aplicada directamente a una columna de amberlita IRC-50 (3.2 x 45 cm.) equilibrada con una solución buffer fosfato de sodio 0.28M, pH 7.3. La columna se eluyó con este buffer a 30 ml. por hora. Los primeros 150 ml. obtenidos fueron separados y después se recogieron fracciones de 6 ml. cada una y entonces cada fracción fué leída a 279 mμ para obtener la gráfica siguiente.

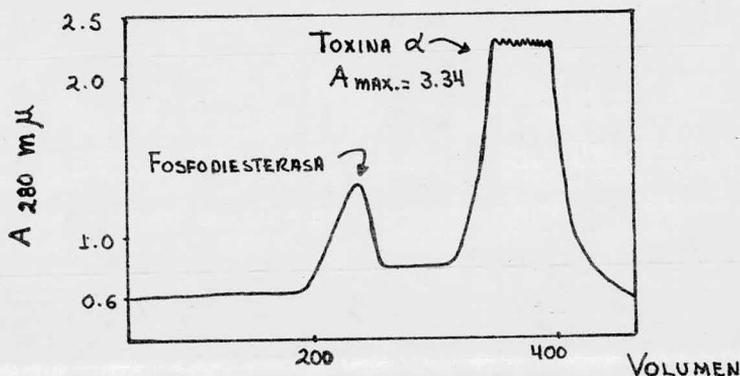


Las fracciones con la toxina α fueron diluidas diez veces y la solución fué aplicada a otra columna de amberlita IRC-50 para una recromatografía; el rendimiento de la toxina α obtenida fué de 25mg. que corresponde al 2.3% del veneno.

El segundo aislamiento se hizo por cromatografía gradiente en una columna de amberlita CG-50 (130 x 3.8 cm.) (33). - Veinte gramos del veneno de la especie *Naja haje haje* fueron disueltos en 200 ml. de buffer fosfato de sodio 0.1M, PH 7.3; la solución fué centrifugada y el sobrenadante fué aplicada a la columna. Después de una elución inicial de 500 ml. con el buffer fosfato de sodio a la misma concentración y PH, la concentración fué cambiada a 0.5M. La velocidad de flujo fué de 300 ml. por h. y el diluyente fué colectado en fracciones de 20 ml.



La fracción más tóxica fué diluida con 1.6 volúmenes de agua destilada y recromatografiada bajo idénticas condiciones nuevamente la fracción tóxica se diluyó con el mismo volumen de agua y se recromatografió sobre una pequeña columna de amberlita G-50 (40 x 0.9 cm.). Se eluyó con buffer 0.5M para concentrar a la toxina en un pequeño volumen; la solución concentrada se aplicó a una columna de sephadex G-50 (66 x 2.5 cm.) en buffer acetato de piridina 0.2M, PH 5.8, para su purificación y al mismo tiempo, la actividad de la enzima fosfodiesterasa la cual fué asociada con la toxina, fué separada obteniéndose el 1.7% por peso de veneno.



En años recientes, Botes y colaboradores (34), aislaron tres toxinas del veneno de la serpiente *Naja nivea* designándolas como toxinas α , β y δ , por cromatografía de intercambio iónico sobre amberlita CG-50 seguida por cromatografía sobre una columna de CM-celulosa y filtración de gel en sephadex G-50. La toxina δ mostró ser la toxina más básica; la toxina δ tiene una secuencia y composición aminoácida idéntica a la toxina α de la serpiente *Naja haje haje*. (33)

La crototoxina, el principio neurotóxico del veneno de la serpiente de cascabel *Crótalus durissus terrificus* fué aislada en forma cristalina en 1938; de acuerdo a estudios recientes, la toxina es un complejo formado por una proteína ácida y otra básica. (35) La proteína ácida tiene un punto isoeléctrico de 8.6 y un peso molecular de 12 000. Es interesante hacer notar que la neurotoxicidad de la crototoxina requiere de la acción de las dos proteínas, mientras que la actividad hemolítica en presencia de lecitina reside solamente en el compuesto básico.

TABLA No.12 TOXINAS AISLADAS DE LOS VENENOS DE SERPIENTES

Género	Especie	Toxina (* denota los re siduos por molécu la purificada	Ref.
Familia: Elapidae			
Naja	Naja naja atra	Cobrotoxina (62)*	30
	Naja nigricollis	Toxina α (61)	32
	Naja haje haje	Toxina α (61)	33
		Toxina I (61)	138
		Toxina II (61)	138
		Toxina II' (61)	138
		Toxina III (71)	138
	Naja nivea	Toxina α (71)	34
		Toxina β (61)	34
		Toxina δ (61)	34
	Naja melanoleuca	Toxina b (71)	139
	Naja kaouthia	Toxina (71)	32b
	Naja naja siamensis	Toxina 3 (71)	29
		Toxina 5 (61)	29
		Toxina 3c (62)	29
		Toxina 7c (62)	29
	Naja naja	Toxina A (71)	28
	Naja naja naja	Toxina 3 (71)	29
		Toxina 4 (71)	29
	N. N. N. (Cobra negra)	Toxina (71)	32b
Naja naja oxiana	Toxina (61)	32b	
Ophiophagus			
O. hannah	Toxina a (73)	142	
	Toxina b (73)	142	

continua TABLA No.12

Género	Especie	Toxina (* denota los re siduos por molécul la purificada	Ref.
Familia:			
Capridae			
hemachatus	H. hemachatus	Toxina II (61)	140
		Toxina IV (61)	140
Bungarus	B. multicinctus	α -bungarotoxina (74)	147
Colubridae:			
Natrix	N. escutatus escutatus	Toxina (119)	146
		Toxina 1 (60)	146
		Toxina 2 (70)	146
		Toxina 5 (120)	146
Colubridae:			
Dendroaspis	D. polylepis polylepis	Toxina α (60)	141
		Toxina γ (72)	141
Crotalidae:			
Crotalus	C. terrificus terrificus	Crotoxina (206)	35
	C. adamanteus	Toxina (82-84)	149

El componente básico es una fosfolipasa A, cuya actividad específica es dos veces más alta que la de la crototoxina; por otro lado la toxicidad fué dos veces más alta que la de la fosfolipasa A; el componente ácido (crotapotina) carece de toxicidad actividad de fosfolipasa A. (36)

Los pesos moleculares de varias neurotoxinas de diferentes serpientes están resumidos en la Tabla No. 13. Muchos fueron calculados a partir de los datos sobre su composición en aminoácidos; algunos fueron determinados por la combinación de los coeficientes de sedimentación y constantes de difusión, equilibrio de sedimentación o filtración sobre gel.

Las neurotoxinas tipo I tienen un peso molecular entre 700 y 7 000, mientras que las del tipo II es cercano a 7 800. En contraste con las neurotoxinas tipo I y II de la familia Elapidae, el peso molecular de las neurotoxinas de la familia Crotalidae, tienen un valor mucho más alto que oscila entre 16 000 a 11 000 con excepción de la crotamina que tiene un peso molecular de 5 474.

La diferencia en tamaño molecular de las neurotoxinas entre diferentes especies, tiene una implicación muy significativa en la rapidez de aparición de los síntomas de envenenamiento. Los síntomas de envenenamiento debido a las neurotoxinas de cobras, coralillos, etc., aparecen en pocas horas y con frecuencia en pocos minutos. La mordida de las víboras de cascabel y bothrops no causa trastornos inmediatamente sino hasta después de varias horas ó días; esto es debido al tamaño, las toxinas de la familia Elapidae son más pequeñas que las de la familia Crotalidae y por esta razón se difunden más rápidamente en los órganos vitales que aquellas, ejerciendo de inmediato su acción tóxica.

TABLA No.13 PESOS MOLECULARES DE LAS NEUROTOXINAS

Género	Especie	Toxina	Métodos			Ref.
			Composición Aminoácida	Equilibrio de Sedimentación	Gel	
Familia: Elapidae						
Naja	N.N.Atra	Cobrotoxina	6959			26,31
		F-1	6803			29
	Naja naja	Toxina 3	7834			29
		Toxina 4	7807			29
		Toxina A	7802			28
	N.N.Siamensis	Toxina 3	7820	8000		29
		Toxina 3c	6798	8200	4600	29
		Toxina 5	6875	9600	5000	29
		Toxina 7c	6985	9500	4200	29
	N.Nigricollis	Toxina α	6787	6900		32
	N.Haje	Toxina I	6843			138
		Toxina II	6857			138
		Toxina II'	6887			138
		Toxina III	7806			138
		Toxina α	6845			33
	Naja Nivea	Toxina α	7897	8300		34
		Toxina β	6973	7300		39
		Toxina δ	6834	7000		34
Búngarus	B.Multicinctus	α -Bungaro	7840			143
		toxina	7904		8000	140



continua TABLA No.13

Género	Especie	Toxina	Métodos			Ref.
			Composición Aminoácida	Equilibrio de Sedimentación	Gel	
Hemachatus	H.Hemachatus	Toxina II	6838			140
		Toxina IV	6831			140
Notechis	N.Scutatus	Notexina	13574		10000	148
	Scutatus					
Dendroaspis	D.Polylepis	Toxina δ	7939			141
	Polylepis	Toxina γ	8034			141
Crotalidae:						
Crótalus	C.Terrificus	Crotoxina	30000			144
	Terrificus					
	C.Durrisus	Crotoxina	21000		21000	35
	Terrificus	Crotamina	5474			35

III.2 SECUENCIA Y COMPOSICION AMINOACIDA

Datos recientes sobre las propiedades de un número de toxinas, llevó a suponer un alto grado de semejanza ó identidad en sus funciones, excepcionalmente ricas en residuos de hemiciستinas los cuales estan en la forma de uniones disulfuro. Otra característica común, es el alto contenido de treonina y serina, con grupos OH en un rango de 8 a 14 y altas cantidades de ácido aspártico, esencialmente en la forma de amida. Las neurotoxinas tipo I de diferentes cobras tienen en común 15 aminoácidos, pero carecen de alanina, fenilalanina y metionina ó leucina. En contraste, las neurotoxinas tipo II consistentes de 71-74 residuos, contienen aminoácidos generalmente ausentes en las neurotoxinas tipo I; tienen de 2 a 5 residuos de alanina y de 1 a 3 residuos de fenilalanina. Mientras que las neurotoxinas tipo I son ricas en ácido glutámico y pobres en valina.; las neurotoxinas tipo II son totalmente lo opuesto. La abundancia de aminoácidos hidrofóbicos en las toxinas largas puede explicar, por lo menos en parte, la irreversibilidad de su acción neuromuscular bloqueante.

Los datos sobre la composición en aminoácidos están dados en las Tablas 9, 10.

Uno de los más notables hallazgos en los estudios sobre la secuencia aminoácida de las neurotoxinas tipo I ó cortas, es que las posiciones relativas de los residuos de cisteína son idénticas sin considerar la especie y el origen geográfico (Tabla No.14). Por conveniencia, cada fracción de la neurotoxina, es identificada por un número a partir del nitrógeno terminal al siguiente residuo de cisteína. Puesto que el 6o. y 7o. residuo de cisteína estan proximos uno del otro, no se asigna número a la fracción.

Haciendo una comparación entre las neurotoxinas tipo I de la Tabla 14, se pueden sacar las siguientes conclusiones generales:

FRACCION 1. Hay solamente dos residuos.

FRACCION 2. Hay trece residuos, muchas de las secuencias son notablemente similares.

FRACCION 3. El primer residuo es prolina para las cobras africanas.

FRACCION 4. Generalmente hay 16 residuos con la excepción de una especie.

FRACCION 5. Hay solamente un residuo, y es siempre glicina.

FRACCION 6. Hay 10 residuos.

FRACCION 7. Hay 4 residuos.

FRACCION 8. Hay 1 ó 2 residuos. El primer residuo es siempre asparagina.

Mientras que las neurotoxinas tipo I contienen 8 residuos de cisteína o 4 puentes disulfuro, las neurotoxinas tipo II tienen 10 cisteínas ó 5 puentes disulfuro (Tabla 15). Comparando los dos tipos, aparecen ciertas semejanzas las cuales son ilustradas en la figura número 1; si consideramos el 4o. y 5o. residuo de cisteína del tipo II como una inserción a la fracción 4 del tipo I, la posición relativa del resto de los residuos de cisteína, es igual para los dos tipos. Por ésta razón se asignan segmentos 4a, 4b y 4c a la porción comprendida entre el 3o. y 6o. residuo de cisteína en la secuencia aminoácida perteneciente a las neurotoxinas tipo II.

Los puntos característicos a las neurotoxinas tipo II están resumidos en las siguientes conclusiones, Tabla 15:

FRACCION 1. Hay solamente 2 residuos.

FRACCION 2. Hay de 10 a 13 residuos.

FRACCION 3. Hay 5 ó 6 residuos.

FRACCION 4. Todas las toxinas investigadas tienen 18 - residuos.

4a. Hay 5 residuos.

4b. Hay 3 residuos, existiendo variaciones en los residuos intermedios.

4c. Hay 10 residuos.

FRACCION 5. Los 3 residuos son idénticos sin considerar especie, género y lugar de origen.

FRACCION 6. Hay 10 residuos y son algo variables.

TABLA No. 15 SECUENCIA AMINOACIDA DE LAS NEUROTOXINAS TIPO II

Especie	Toxina	Ref.	F-1		F-2						F-3			F-4a			F-4b		
			Ile-Arg	Cys	Phe-Ile-Thr-Pro-Asp-Val-Thr-Ser-Gln-Ile	---	---	Cys	Pro-Asp-Gly-His-Val	---	Cys	Tyr-Thr-Lys-Met-Trp	Cys	Asp-Asn-Phe	Cys	Gly-Met-			
Naja Nivea	α	39			" " " " " " " " " " " "	---	---	Cys	Pro-Asp-Gly-His-Val	---	Cys	Tyr-Thr-Lys-Met-Trp	Cys	Asp-Asn-Phe	Cys	Gly-Met-			
Naja melanoleuca	b	139	" "	" "	" " " " " " " " " " " "	---	---	"	Ala " " " " "	---	"	" " " " " " " " " " " "	"	" " " " " " " " " " " "	"	Ala-Ser-			
Naja Naja Siamensis	3	40	" "	" "	" " " " " " " " " " " "	---	---	"	" " " " " " " " " " " "	---	"	" " " " " " " " " " " "	"	" " " " " " " " " " " "	"	Ser-Ile-			
Naja Naja	A	28	" "	" "	" " " " " " " " " " " "	---	---	"	" " " " " " " " " " " "	---	"	" " " " " " " " " " " "	"	" " " " " " " " " " " "	"	Ser-Ile-			
Bungarus Multicinctus	α -Bungarotoxina	143	" Val	"	" " " " " " " " " " " "	---	---	"	" " " " " " " " " " " "	---	"	" " " " " " " " " " " "	"	" " " " " " " " " " " "	"	Ser-Ser-			
Dendroaspis Polylepsis	γ	53	Arg-Thr	"	" " " " " " " " " " " "	---	---	"	" " " " " " " " " " " "	---	"	" " " " " " " " " " " "	"	" " " " " " " " " " " "	"	Ser-Gln-			

Especie	Toxina	F-4c			F-5		F-6					F-7			F-8		
		Arg-Gly-Lys-Arg-Val-Asp-Leu-Gly	Cys	Ala-Ala-Thr	Cys	Pro-Lys-Val-Lys-Pro-Gly-Val-Asn-Ile-Lys	Cys	Cys	Ser-Arg-Asn-Asn	Cys	Asn-Pro-Phe-Pro-Thr-Arg-Lys-Arg-Ser						
Naja Nivea	α	" " " " " " " " " " " "	"	" " " " " " " " " " " "	"	" " " " " " " " " " " "	"	"	" " " " " " " " " " " "	"	"	" " " " " " " " " " " "	"	" " " " " " " " " " " "			
Naja Melanoleuca	b	" " " " " " " " " " " "	"	" " " " " " " " " " " "	"	" " " " " " " " " " " "	"	"	" " " " " " " " " " " "	"	"	" " " " " " " " " " " "	"	" " " " " " " " " " " "			
Naja Naja Siamensis	3	" " " " " " " " " " " "	"	" " " " " " " " " " " "	"	" " " " " " " " " " " "	"	"	" " " " " " " " " " " "	"	"	" " " " " " " " " " " "	"	" " " " " " " " " " " "			
Naja Naja	A	" " " " " " " " " " " "	"	" " " " " " " " " " " "	"	" " " " " " " " " " " "	"	"	" " " " " " " " " " " "	"	"	" " " " " " " " " " " "	"	" " " " " " " " " " " "			
Bungarus Multicinctus	α -Bungarotoxina	" " " " " " " " " " " "	" Val	" " " " " " " " " " " "	"	" " " " " " " " " " " "	"	"	" " " " " " " " " " " "	"	"	" " " " " " " " " " " "	"	" " " " " " " " " " " "			
Dendroaspis Polylepsis	γ	" " " " " " " " " " " "	"	" " " " " " " " " " " "	"	" " " " " " " " " " " "	"	"	" " " " " " " " " " " "	"	"	" " " " " " " " " " " "	"	" " " " " " " " " " " "			

Nota: La secuencia de la Toxina α se tom6 como referencia para las dem6s.
 - denota que no existe el residuo.
 " significa que el residuo de la toxina en turno es igual al residuo correspondiente al de la Toxina.

FRACCION 7. Hay solamente 4 residuos.

FRACCION 8. Hay siempre 9 residuos y las secuencias son muy similares.

La posición de la unión disulfuro de las neurotoxinas tipo I fué identificada para la cobrotoxina (37) y las erabutoxinas a y b (38). Es muy probable que todas las neurotoxinas tengan idénticas uniones disulfuro en la misma posición. La posición de las uniones disulfuro pertenecientes al tipo II fueron también identificadas (39) y se presume que todas estas toxinas tienen la misma configuración. La estructura bidimensional del tipo I y II está ilustrada en las figuras 2 y 3.

Aún cuando las neurotoxinas tipo I y II difieren en el número total de residuos de aminoácidos y de cisteína, hay una notable semejanza entre ellos, especialmente cuando los dos residuos de cisteína extra en el tipo II son considerados como parte de la fracción 4, la semejanza de los dos tipos es sorprendente. Esta suposición parte del hecho de que la molécula evoluciona de una forma simple a una más compleja. La evolución del tipo I al tipo II puede ser visualizada, cuando dos residuos de cisteína son introducidos en la fracción 4 de las neurotoxinas tipo I y una unión es formada ahí.

Otra diferencia entre los tipos, es el alargamiento de las fracciones 5 y 8. Por consiguiente, la evolución de las neurotoxinas tipo I a la tipo II debe ser realizada por dos principales cambios: formación de la unión disulfuro en la fracción 4 y alargamiento de las fracciones 5 y 8. Fig. 2.

NEUROTOXINA TIPO I

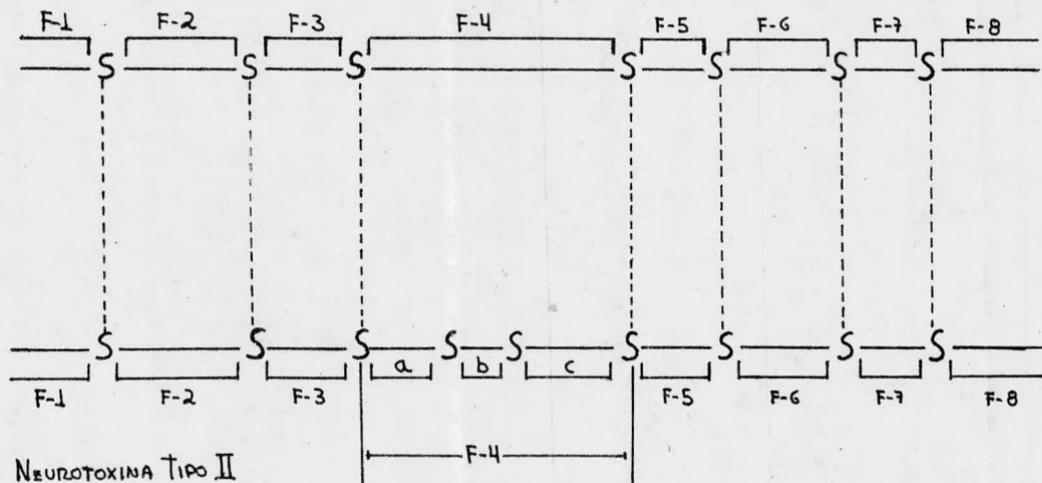


Figura No.1 Diagrama esquemático de las Neurotoxinas Tipo I y II mostrando las similitudes en las posiciones relativas de los residuos de Hemicistina.

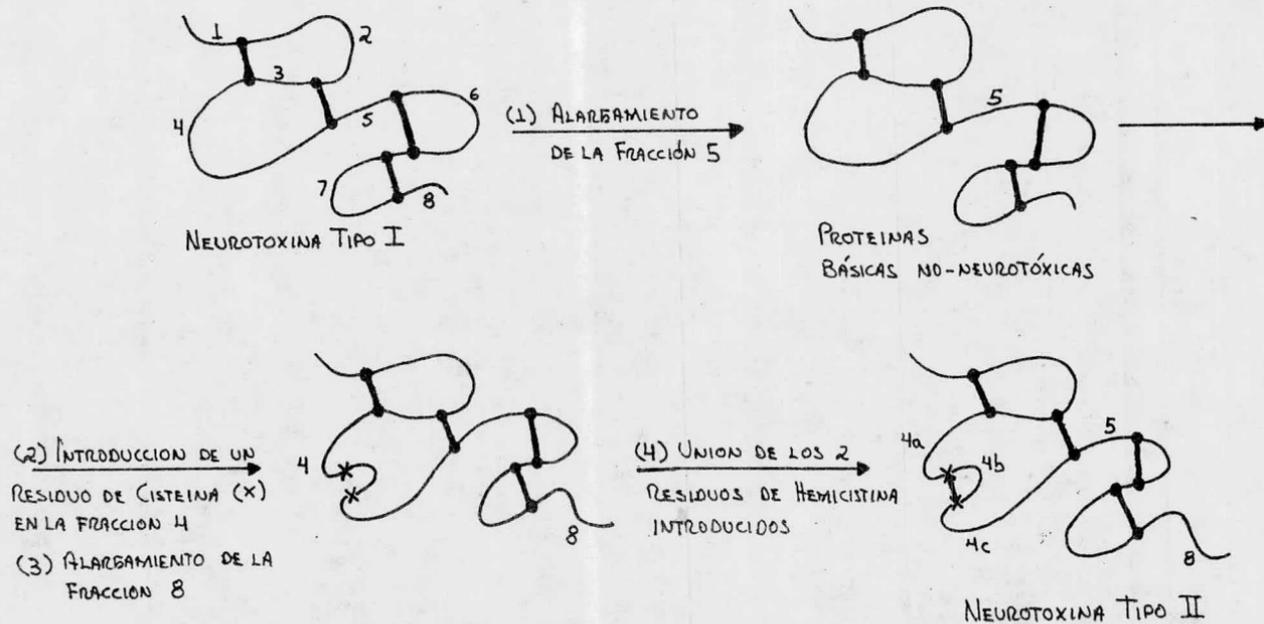


Figura No.2 Conversión de las Neurotoxinas Tipo I a las Neurotoxinas Tipo II y Proteínas Básicas.

III.3 ESTRUCTURA

Para localizar las uniones disulfuro en la molécula de la cobrotoxina, la toxina fué hidrolizada parcialmente con proteasa A ácida y ácido sulfúrico y los péptidos resultantes fueron separados por electroforesis (37). De los resultados del análisis de aminoácidos de los péptidos que contenían azufre y sus componentes oxidados, los 4 puentes disulfuro fueron localizados. Las uniones disulfuro fueron encontradas entre los residuos de hemicistina en las posiciones 3 y 24, 17 y 41, 43 y 45 y 55 y 60 (37); la estructura de la cobrotoxina mostrando las posiciones de la unión disulfuro y la secuencia aminoácida, está representada en la figura número tres.

Todas las toxinas de las serpientes son claramente homólogas con respecto a sus respectivas secuencias, así como en las uniones disulfuro. Botes (39) puntualizó que hay una notable similitud entre la estructura de la toxina α y la cobrotoxina (Fig. 3), particularmente en la posición de las uniones disulfuro. Los residuos de hemicistina homólogos están idénticamente unidos en la cobrotoxina; los dos residuos de hemicistina que no son homólogos entre las posiciones 26 y 30 de la toxina α constituyen un puente disulfuro extra que no se encuentra en la cobrotoxina ni en todas las neurotoxinas tipo I o cortas.

En la fracción 2, comprendida entre el 10. y 20. residuo de hemicistina, la toxina α tiene 3 residuos menos que la cobrotoxina, mientras que en la fracción 3, la toxina α tiene solamente un residuo menos. Solo se encuentran 16 residuos en la fracción que contiene el único residuo de triptofano en la cobrotoxina; la correspondiente fracción de la toxina α , tiene 20 residuos. Se ha especulado, que el número de residuos contenidos en ésta fracción de la toxina α , compensan los cambios en la estructura terciaria producidos por las 3 supresiones en la fracción 2. La estructura interna anillada debido a la inclusión de la unión disulfuro en esta parte de la secuencia (Fracción 4), ayuda a estabilizar el tamaño extendido de la fracción. (39).

El número de aminoácidos incluidos en las fracciones 6 y 7 son constantes en ambas toxinas, lo cual puede indicar un estricto requerimiento estructural para la función biológica de la toxina en esta parte de la molécula.

La toxina α en su fracción 8 tiene 7 residuos más que la cobrotoxina, esto podría no tener efecto en la estructura terciaria, por ser parte final de la molécula.

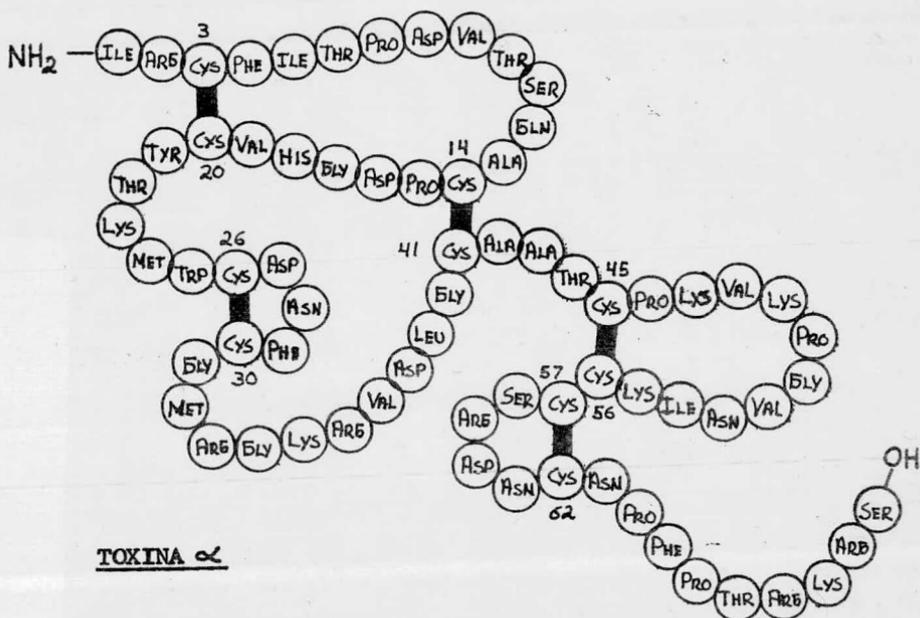


Figura No.3 Estructura bidimensional de la Toxina α (Naja Nivea) mostrando la posición de las uniones disulfuro y secuencia aminoácida.

Se ha reportado recientemente (40), que la digestión de la toxina 3 del veneno de la serpiente *Naja naja siamensis* con una proteinasa cristalina de *arthobacter*, eliminó un tetrapéptido que contenía el carbono terminal; el tetrapéptido fué: Arg⁶⁸-Lys⁶⁹-Arg⁷⁰-Pro⁷¹, la molécula resultante tuvo el 50% de la toxicidad en comparación con la toxina intacta. Las moléculas parentales del dipéptido Arg⁷⁰-Pro⁷¹ y del tripéptido Lys⁶⁹-Arg⁷⁰-Pro⁷¹ fueron aisladas también y se encontró que tenían el 70% de la actividad letal. Estas observaciones indican que la porción con el carbono terminal no es esencial para la actividad biológica; la disminución gradual en la toxicidad parece ser una consecuencia de la disminución de la carga catiónica neta de la molécula.

Una característica extraordinaria de la estructura de las toxinas de serpientes en relación con la actividad neurotóxica, es la rigidez impuesta por los puentes disulfuro; esto trae como consecuencia una alta resistencia hacia la degradación por enzimas (30)(41), estabilidad a temperaturas altas y a los ácidos y una alta resistencia a la desnaturalización a P^H neutro. (42)(43) De acuerdo a los conceptos sobre la estructura de las proteínas, no es de sorprenderse, que los puentes disulfuro sean uno de los principales factores en la construcción de la estructura terciaria de las proteínas y que además gobiernan la actividad biológica de las mismas.

La interacción entre los grupos hidrofóbicos a los lados de la cadena en la cadena polipeptídica es otro factor importante en adición a los puentes disulfuro para mantener al polipéptido dentro de una conformación definida. Los residuos hidrofóbicos están supuestamente incrustados dentro de la molécula, formando uniones hidrofóbicas, mientras que los grupos cargados pueden estar dispuestos sobre la superficie de la molécula debido a su naturaleza hidrofílica. Comparando la hidrofobicidad en la cadena polipeptídica de varias neurotoxinas, se encontró que la distribución de los residuos hidrofóbicos en las cadenas es bastante similar; esto también indica que la estructura tridimensional de estas toxinas es también parecida, apoyando la proposición de que las supresiones e inserciones de residuos son muy improbables.

La región entre las posiciones 25 y 40 de la cobrotoxina es de particular interés; en ésta región se encuentran los residuos más básicos y los residuos con anillo aromático y está completamente libre de prolina y cisteína; esta fracción posible

nte proyecta hacia afuera a la molécula por sus propiedades hí-
poflicadas. La región parece contribuir predominantemente a la --
toxicidad de la molécula, pero aún no ha sido demostrado, en to-
do caso, que esta región es requerida para la interacción de la
toxina con el receptor ó para mantener a la molécula en su con-
formación activa. Se ha pensado que la cristalografía de Rayos X
podría resolver el problema. (44)

Dada la semejanza entre la estructura primaria y la --
tructural de las neurotoxinas de serpientes, se sugiere también --
la similitud en la conformación; por consiguiente, el análisis
estructural de una toxina de cualquier género ó especie puede --
servir de bases para considerar la relación estructura-función para es-
ta clase de toxinas.

A diferencia de las proteínas ordinarias, la cobrotoxina
tiene una hélice α enrollada hacia la izquierda. (45) Cuando
las uniones disulfuro son reducidas, la molécula se convierte en
una conformación enrollada al azar, sin embargo, la conforma-
ción helicoidal a la izquierda es regenerada por oxidación con --
peróxido de hidrógeno. De los estudios sobre dispersión óptica rotatoria (ORD)
y dicroísmo circular (CD) se ha sugerido que la cobrotoxina tam-
bién tiene la estructura β . Cuando la toxina se somete a la acción
del ácido perfórmico y S-carboximetilación, esta se convierte --
en una forma enrollada al azar mezclada con pequeñas cantidades
de hélice α y estructura β .

El papel de los puentes disulfuro para mantener la ori-
entación de una molécula en el espacio está bien reconocida y en
estas toxinas no es la excepción. Cuando la cobrotoxina fué reduci-
da con β -mercaptoetanol, la toxicidad desaparece; por exposición
al aire la toxina reducida al aire, las uniones disulfuro fueron rege-
neradas y la toxicidad se restableció completamente. El espectro
de infrarrojo y la rotación óptica fueron idénticos al estado ori-
ginal. (47)

Aparentemente los puentes disulfuro son las principa-
les uniones que mantienen la configuración de las neurotoxinas ac-
tivas biológicamente. El bajo peso molecular y el alto contenido
de uniones disulfuro, sugiere que estas moléculas tienen una es-
tructura bastante compacta.

III.4 MODIFICACION QUIMICA

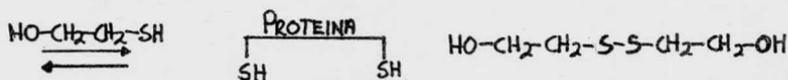
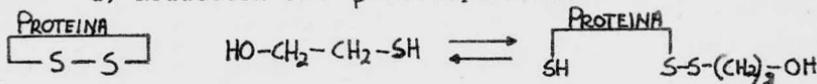
En los últimos años se han usado varias técnicas para la modificación química de las neurotoxinas (Tabla No.16), con el propósito de estudiar la relación de la estructura con la toxicidad mediante la modificación de grupos específicos.

Es necesario distinguir entre dos tipos de grupos esenciales. El primer tipo son los grupos esenciales funcionalmente, que son los grupos involucrados directamente en la letalidad de la toxina y el segundo tipo, son los grupos esenciales estructuralmente que son requeridos por la molécula para lograr su conformación activa.

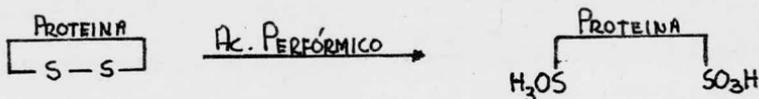
III.4.1 UNION DISULFURO

La unión disulfuro es esencial para la acción letal de las toxinas, cuando la la unión disulfuro en la cobrotoxina es reducida con β -mercaptoetanol (47) ó es oxidada con ácido perfórico (41), la toxicidad se pierde. Las uniones disulfuro son responsables de mantener la conformación de la neurotoxina; este cambio en el arreglo espacial, sin alterar la estructura primaria, causa la pérdida de la toxicidad.

a) Reducción con β -mercaptoetanol:



b) Oxidación con ácido perfórico:



Toxina	Residuo Aminoácido	Reactivo	Toxicidad Residual %	Actividad Antigénica Residual %	Observaciones	Ref.
Cobrotoxicina	Triptofano	Ozono	3.1	80	Trp-29	27
		HNB-Bromuro	6.2	100	Trp-29	56
		NPS-Cloruro	3.1	95	Trp-29	56
		NBS	1.6	90	Trp-29	56
	Tirosina	¹³¹ I	100	100	Tyr-25 y 35	56
		TNM	100	100	Tyr-25	52
		TNM en Guanidina-HCl 5M	0	0	Tyr-25 y 35	52
		¹³¹ I en Guanidina-HCl 5M	100	100	Tyr-25 y 35	58
	COOH libres	EDC en Glicil metil ester	75	70	6 de 7 COOH	57,48
		EDC Glicil metil ester en Guanidina-HCl 5M	0	0	Los 7 COOH Glu-21 es esencial	57,48
	NH ₂ libres	FITC	13.4	100	Todos los NH ₂ libres	50
		TNBS (1:1:1)	100	100	1 α -NH ₂ y 3 ϵ -NH ₂	153
		TNBS (1:2:2)	0	0	Lys-27 Lys-27 y 47	48 48
	ϵ -NH ₂	O-Metilosourea	100	100	Todos los ϵ -NH ₂	48
	α -NH ₂	TNBS	100	100	Después de la Guanidación	48
	Unión Disulfuro	β -Mercaptoetanol	2.6	1.0	Todas las uniones	47

Toxina	Residuo Aminoácido	Reactivo	Toxicidad Residual %	Actividad Antigénica Residual %	Observaciones	Ref.
N. Haje Toxina I	Triptofano	Ac. Fórmico saturado con HCl gaseoso	50		Trp-28	43
	Tirosina	TNM (1:400)	16		Tyr-24	43
	COOH libres	EDC, (¹⁴ C) Glicil metil ester	0		Los 6 COOH	43
	NH ₂ libres		(¹⁴ C) Anhidrido Acético	0		Todos los NH ₂ libres
					1 α-NH ₂ y 6 ε-NH ₂	
(¹⁴ C) Anhidrido Acético en Guanidina-HCl 5M			0		Todos los NH ₂ libres y Tyr-24	43
Toxina III	NH ₂ libres	(¹⁴ C) Anhidrido Maleico	0		Todos los NH ₂ libres	43
		Cloruro de Dansilo	0		Lys-26 y 46	43
		(¹⁴ C) Anhidrido Acético	0		Un α-NH ₂ y 4 ε-NH ₂	43
Siamensis Toxina 3	NH ₂ Libres	KCNO	3.0		Exacarbami- lado	40
		KCNO titulado con Anh. Acético	70		Derivado no noacetilado	40
		ε-NH ₂	O-metilosourea	50		Todos los ε-NH ₂

continua TABLA No.16

Toxina	Residuo Aminoácido	Reactivo	Toxicidad Residual %	Actividad Antigénica Residual %	Observaciones	Ref.	
Toxina 3	Arginina	Fenilgloxal	0		Arg-33 es esencial	40	
Naja Toxina 3	NH ₂ libres	KCNO	20		Pentacarba milado	40	
Erabutoxina a	Triptofano	HNB-Bromuro	~ 5.0	Inmunodifusión (+)	Trp-29	55	
		NBS	~ 5.0	(+)	Trp-29	55	
Erabutoxina b	Histidina	131I	100	(+)	His-26	59	
L. Semifasciata Toxina a	Triptofano	NBS	0	(+)		42	
		Lisina	O-metilosoarea	100		3 de 4	42
		Arginina	CHD	100		1 de 3	42
Toxina b	Triptofano	NBS	0	(+)		42	
		Lisina	O-metilosoarea	100		4 de 5	42
		Arginina	CHD	100		1 de 2	42
Schitosa Toxina	Triptofano	NBS	0			154	
Hardwickii Toxina	Triptofano	HNB-Bromuro	0	(+)		53	
		NPS-Cloruro	0	(+)		53	
		NBS	0	(+)		53	

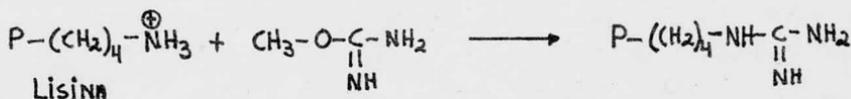
III.4.2 LISINA Y AMINOACIDOS CON NITROGENO TERMINAL

Puesto que todas las toxinas conocidas son proteínas - básicas con puntos isoelectricos por encima de P^H 9, la importancia de los residuos básicos en las toxinas, se hace latente.

Los residuos de lisina en las neurotoxinas a y b de la serpiente marina *Laticauda Semifasciata* fueron modificados con *O*-metilosourea (42). Tres ó cuatro grupos ϵ -amino de lisina en la toxina a y cuatro ó cinco en la toxina b no son esenciales para la acción tóxica. El mismo reactivo fué usado para la modificación de la toxina 3 del veneno de la serpiente *Naja naja siamensis* (40), cuatro residuos de lisina así como el grupo α amino del aminoácido *N*-terminal isoleucina, fueron modificados sin pérdida de la toxicidad.

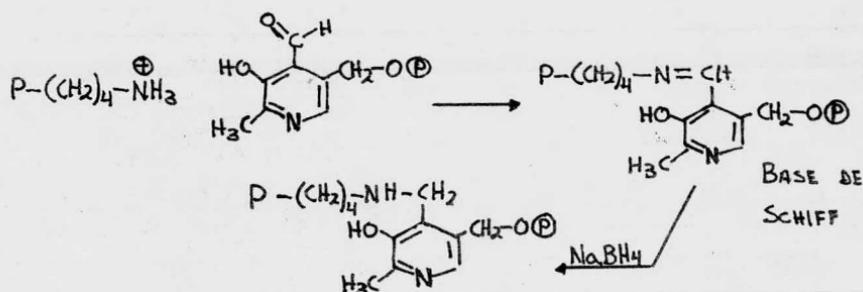
En el caso de la cobrotoxina, los tres residuos de lisina fueron modificados; el aminoácido *N*-terminal leucina, no fué modificado. La toxina modificada mostró su toxicidad completamente (48). La guanidinación de las toxinas con *O*-metilosourea, conserva los residuos de lisina en residuos de homoarginina; aparentemente la conversión del grupo ϵ -amino al grupo guanidino no altera la acción letal. (48)

a) *O*-metilosourea: $P = \text{Proteína}$



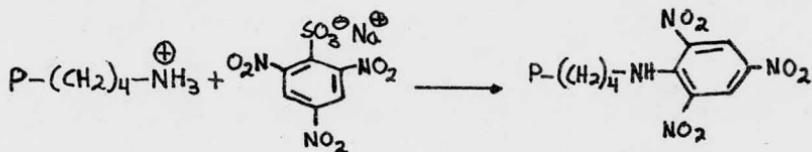
También se han modificado los residuos de lisina y el aminoácido *N*-terminal de la toxina de la especie *Naja Naja siamensis* con fosfato de piridoxal, seguida por la reducción de la base de Schiff con borohidruro de sodio y se observó que la toxina retiene su toxicidad. (49)

b) Fosfato de piridoxal: $\text{P} = \text{Fosforo}$



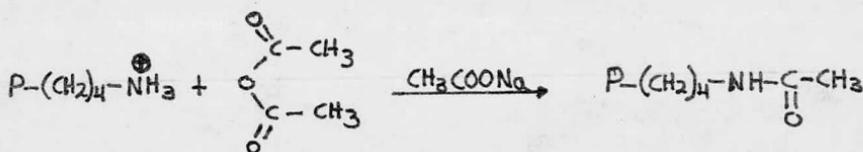
La modificación de los grupos amino libres en la cobro
 oxina por el reactivo ticarbamolato de fluoresceína, disminuyó
 la toxicidad sin afectar la antigenicidad (50); esto sugiere que
 los sitios antigénicos de la toxina son diferentes de los sitios
 activos de la toxicidad. Los grupos de lisina fueron modificados
 por el uso del sulfonato de trinitrobenzeno; cuando lisina 27 --
 fué modificada selectivamente, no se observó pérdida de la toxi-
 cidad, sin embargo, cuando lisina 27 y 47 fueron modificadas, una
 pérdida completa en la toxicidad fue observada. Esto sugiere que
 el grupo ϵ -amino de Lys-47 es esencial para la acción tóxica.
 48)

c) Sulfonato de trinitrobenzeno:

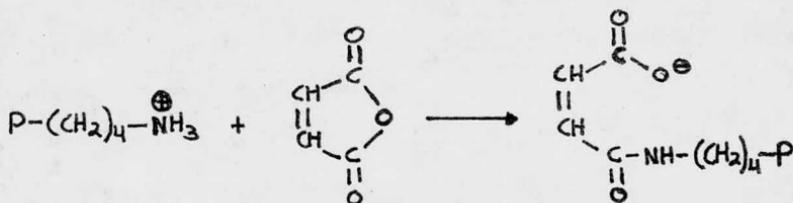


Por otro lado, se ha reportado que los residuos de lisina de la neurotoxina I perteneciente a la especie *Naja haje* son elementos esenciales del sitio activo (43). La acetilación, maleilación y dansilación de las toxinas I y III ha probado estas consideraciones. Las toxinas acetiladas pierden su actividad total sin modificar sus propiedades conformacionales. La maleilación, la cual reemplaza las cargas positivas por cargas negativas, reduce la estabilidad de la proteína drásticamente por la repulsión electrostática de las cargas negativas (51) y decrece la letalidad. Este resultado y el de la acetilación son considerados pruebas convincentes de que uno ó varios grupos amino son parte del sitio activo de la neurotoxina. La dansilación afecta selectivamente Lys-27 y 53. Es interesante hacer notar que Lys-6 de la misma neurotoxina I no es dansilada. La cinética de la pérdida de la toxicidad es estrechamente paralela a la modificación covalente de estos dos residuos de lisina.

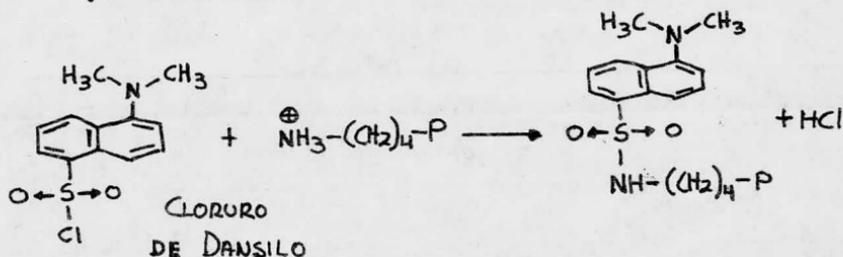
d) Acetilación:



e) Maleilación:



f) Dansilación:



III. 4.3. RESIDUOS DE ARGININA

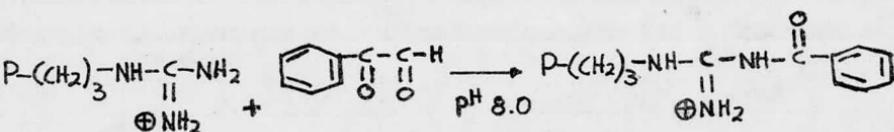
La cobrotoxina es un polipéptido básico que tiene 6 -- residuos de arginina en las posiciones 28, 30, 33, 36, 39 y 59 -- (Tabla No.14). La reacción con fenilglioxal a pH 8.0 y 27°C provocó la pérdida de la toxicidad casi completamente y una pronunciada disminución en la actividad antigénica con tan solo la modificación de 4 residuos. Sin embargo la proporción de la inactivación disminuyó significativamente cuando el pH de la reacción fué disminuido. Solamente un residuo de arginina fué modificado, cuando la reacción fué llevada a cabo a pH 6.0 y el derivado retuvo la actividad biológica; esto indica que por lo menos uno de los 6 residuos no es esencial, y este residuo resultó ser Arg-28. Reacciones posteriores dieron los resultados expuestos en la Tabla No.17.

Por otra lado, las toxinas a y b contienen 3 y 2 moles de arginina respectivamente; la modificación con 1,2 ciclohexanona ataca a un residuo de arginina en ambas toxinas sin cambio en su toxicidad (42). Este echo confirma, que por lo menos uno de los residuos de arginina no es esencial para la letalidad de las neurotoxinas.

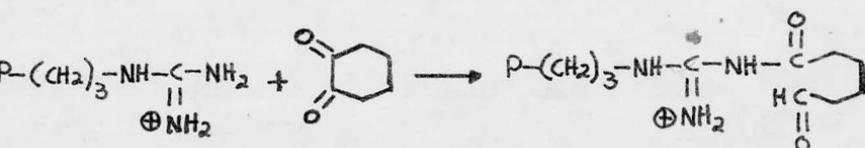
**TABLA No.17 MODIFICACION DE RESIDUOS DE ARGININA EN LA COBROTOXINA
CON FENILGLOXAL VARIANDO EL PH-**

Cobrotoxina	Residuos de Arg. modificados	Letalidad (%)	Actividad Antigénica (%)
	Ninguno	100.0	100
a PH 6.0	Arg-28	100.0	98
a PH 6.7	Arg-28, 36	22.6	94
a PH 7.5	Arg-28, 30, 36	3.1	70
a PH 8.0	Arg-28, 30, 36, 39	1.6	34

a) Fenilglizal:



b) Ciclohexanodiona:

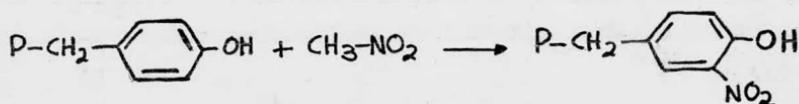


III.4.4 RESIDUO DE TIROSINA

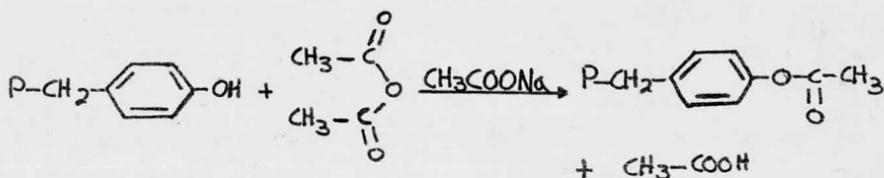
La cobrotoxina contiene dos moles de tirosina, uno de los es importante para la acción letal. Cuando Tyr-35 fué nitrada con nitrometano, no se observó cambio alguno en la actividad biológica; sin embargo, en presencia de clorhidrato de guanidina 5M Tyr-25 fué modificada con pérdida de la toxicidad. Esto indica que Tyr-25 es esencial para mantener la conformación de la toxina, así como su actividad biológica. (52)

La nitración y la acetilación, muestran que Tyr-24 de la toxina I de la especie Naja haje está enmascarada en la conformación original. Es interesante hacer notar que el residuo de tirosina en la posición 25 es común para todas las toxinas (Tabla No.14 y 15); esto, junto con los resultados encontrados, indican que Tyr-25 es esencial para mantener la conformación activa. (43)

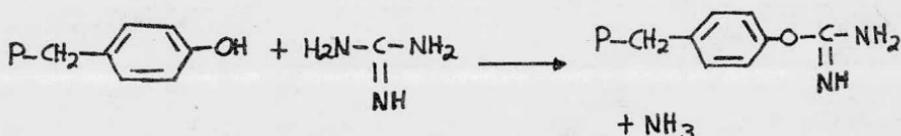
a) Nitración con nitrometano:



b) Acetilación:



c) Guanidinación:

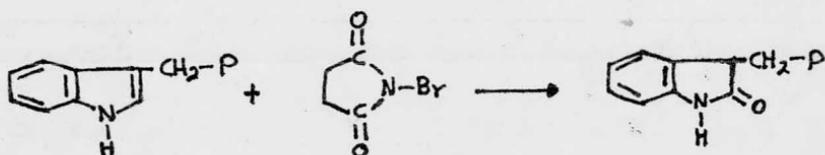


III.4.5 RESIDUO DE TRIPTOFANO

Se ha demostrado que la toxicidad de la cobrotoxina de cobra parece progresivamente cuando el residuo de triptofano es oxidado con *N*-bromosuccinimida (NBS) (27); esto también se observó en otras toxinas (53)(54)(55). Solo existe un residuo de triptofano en estas neurotoxinas, por lo tanto, es claro concluir que el residuo es esencial para la acción tóxica.

Se había reportado, que la modificación con NBS puede causar rompimiento de la unión péptica conteniendo el triptofano (56). Esta posibilidad fue excluida para el caso de las neurotoxinas de serpientes. (49)

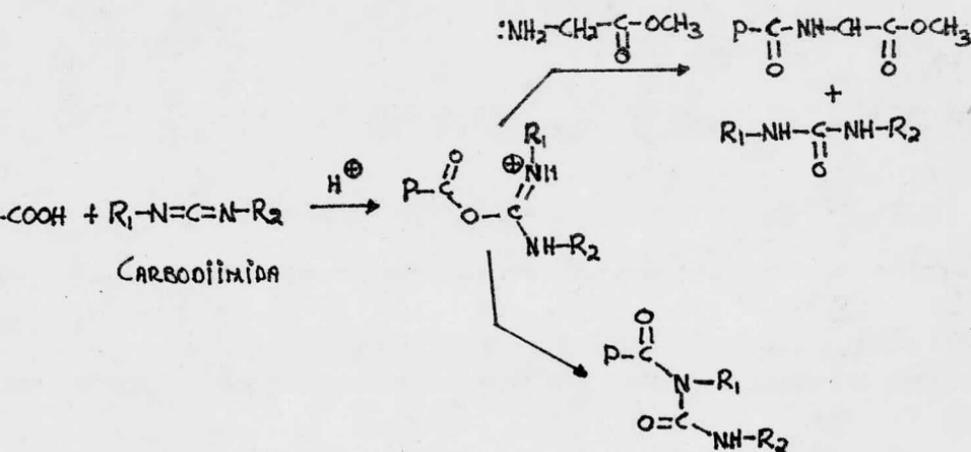
a) Oxidación con NBS:



III.4.6 GRUPOS CARBOXILO LIBRES

La cobrotoxina tiene siete grupos carboxilo libres, cuatro en el residuo de ácido glutámico, dos en el residuo de aspartico y uno en el aminoácido terminal asparagina. Los grupos carboxilo se modificaron con el ester glicil metílico, después una activación con una carbodiimida; seis de los siete grupos carboxilo reaccionaron en ausencia de clorhidrato de guanidina para alterar la actividad biológica. Cuando el grupo carboxilo restante fué modificado con el mismo reactivo a concentración 5M la toxina perdió su toxicidad (48)(57). Este carboxilo resultó ser el grupo carboxilo γ de Glu-21. Todas las neurotoxinas tipo I cortas y parte de las toxinas largas, tienen grupos ácidos en esta región, variando la posición de estos grupos. La actividad inmunológica desaparece con la modificación de todos los grupos carboxilo; esto puntualiza una posible destrucción de la conformación.

a) Carbodiimida, ester glicil metílico:



III.4.8 TOXINAS MARCADAS

Con el propósito de estudiar mejor la naturaleza bioquímica y el sitio de acción de las toxinas, es aconsejable introducir una marca o etiqueta radioactiva en los péptidos y en las proteínas. Este proceso deberá cumplir dos criterios básicos: a) la toxina modificada debe ser rápidamente separada de la toxina que no reaccionó y b) la toxina purificada y modificada debe ser biológicamente activa. La α -bungarotoxina aislada del veneno de la especie *Bungarus multicinctus* ha sido recientemente acetilada con anhídrido acético (3H) y N-(3H)acetilimidazol; las toxinas modificadas con estas reacciones mostraron ser muy estables (60) y activas biológicamente. Varios trabajos se han realizado con estas toxinas marcadas. (60)(61)(62)(63)

III.5 SINTESIS

Las técnicas en los laboratorios de investigación han evolucionado notablemente, lo cual ha conducido a la síntesis de compuestos muy complejos y al examen de su estructura y funciones.

La síntesis de un péptido con la secuencia de la cotoxina ha sido realizada gracias a estos adelantos, esencialmente de acuerdo al método de fase sólida de Merrifield (64)(65). La síntesis comprende la adición escalonada de aminoácidos protegidos por un copolímero clorometilado de estireno y divinilbenceno para formar una unión covalente con las partículas sólidas de la resina.

Primeramente la resina es clorometilada con clorometilmetil ester; por otro lado, el aminoácido con el carbono terminal es protegido con el compuesto Boc (tert-Butiloxycarbonilo) en el grupo amino. Es necesario hacer notar que los aminoácidos protegidos con este reactivo, también deberán estar protegidos en los residuos de aminoácidos que van a los lados de la cadena polipeptídica.

Los Boc-aminoácidos protegidos para la síntesis fueron: Arg(NO₂), His(Z), Ser(Bzl), Asp(OBzl), Glu(OBzl), Thr(Bzl) y Cys(MBzl).

La resina y el Boc-aminoácido en este caso Boc-Asn, 5g. y 1.69g. respectivamente, son tratados con una mezcla de trietilamina (1.02 ml.) y dimetilformamida (30 ml.) por 24 h. a 50°C. Después de este tiempo, el compuesto resina-Asn-Boc se trata con HCl 1M en ácido acético durante 30 minutos a 25°C para obtener el clorhidrato Asn-resina.

Este producto es lavado con ácido acético glacial, alcohol absoluto y dimetilformamida en volúmenes de 25 ml. y neutralizado con trietilamina al 10% en dimetilformamida durante 10 minutos, efectuando un lavado más con dimetilformamida y cloruro de metileno. A partir de este paso, la resina-Asn se agita durante 10 minutos con una solución del Boc-aminoácido que se quiera introducir en el grupo amino del aminoácido (Asn) en cloruro de metileno y N,N-diciclohexilcarbodiimida como agente copulante durante 4 hrs.

El proceso se repite nuevamente hasta obtener el péptido que se desea.

Después de la incorporación del residuo de triptofano durante la reacción de desbloqueo y el lavado con ácido acético, se añadió β -mercaptoetanol (0.2 ml.) a la mezcla de reacción y se burbujeo nitrógeno para desalojar el aire. El rendimiento de la resina unida al péptido de 62 residuos protegidos fue de 4.44g. (39%).

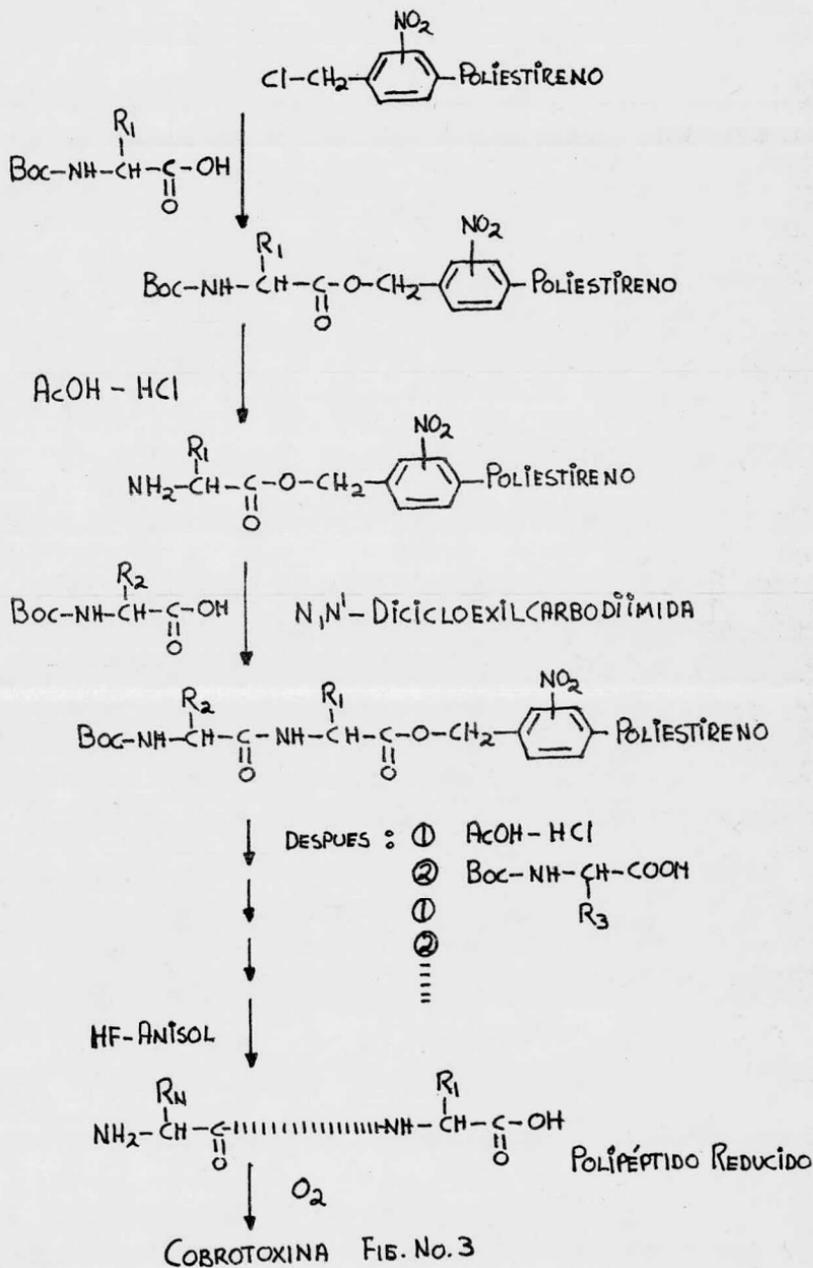
Una parte de este polipéptido (0.50g.) fue tratada con HF (5ml.) en presencia de anisol (0.5ml.) durante una hora a 0°C para al péptido de la resina y quitar los grupos protectores. Después de evaporar el ácido, un residuo fue extraído con ácido acético al 5%, se lavó con acetato de etilo y se liofilizó (55mg).

El residuo se purificó sobre sephaderx, se dializó con ácido acético 0.1M y se liofilizó; rendimiento 26mg.

La oxidación del polipéptido se efectuó de acuerdo con el siguiente método: una solución del polipéptido en 13 ml. de buffer fosfato 0.05M, PH 7.2 conteniendo NaCl 0.1M fue llevada a reposar en un frasco al aire libre durante 3 días sin agitación. Pasado este tiempo, se dializó otra vez con agua y se liofilizó para dar 22 mg. de producto oxidado.

El producto sintético mostró ser similar en comportamiento a la cobrotoxina natural en un experimento de inmunodifusión (66). El péptido purificado tuvo el 20% de la actividad letal de la cobrotoxina.

En la siguiente página se presenta un esquema simplificado de la síntesis.



III.6 PROTEINAS BASICAS

Unas proteínas básicas, termicamente estables que no tienen propiedades neurotóxicas, pero que son estructuralmente similares a las neurotoxinas, han sido aisladas de los venenos de las serpientes pertenecientes a la familia Elapidae y llamadas por nombres, tales como cardiotoxina, factor directo lítico (DLF), cobraminas, citotoxinas y toxina Y (67)(68). Se supone que las citotoxinas son una mezcla de las cobraminas así como el factor directo lítico. (69)(70)(71)(72)

La composición aminocídica de algunas proteínas básicas está resumida en la Tabla No.18. La secuencia aminocídica está representada en la Tabla No.19.

Estas proteínas no presentan actividad neurotóxica, -- en embargo, estructuralmente son similares a las neurotoxinas -- tipo I. La posición relativa de los residuos de cisteína es la misma; el carboxilo terminal para la cardiotoxina y la citotoxina I pertenece a la asparagina y es adyacente al octavo residuo de cisteína. Una diferencia notable entre estas proteínas, está representada en la fracción 5; en el tipo I hay solamente un residuo, mientras que en las proteínas básicas hay tres residuos; en este aspecto se asemejan al tipo II, que también contienen 3 residuos en la fracción 5.

Por otro lado, estas proteínas exhiben actividades biológicas diferentes a las del tipo I y II; una posible evolución química de las neurotoxinas tipo I a las proteínas básicas y al tipo II está ilustrada en la figura No.2.

Género Especie Subespecie	Naja Naja Atra	Naja Naja	Hemachatus Hemachatus	
Nombre	Cardiotoxina	Cobramina B	Citotoxina CM-XI	DLF
Aminoácido				
Ac. Aspártico	6	5	7	6
Treonina	3	3	3	3
Serina	2	2	2	3
Ac. Glutámico	---	---	1	1
Prolina	5	4	5	5
Glicina	2	2	2	2
Alanina	2	2	2	1
Hemicistina	8	6	8	8
Valina	7	6	6	4
Metionina	2	2	2	2
Isoleucina	1	1	2	2
Leucina	6	5	6	6
Tirosina	3	3	5	1
Fenilalanina	2	1	---	1
Lisina	9	8	8-9	10
Histidina	---	---	---	1
Arginina	2	2	2	1
Triptofano	---	---	---	---
Residuos totales	60	52	61-62	57
N-terminal	Leu		Leu	Leu
C-terminal	Asn		Asn	Asn
Referencia	73	69	73	67

TABLA No. 19 SECUENCIA AMINOACIDA DE LAS PROTEINAS BASICAS

Especie	Proteina Básica	F-1				F-2				F-3				F-4				
		Leu-Lys	Cys	Asn-Lys-Leu-Val	Pro-Leu-Phe-Tyr-Lys-Thr	Cys	Pro-Ala-Gly-Lys-Asn-Leu	Cys	Tyr-Lys-Met-Phe-Met-Val-Ala-Thr-Pro-Lys-Val									
Naja Naja Atra	Cardiotoxina	" "	" "	" "	" "	" "	" "	" "	" "	" "	" "	" "	" "	" "	" "	" "	" "	" "
Naja Naja (India)	CM-XI	" "	" "	" "	" "	" "	" "	" "	" "	" "	" "	" "	" "	" "	" "	" "	" "	" "
Naja Naja	F-8	" "	" "	" "	" "	" "	" "	" "	" "	" "	" "	" "	" "	" "	" "	" "	" "	" "
Naja Haje	Cardiotoxina	" "	" "	His	" "	" "	" "	" "	" "	" "	" "	" "	" "	" "	" "	" "	" "	" "
Naja Melanoleuca	Cardiotoxina	" Glu	" "	" "	" "	" "	" "	" "	" "	" "	" "	" "	" "	" "	" "	" "	" "	" "
Naja Nigricollis	Toxina γ	" "	" "	" Gln	" Ile	" Pro	" Trp	" "	" "	" "	" "	" "	" "	" "	" "	" "	" "	" "
Hemachatus Hemachatus	DLF	" "	" "	" "	" "	" Phe-Leu-Ser	" "	" "	" "	" "	" "	" "	" "	" "	" "	" "	" "	" "

Especie	Proteina Básica	F-5				F-6				F-7				F-8		
		Pro-Val-Lys-Arg-Gly	Cys	Ile-Asp-Val	Cys	Pro-Lys-Ser-Ser-Leu-Val-Leu-Lys-Tyr-Val	Cys	Cys	Asn-Thr-Asp-Arg	Cys	Asn.					
Naja Naja Atra	Cardiotoxina	" "	" "	" "	" "	" "	" "	" "	" "	" "	" "	" "	" "	" "	" "	
Naja Naja (India)	CM-XI	" "	" "	" "	" "	" "	Asn	" "	" "	Glu	" "	" "	" "	" "	" "	
Naja Naja	F-8	" "	" "	" "	" "	" "	Asn	" "	Leu-Val	" "	" "	" "	" "	" "	" "	
Naja Haje	Cardiotoxina	" "	" "	" "	" "	" "	Asn	" "	Ala-Leu-Val	" "	" "	" "	Ser	" "	Lys	
Naja Melanoleuca	Cardiotoxina	" "	" "	" "	" "	" "	" "	" "	Leu-Val	" "	" "	" "	" "	" "	" "	
Naja Nigricollis	Toxina γ	" "	" "	" "	" "	" "	" "	" "	Leu-Ile	" "	Met	" "	" "	" "	Lys	
Hemachatus Hemachatus	DLF	" Ile	" "	" "	" "	Thr	" Ala	" "	" "	" "	Leu-Val	" Val	" "	" "	Lys	Lys

Nota: La secuencia de la Cardiotoxina N. N. Atra se tomó como referencia para las demás.
 " significa que el residuo de la Toxina en turno es igual al residuo correspondiente al de la Cardiotoxina.

CAPITULO IV

ENZIMAS

De una manera general, el veneno de muchas serpientes e diferentes géneros y una amplia variedad de especies, contiene un número grande de enzimas que son necesarias para que manifieste sus propiedades tóxicas. La actividad de las enzimas varía de veneno a veneno, así como su toxicidad. Las enzimas comunmente más encontradas en el veneno son: Proteasas, Esterasas, Leucitinasasa ó Fosfolipasa A, Acetilcolinesterasa, L-Aminoácido oxidasa, Nucleasas, Enzimas involucradas en la conversión de Pro-Trombina a Trombina y Fibrinógeno a Fibrina (Actividad Coagulante) e Hialuronidasas.

Es importante hacer notar que un veneno no contiene a todas estas enzimas. En las siguientes páginas se hará una descripción corta del aislamiento, propiedades y funciones de las más importantes enzimas comunmente encontradas en el veneno de estos reptiles.

IV.1 PROTEASAS Y ESTERASAS

Las proteasas han sido encontradas en muchos venenos, todos los venenos de la familia Crotalidae examinados, son ricos en actividad proteolítica, en contraste, los venenos de la familia Elapidae no exhiben esta actividad.

Como una consecuencia de esta actividad, se producen marcados cambios en los tejidos animales, hasta llegar a su destrucción; una característica importante de los venenos que poseen actividad proteolítica, es que también exhiben actividad de esterasa. (74)(75)

El método general para medir la actividad de la enzima esterasa en los venenos, está determinado en la titulación de la cantidad de ácido liberado por la hidrólisis del compuesto p-tolyl-L-arginina metil ester HCl (TAME) con NaOH 0.05N, usando como indicador rojo fenol (76). La reacción es llevada a cabo en un buffer glicina 0.1M, pH 8.5 durante 30 minutos a 25-30 °C.

El método usado para medir la actividad proteolítica, consiste en la determinación de la absorbancia a 660 mμ del filtrado del ácido tricloro acético (TCA) después de la adición del reactivo de Folin; el filtrado se obtiene por la adición de TCA

una mezcla de caseína al 1% ó hemoglobina desnaturalizada también al 1%, buffer fosfato 0.1M, pH 6.8 y la cantidad de veneno usada, con una incubación a 37°C durante 60 minutos.

La actividad proteolítica también puede ser medida en filtrado de TCA a 280 m μ de acuerdo al método de Kunitz (77). Este método consiste en medir la liberación de p-nitroanilina a 37°C usando benzoil-DL-arginina-p-nitroanilina. (78)

Se ha estudiado la habilidad de 15 diferentes venenos de serpientes de norte y sudamérica para hidrolizar la hemoglobina desnaturalizada y benzoil-L-arginina etil ester (BAEE); también se midió la habilidad para la coagulación de la sangre (75) esto se resume en la Tabla No. 20. De una manera general, la habilidad de los venenos para hidrolizar BAEE es inferior comparándola con la actividad de la tripsina hacia el mismo substrato.

Se logró aislar del veneno de la especie *Trimeresurus* *avoridis* una proteasa, cuya purificación se hizo por el empleo de una columna de cromatografía; la enzima así obtenida se homogeneizó por ultracentrifugación (79). La actividad de la enzima purificada es completamente inhibida por el tioglicolato de sodio, estearina y agentes quelantes como EDTA, O-fenantrolina y KCN. La actividad del EDTA puede ser invertida por la adición de iones Mn^{++} , Mg^{++} , Zn^{++} .

La actividad proteolítica ó esterasa de los venenos, es inhibida por los inhibidores de la tripsina. El EDTA inhibe la digestión de la hemoglobina por el veneno, pero no por la tripsina (75). La diferencia en el comportamiento de las proteasas y la tripsina y la quimotripsina hacia varios inhibidores, sugiere que son diferentes enzimas. También se ha sugerido que algunos cationes pueden ser involucrados en la hidrólisis de las proteínas por estos venenos. (80)

Los venenos de las especies *Bothrops jararaca*, *Bothrops* *otiaira* y *Bothrops terrificus*, contienen por lo menos una enzima proteolítica muy similar pero no idéntica a la tripsina. La proteasa de la especie *Agkistrodon piscivorus* difiere de la tripsina en muchas formas. Si el veneno es mantenido a pH 3.0 por 20 minutos, pierde toda su actividad proteolítica, pero la tripsina bajo idénticas condiciones, retiene su habilidad para hidrolizar a la hemoglobina. Parece ser, que el veneno de ésta especie tiene dos diferentes enzimas proteolíticas, una actúa a pH 8.5 y otra a pH 6.8-7.0.

TABLA No.20 ACTIVIDAD PROTEOLITICA DE VARIOS VENENOS DE SERPIENTES

Veneno	Hemoglobina	BAEE	Coagulación
Tripsina	610	56	---
Quimotripsina	---	---	---
Agkistrodom Piscivorus	30	8.0	
Crótalus Atrox	21	2.8	---
Crótalus Horridus	17	5.9	2
Agkistrodom Contortrix	13	11.6	---
Bothrops Neviniedi	7.9	2.6	1.6
Bothrops Jararacussu	4.4	3.8	3
Bothrops Jararaca	3.1	3.7	11
Bothrops Insularis	2.5	2.9	3.6
Bothrops Cotiara	2.1	7.9	2.3
Bothrops Alternatus	1.4	0.4	0.25
Bothrops Atrox	1.5	3.8	7.8
Crótalus Adamanteus	1.0	2.3	7
C.Terrificus Terrificus (amarillo)	0.01	0.7	3
C.Terrificus Terrificus (blanco)	0.005	1.4	2

Referencia 75

La actividad para la hemoglobina está expresada en miliequivalentes de tirosina, $\times 10^4$ /mg. liberados cada 15 minutos a 37°C , PH 7.4. Para BAEE, moles de hidrolizado $\times 10^6$ /mg. por minuto a 22°C .

La actividad coagulante está expresada como el recíproco de los miligramos de veneno requeridos para coagular 1 ml. de una solución de 300 mg. de fibrinógeno a PH 7.4 en 30 segundos a 25°C .

El veneno de la especie *Bothrops jararaca* es capaz de hidrolizar a la gelatina, caseína y benzoil argininamida (BAA) (81); se ha encontrado que el veneno pierde su habilidad para hidrolizar a la caseína, cuando este es calentado a 60°C, pero la actividad tiene para hidrolizar BAAE. La hidrólisis de caseína y gelatina es elevada por iones Ca^{++} e inhibida por sulfuros, cianuros, cisteína, glutatión reducido, EDTA, 8-hidroxiquinolina e histamina. (82) Este veneno también puede hidrolizar a TAME y el progreso de ésta reacción puede ser incrementado, si se aumenta el pH a 9; ésta actividad, no puede ser inhibida por los inhibidores de la tripsina ni por la cisteína.

Un estudio reciente (83) sobre la actividad enzimática del veneno de la especie *Crotalus durissus cumanensis*, mostró ciertas semejanzas en cuanto su actividad proteolítica y esterase comparándolas con otras especies del mismo género, esto comprueba que la actividad se manifiesta en toda la familia *Crotalidae*.

IV.1.1. ACTIVIDAD COAGULANTE

Si se compara la actividad proteolítica, esterase y coagulante de varios venenos, aparentemente se podrá observar que no todos los venenos que poseen actividad proteolítica pueden coagular la sangre. Por otro lado, ha sido descubierto, que los venenos con actividad proteolítica baja, exhiben alta actividad coagulante (84), esta actividad que es menor en algunos venenos, se atribuye, a su vez, a la alta actividad de proteasa que hidroliza muchas uniones péptidicas en las moléculas de protrombina y fibrinógeno, que son necesarios para la coagulación de la sangre.

Parece posible que otros factores que influyan en la coagulación, también sean destruidos por esta actividad.

El veneno de la especie *Agkistrodon piscivorus*, el cual posee la más alta actividad proteolítica de todos los venenos, no puede convertir protrombina a trombina ó fibrinógeno a fibrina a cualquier concentración, mientras que la tripsina puede convertir fibrinógeno a fibrina a cualquier dilución. Esto puede indicar que la especificidad de substrato puede ser diferente y es incapaz de hidrolizar la unión péptidica en la molécula de fibrinógeno, que es esencial para la coagulación. (85)

La presencia de enzimas proteolíticas en los venenos, indican que pueden ser involucradas en las causas de la muerte - por mordedura de serpiente y se ha demostrado claramente que el veneno de la especie *Bothrops jararaca* puede causar indirectamente la muerte, por bloqueo de la circulación de la sangre a través de la formación de coágulos, produciendo, por otro lado, necrosis profundas.

La existencia de esta enzima ha sido demostrada en todos los venenos analizados, excepto en la especie *Trimeresurusokinavensis* (89); pero no todas las enzimas son idénticas, cuando son sujetas a la electroforesis, no siempre migran a la misma velocidad.

El método empleado para obtener a la enzima de los venenos es el siguiente: la fosfolipasa se precipita, añadiendo 15 g. de NaCl a 100 ml. de una solución al 2% en agua del veneno, - PH 3.0 ajustando con ácido sulfúrico 1N; la mezcla se lleva a reposar por 20 minutos a 37°C y se filtra después de este tiempo. El precipitado se disuelve en 50 ml. de agua, ajustando el PH a 5.2 y añadiendo 5g. de NaCl; el precipitado que se forma es descartado y el PH del filtrado se ajusta a 2.8--3.0 y se añaden 2g de NaCl. El precipitado formado se separa por filtración y se disuelve en 20 ml. de agua, el PH se ajusta nuevamente a 2.8-3.0 y se añaden 5.2 g. de sulfato de amonio con agitación constante, se filtra la solución y el precipitado que se forma se disuelve en 10 ml. de buffer acetato 0.2M, PH 5.6 y se trata con un volumen igual de una suspensión de alumina (396 mg.), la mezcla se agita a temperatura ambiente durante 30 minutos, después de este tiempo se hace una centrifugación, al sobrenadante se le añaden 5.2 g. de sulfato de amonio, se filtra la solución y al filtrado se le añade el mismo reactivo hasta la saturación, dejando reposar la mezcla por 1 hora. Los cristales que aparecen, son separados por centrifugación y se disuelven en 4 ml. de buffer acetato 0.2M, PH 6.0. La solución se enfria a 10°C y se trata con una solución saturada de sulfato de amonio hasta la aparición de los primeros cristales, dejando elevar la temperatura a 28°C hasta la completa cristalización.

La fosfolipasa A cristalina de la especie *Naja naja* obtenida por éste proceso tiene el 2.9% de proteína y el 52% de la actividad del veneno.

Saito y Hanahan (90) obtuvieron evidencias para asociar la actividad de la fosfolipasa A de la especie *Crotalus adamanteus* con 2 fracciones proteicas, las cuales pueden ser separadas por un método que incluye cambios de PH, de temperatura y cromatografía sobre dietil aminoetil celulosa (DEAE). Las 2 fracciones tienen constantes de sedimentación similares, tienen cargas diferentes migrando a distintas mobilities, también tienen diferentes puntos isoeléctricos, con pesos moleculares que varían en un margen de 30 000 a 35 000. Sus actividades específicas son diferentes pero no hay diferencia en la naturaleza de los ácidos grasos liberados, por su acción sobre la ovolectina.



Recientemente han sido usados métodos más rápidos y apropiados para el aislamiento de ésta enzima (91)(93), que incluyen filtración sobre sephadex G-50 y cromatografía sobre DEAE celulosa.

La actividad de la fosfolipasa A ha sido medida en varios venenos (89)(93), empleando cromatografía de papel y usando a) la desaparición del substrato durante la hidrólisis de la lecitina por la enzima, b) la aparición de los ácidos grasos liberados y c) la formación de lisolecitina como índice de la actividad enzimática. (83)(89)(91)(92)(93)

Es muy posible que ésta enzima facilite la penetración de los componentes activos neurofarmacológicamente dentro de los tejidos nerviosos, pudiendo contribuir, por otro lado, a los efectos neurotóxicos del veneno.

En los últimos años se ha logrado elucidar la secuencia aminoácida de la enzima de diferentes especies de serpientes pudiéndose observar algunas similitudes entre ellas (Tabla No. 1). (91)(92)(95)

Se ha reportado la existencia y actividad de otras fosfolipasas; la fosfolipasa B en las especies *Agkistrodon piscivorus* y *Crótalus adamanteus* y fosfolipasa C en la especie *Bothrops alternatus* (96). La fosfolipasa B cataliza la hidrólisis de lisolecitina a glicerofosfocolina y ácidos grasos; la fosfolipasa C cataliza la hidrólisis de fosfatidil colina a diglicéridos y fosfocolina. Los efectos farmacológicos de estas dos enzimas no son conocidos.

IV.2.1 FOSFORILACION OXIDATIVA Y CADENA DE TRANSPORTE ELECTRONICO

Se ha reportado que la lecitinasa A obtenida de la especie *Crotalus terrificus terrificus* no afecta apreciablemente a la enzima Citocromo oxidasa y a la enzima Deshidrogenasa succínica de preparaciones mitocondriales y homogeneizados de hígado de rata; pero se ha notado una pérdida completa en la actividad de la enzima Oxidasa succínica (97). Cuando se usó el veneno de cobra previamente calentado a 100°C durante 15 minutos, la actividad de la deshidrogenasa pirúvica y Citocromo oxidasa pertenecientes a homogeneizados de cerebro y la actividad de la Deshidrogenasa succínica de homogeneizados de cerebro y corazón fueron suprimidas. Esto sugiere que el veneno calentado a esta temperatura (fosfolipasa A) actúa destruyendo la estructura de la mitocondria que es donde se realizan las funciones de las enzimas. (98)

Existe una inhibición fuerte de la enzima DPNH-citocromo c reductasa en homogeneizado de riñón de conejo con la presencia del veneno de las especies *Naja naja atra*, *Agkistrodon acutus* estos venenos de acuerdo a observaciones previas, no inactivan la enzima reductasa, citocromo oxidasa y al citocromo c; la inhibición es causada por el rompimiento del DPN por la enzima -PN-pirofosfatasa presente en los venenos.

Más tarde, se encontró que los venenos de las especies *Naja nigricollis* y *Naja haje*, pueden causar una disminución en el radio P/O; estos venenos, calentados a 98°C durante 15 minutos, retienen esta propiedad. Todos estos venenos contienen Fosfolipasa A.

El veneno de la especie *Agkistrodon piscivorus* puede desacoplar la oxidación de la fosforilación en sistemas mitocondriales aislados y preparados a partir de riñón ó hígado de rata cuando 250 g. del veneno calentado fueron usados en estos sistemas, una caída rápida en la compresión de oxígeno tuvo lugar, coincidiendo con el rompimiento de la estructura mitocondrial. Por otro lado, se observó que al añadir fosfolípidos a los sistemas mitocondriales, inhibían la acción desacoplante del veneno calentado.

Aravindakshan y colaboradores (99)(100)(101) usando preparaciones mitocondriales obtenidas de cerebro e hígado de ra

n, demostraron que el veneno de cobra calentado puede inhibir la cadena de transporte electrónico. Este veneno también afecta la fosforilación oxidativa. De los tres estados de la fosforilación oxidativa, no todos son susceptibles a la acción desacoplante del veneno. La región del DPN-citocromo c reducido y la citocromo oxidasa es más sensitiva a la acción del veneno calentado (fosfolipasa A). (100)

Por otra parte, el veneno calentado no puede inhibir directamente a las enzimas involucradas en la fosforilación oxidativa. De todos los efectos producidos por el veneno de cobra sobre el metabolismo mitocondrial, particularmente aquellos asociados con la cadena de transporte electrónico y la fosforilación oxidativa, parecen ser el resultado de la acción de la fosfolipasa A sobre la estructura de la mitocondria, específicamente sobre los fosfolípidos, los cuales constituyen una parte integral de la membrana mitocondrial.

Estos resultados, indican claramente la presencia de fosfolipasa A en el veneno de varias especies de serpientes y la habilidad para hidrolizar a la lecitina a lisolecitina, la cual destruye a los eritrocitos. Además, inhibe la respiración y la fosforilación oxidativa a través de la acción sobre la membrana mitocondrial. La muerte producida por el veneno, no puede ser creditada a la acción de la fosfolipasa A, porque no se observa pérdida de la toxicidad cuando se destruye la actividad de la enzima.

IV.3 COLINESTERASA

La presencia de ésta enzima en muchas especies de la familia Elapidae ha sido identificada. La enzima cataliza la hidrólisis de la acetilcolina a colina y ácido acético; la acetilcolina juega un papel importante en la transmisión de los impulsos nerviosos. Los venenos de la familia Crotalidae no poseen esta enzima ó está presente en pequeñas cantidades.

Se ha logrado aislar ésta enzima del veneno de cobra en un estado de pureza óptimo y es 20 veces más activa que el veneno crudo, la enzima no mostró las propiedades tóxicas del veneno.

El procedimiento para aislar a la enzima, consiste en la precipitación de la misma a partir de una solución al 2% en agua del veneno, añadiendo sulfato de sodio al 22% a PH 6.0. El precipitado que se obtiene se disuelve en agua y se precipita nuevamente con la misma concentración de sulfato. Este proceso se repite una vez más. El precipitado se disuelve en agua y se precipita con sulfato de amonio a PH 6.0. El proceso se repite tres veces cambiando la concentración del sulfato de amonio y el H. El precipitado que se obtiene se dializa con agua a 2-4°C durante 48 h. con 4 cambios de agua.

El punto isoeléctrico de la enzima purificada es 5.5 y está libre de otros constituyentes. Si es calentada a 44°C durante una hora, pierde el 50% de su actividad, la enzima es específica para los ésteres de la colina. Una inactivación parcial es causada por agentes oxidantes leves como por ejemplo: p-benzoquinona, cloruro de fenil mercurio, peróxido de hidrógeno y ferri-ianuros. La pérdida de la actividad puede ser restablecida por a cisteína, sulfuro de hidrógeno, ácido ascórbico y NaCN.

Se ha observado (102) que la velocidad de hidrólisis de los ésteres etílicos aumenta constantemente, cuando el substrato se aproxima a la estructura de la acetil colina; la máxima hidrólisis se encontró con 3.3 dimetil butil acetato. También se ha reportado (103) una hidrólisis considerable de los compuestos etil fenil acetato, glicol acetato, cortisona, desoxicortisona por la colinesterasa del veneno.

La colinesterasa del veneno de cobra es estable durante 70 días a 4-5°C, pero en una solución acuosa pierde el 50% de

actividad a ésta temperatura en 3 días y en una hora a 25°C. actividad es estabilida por iones Mg^{++} y es inhibida por el -rofosfato de tetraetilo, pudiendo ser restablecida si es guarda a 4-5°C durante 37 días. (104)

Se había supuesto que la enzima contribuía de una mane preponderante a la toxicidad del veneno por el bloqueo de los pulsos nerviosos. Pero ésta idea se desecho al observar que la actividad de la enzima era destruida completamente al calentar -veneno a 55°C durante 10 minutos y la toxicidad no sufría nin na alteración.

IV.4 L-AMINOACIDO OXIDASA

La enzima ha sido encontrada en 70 especies de serpiente, cataliza la oxidación de L- α -aminoácidos y de α -hidroxiacidos. Es la más activa de las aminoácido oxidasas que se conocen.

La enzima fué cristalizada por Wellner y Meister (104a) a partir del veneno de la especie *Crotalus adamanteus*. El método consiste en una desnaturalización selectiva por calor, filtración sobre gel de fosfato de calcio, fraccionamiento con sulfato de amonio y diálisis con agua. El método no es apropiado para aislar a la enzima de la especie *Agkistrodon piscivorus*. La enzima cristalina se homogeneizó por ultracentrifugación y contiene 3 componentes los cuales son separados por electroforesis. El peso molecular, determinado a partir de la constante de sedimentación, es de 130 000.

Esta enzima es moderadamente estable y retiene su actividad por muchas horas en soluciones diluidas a temperatura ambiente.

La actividad de la enzima puede ser medida manométricamente en frascos de Warburg, siguiendo la velocidad de oxidación de L-leucina en exceso de la enzima a P^H 8.8 en buffer fosfato - $37^{\circ}C$.

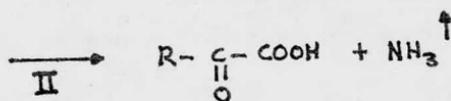
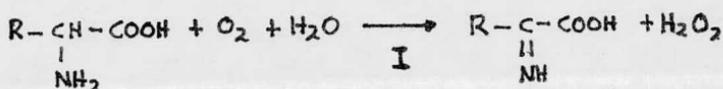
La actividad también puede ser medida de acuerdo al método de Weissbach usando sulfato de L-quinurenina como sustrato usando el incremento en la absorción a $331 m\mu$ del producto de la desaminación oxidativa (ácido quinurénico). La mezcla de reacción consiste de 0.5μ moles de quinurenina, 100μ moles de Tris(hidroximetil) amino etano como buffer, P^H 8.0, la enzima y agua a un volumen total de 1 ml. (105)

También se puede usar a la L-fenilalanina como sustrato y midiendo la disminución en la fluorescencia de la escopoletina, que es un compuesto altamente fluorescente. La disminución en la fluorescencia es observada, cuando la reacción de la enzima es acoplada con la oxidación de la escopoletina. (106)

La actividad de la enzima es inhibida por ácidos carboxílicos alifáticos y aromáticos, ácidos sulfónicos y sulfanilamidas, actuando como inhibidores competitivos (107)(108). También la actividad es inhibida por ortofosfatos, arsenatos, flavina y compuestos análogos.

Se ha reportado la presencia de riboflavina en el veneno de las serpientes (109). La L-aminooxidasa cristalina de la especie *Crótalus adamanteus* tiene 2 moles de Flavin adeninucleótido (FAD) por mol de la enzima (104). El dinucleótido se encuentra como grupo prostético. Generalmente los venenos de color amarillo debido a la presencia de riboflavina, el contenido varía de veneno a veneno y es de 120-240 μ g. por gramo de veneno seco. Por otra parte, el veneno de la especie *Crótalus durissimus* es de color blanco, no contiene riboflavina y no exhibe la actividad de L-aminooxidasa. La más alta concentración de riboflavina, ha sido encontrada en el veneno de la especie *Bothrops jararaca*. (110)

El veneno de las serpientes ha sido empleado para la liberación de α -cetoácidos a partir de los correspondientes L-aminooácidos. Una mezcla de una solución del veneno, L-aminooácido, catalasa cristalina de hígado se incubó a 37°C durante 30 minutos a pH 7.2. Se pasa una corriente constante de oxígeno a través de la mezcla; el progreso de la reacción se sigue por la liberación del aminoácido liberado en un tiempo deseado. Los α -cetoácidos se separan por cromatografía. El esquema de la reacción es el siguiente:



En ausencia de la catalasa, la descarboxilación oxidativa del α -cetoácido toma lugar por la acción del peróxido de hidrógeno liberado en la reacción, como se muestra en el paso III. En presencia de la enzima ésta reacción no se efectúa. Como en el veneno no hay catalasa presente, es necesario añadirla a la mezcla de reacción. Se sugiere que la degradación del L-aminoácido incluye una α/β deshidrogenación.

Estudiando la especificidad de substrato por la enzima, se llegó a la conclusión de que un grupo carboxilo libre, un grupo amino insustituido en la configuración L y un hidrógeno α en la molécula del substrato, son requisitos estructurales que deben tener el aminoácido para que la enzima pueda actuar. (111)(112)

La actividad enzimática es inhibida completamente si un grupo hidroxilo ó metoxi está presente en la posición β del substrato; por otro lado, la presencia de azufre o de la colina en vez del hidrógeno β , aumenta la conversión del aminoácido al cetoácido por la enzima. Un grupo carboxilo o amino adicional en la molécula del substrato también anula la habilidad para servir como substrato para la enzima. (113)

Se ha sugerido que la enzima no es un componente tóxico del veneno (113), pero que su acción está integrada en la función digestiva, activando a las enzimas proteolíticas del veneno.

IV.5 NUCLEASAS

Ha sido reportada la existencia de nucleasas en el veneno de las serpientes, con la capacidad de hidrolizar las uniones de fosfodiéster en el DNA y RNA (113a)(114)(115). Estas enzimas muestran actividad de endonucleasa y exonucleasa.

Los venenos de las serpientes son generalmente ricos en fosfodisterasa y 5'-nucleotidasa, las dos enzimas que se usan frecuentemente para el estudio de la estructura de los ácidos nucleicos. El veneno de las especies *Bothrops jararaca*, *Bothrops atrox* y *Crótalus adamanteus* es relativamente rico en fosfodiésterasa y el veneno de las especies *Agkistrodon piscivorus* y *Crótalus atrox* es relativamente pobre. (116)(117)

Entre varios venenos que fueron probados para la actividad de DNasa, se encontró la más alta actividad en la especie *Crótalus terrificus* y la mínima en la especie *Bothrops atrox*. La actividad de la enzima es mucho más alta en el veneno liofilizado que en el veneno secado a temperatura ambiente en un desecador; por ejemplo, cuando los venenos liofilizados de las especies *Vípera lebetina* y *Crótalus adamanteus* son añadidos a una solución de DNA, se observa una gran disminución en la viscosidad de la solución, que cuando son agregados los venenos a temperatura ambiente.

Varios investigadores han estudiado ampliamente la actividad de la enzima fosfodiésterasa en los venenos y han intentado purificar a la enzima de los mismos venenos, por la gran importancia que tiene en el estudio de la secuencia de los nucleótidos en el DNA y RNA.

El primer intento para purificar a la enzima del veneno de la especie *Crótalus adamanteus* fue realizado por Koerner y Ansheimer (118); el proceso incluye fraccionamiento con acetona y una desnaturalización selectiva por calor. Felix y colaboradores usaron el veneno de la especie *Bothrops atrox* para purificar la fosfodiésterasa; el procedimiento empleado consiste en la fraccionación del veneno con acetona y alcohol, seguido por una separación cromatográfica de los componentes sobre celulosa sustituida (119). El material purificado contiene cantidades apreciables de la enzima monofosfatasa alcalina, pero está libre de 5'-nucleotidasa ó contiene muy poca enzima que no puede ser detectada. En un intento por eliminar a estas enzimas, Björk (120)

tuvo la enzima del veneno de la especie *Bothrops atrox* virtualmente libre de 5'-nucleotidasa pero no de la monofosfatasa alcalina.

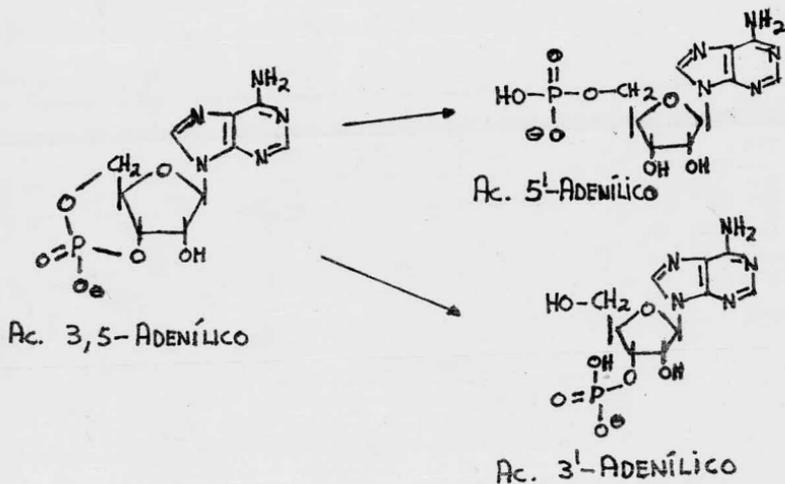
Otro método para la preparación de la enzima a partir del veneno de la especie *Vipera lebetina*, consiste en la incubación del veneno (1mg/ml.) con un volumen igual de $ZnCl_2$ (4.8 mM) a 60°C durante 10 minutos; la mezcla se guarda a 2-4°C durante 3 horas y pasado este tiempo se centrifuga. (115)

Bajo estas condiciones, más del 90% de la actividad de la fosfodiesterasa se retiene en el sobrenadante y el 90% de la actividad de la 5'-nucleotidasa se destruye. El Zn^{++} se elimina por cromatografía sobre DEAE-celulosa.

La actividad de la fosfodiesterasa puede ser destruida por calentamiento a 60°C durante 30 minutos en presencia de sulfato de amonio; solamente el 4% de la actividad de la enzima se retiene y el 65% de la actividad de la 5'-nucleotidasa se conserva. Este puede ser un método para la purificación de la 5'-nucleotidasa.

La fosfodiesterasa es activa bajo un amplio rango de pH de 5.0 a 9.0. La actividad de la DNasa del veneno de la especie *Crotalus naja* atra se destruye si se calienta a 100°C durante 10 minutos; la actividad se elimina también por la adición de benzoato de p-cloro mercurio 0.1M, glutatión 0.1M y citrato de sodio 0.01M. Por otro lado, la actividad de la enzima se aumenta por la adición de iones Mg^{++} , Mn^{++} a concentración 0.003M. (121)(122)

La fosfodiesterasa de los venenos también puede hidrolizar nucleótidos cíclicos, ataca las uniones 3' y 5' del ácido 5'-adenílico, los productos formados son el ácido 5'-adenílico y el ácido 3'-adenílico.



Los métodos para determinar la actividad de la enzima RNasa y DNasa son esencialmente los mismos descritos por Kunitz (1953).

La actividad de la DNasa en el veneno puede ser medida en diferentes intervalos, siguiendo el aumento en la densidad óptica a 260 nm de una mezcla de DNA como sustrato, buffer acetato, pH 5.0 y el veneno. Para la actividad de la RNasa, se usa como sustrato RNA. El periodo de incubación no excederá de media hora y la concentración del veneno no excederá de la relación 1:100. Se ha medido la actividad de estas enzimas en varios venenos siguiendo este método. Los resultados se resumen en la Tabla No.22.

La actividad de la enzima fosfodiesterasa se puede determinar midiendo la liberación de p-nitro fenol a 37°C por el incremento en la absorbancia a 440 mμ, usando como sustrato --calcio(p-nitrofenil) fosfato de calcio. (124)

De los resultados obtenidos con los venenos de las diferentes especies, aparentemente, la actividad de la RNasa es menor que la actividad de la DNasa. La más alta actividad de la DNasa se encontró en los venenos de las especies *Bitis gabónica*, *Naja melanoleuca* y *Crótalus adamanteus*. Los venenos de las especies *B. gabónica* y *Naja naja* exhiben la actividad más alta de RNasa.

TABLA No.22 ACTIVIDAD ENZIMATICA DE LAS ENZIMAS DNasa Y RNasa EN EL VENENO
DE DIFERENTES ESPECIES

Veneno (solución al 0.5%)	RNasa (%)	DNasa (%)
Crótalus Terrificus	8.2	20.2
Agkistrodom	4.3	18.1
Vípera Ammodytes	7.6	16.3
Bothrops Jararaca	4.0	23.8
Crótalus Adamanteus	9.99	31.7
Bitis Gabónica	18.6	34.8
Naja Melanoleuca	7.8	35.6
Naja Naja	14.0	22.3
Vípera Russellii	10.5	23.0

Tiempo de incubación: 30 minutos; temperatura 30°C, buffer tris-HCl 25 μ moles
PH 7.8, densidad óptica medida a 260 m μ en presencia de 5 μ moles de acetato de Mg.

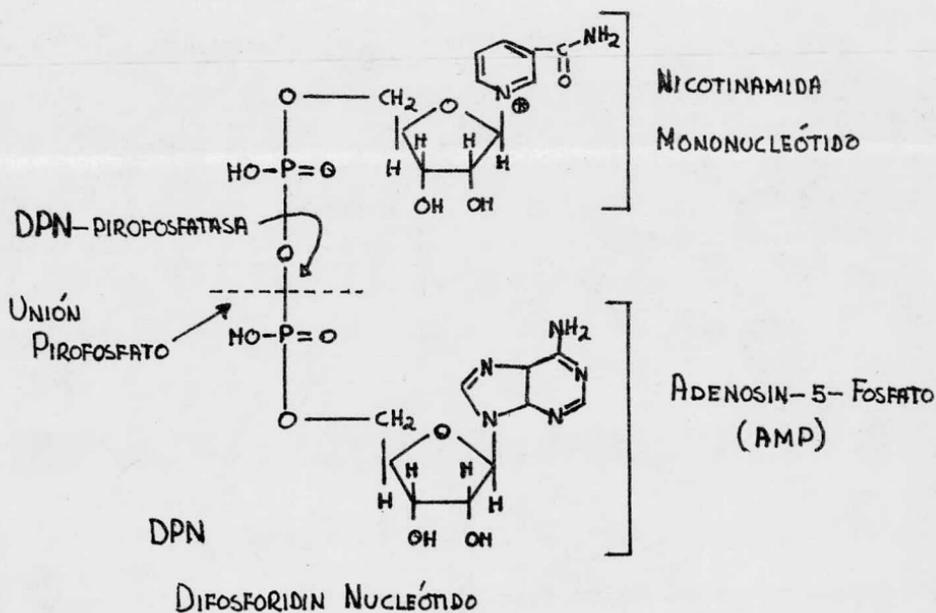
Los resultados estan expresados como el incremento en la densidad óptica (%)
con respecto a la solución de DNA o RNA usada.

IV.5.1 DPN-pirofosfatasa

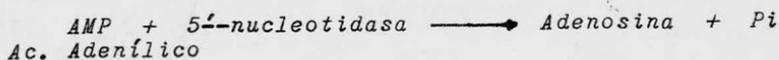
De los estudios del veneno de la serpiente Tigre, sobre el efecto que tiene sobre la actividad de un número de deshidrogenasas, tales como la deshidrogenasa láctica, deshidrogenasa álica, deshidrogenasa aminoácida; se encontró que aquellas deshidrogenasas que requerían DPN para su acción eran las más afectadas, sugiriéndose la presencia de una enzima que inhibía su acción atacando al DPN. (125)

Esta enzima se encuentra presente en el veneno de las especies *Naja naja atra*, *Vípera russelli* y *Bothrops jararaca*. El veneno de ésta última muestra una muy alta actividad. (126)

Como ésta enzima rompe la unión pirofosfato entre el ácido adénico (AMP) y la nicotinamida, se sugirió que la enzima podría ser considerada como una pirofosfatasa nucleotídica.



Cuando la enzima actúa sobre el DPN en presencia de Zn libera ácido adenílico sin la producción de ácido fosfórico. En ausencia de iones Zn^{++} se forman 2 moles de H_3PO_4 y adenosina, probablemente debido a la acción de la enzima 5'-nucleotidasa -- presente en los venenos sobre el ácido adenílico, el cual se forma por la acción de la DPN-pirofosfatasa sobre el DPN.



Puesto que todos los venenos contienen ambas enzimas -- la actividad de la DPN-pirofosfatasa puede ser determinada por la medición del fósforo inorgánico (Pi) liberado por la acción -- de la 5'-nucleotidasa sobre el AMP formado por la acción de la DPN-pirofosfatasa sobre el DPN en buffer glicina, pH 8.3 y la -- presencia de iones Mg ó Co a $37^\circ C$.

La actividad de la enzima se aumenta por la presencia de iones Mg pero se inhibe por los iones Ca y F, glutatión, cisteína y se desactiva completamente por calentamiento a $70^\circ C$ durante 30 minutos.

IV.5.2 5'-NUCLEOTIDASA

Esta enzima hidroliza el fosfato terminal del ácido adenílico y está distribuida ampliamente en la naturaleza.

Los venenos de todas las especies de serpientes exhiben esta actividad que es muy alta. Las fuentes más ricas de esta enzima, son los venenos de las especies *Agkistrodom piscivorus*, *Crótalus adamanteus*, *Crótalus horridus*, *Vípera russelli*, *Bungarus fasciatus* y *Bitis gabónica*.

La enzima es la más activa entre todas las fosfatasa, como la ATPasa, DPN-pirofosfatasa, fosfatasa alcalina no específica, etc. que se presentan en el veneno. Los venenos de las especies *Vípera russelli*, *Agkistrodom piscivorus*, *B. fasciatus* y *C. adamanteus* que contienen a la enzima fosfodiesterasa y que no pueden hidrolizar al compuesto mono fenil fosfato, hidrolizan fácilmente al ácido adenílico. (127)

La enzima puede hidrolizar 5-adenosin-5-fosfato e inosin-5-fosfato, pero no puede actuar sobre adenosin-3-fosfato, -- guanosin-3-fosfato, citosin-3-fosfato, glucosa-6-fosfato, hexosa-6-fosfato y α , β -glicerofosfatos. (113)

El pH óptimo de la enzima es 8.5-9.0. La velocidad de desfosforilación del ácido adenílico por esta enzima se incrementa por la adición de Mg^{++} , Ca^{++} , Mn^{++} , Co^{++} . Los iones Mn^{++} y Co^{++} aceleran más pronunciadamente la hidrólisis; los iones Zn^{++} y Ni^{++} actúan como inhibidores.

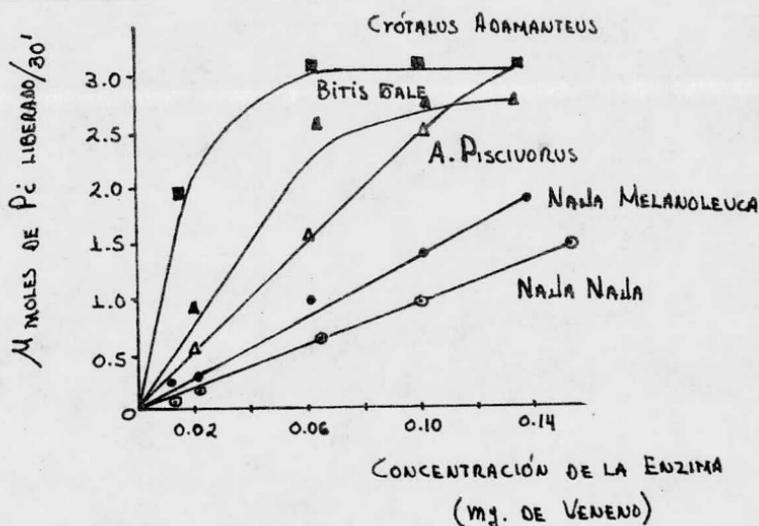
Con la presencia de EDTA y ausencia de los iones metálicos, la enzima pierde toda su actividad en 5 horas. La enzima es estable durante 8 días a 37°C en ausencia de EDTA y es más sensible al calor que las otras fosfatasas del veneno. (128)

La actividad de la 5'-nucleotidasa se puede determinar midiendo el fósforo inorgánico liberado cuando una mezcla de 0.1 ml. de buffer glicina (sal de sodio), 0.1 ml. de solución del veneno y agua hasta un volumen total de 1 ml., es incubada a 37°C durante 15 minutos.

La enzima ha sido purificada del veneno de la especie *Crotrops atrox* (129). La enzima fué precipitada con acetona al 2% como un subproducto durante la purificación de la enzima fosfolipasa del mismo veneno. El método comprende diálisis del precipitado (suspendido en buffer tris-HCl 0.1M, pH 8.0) contra agua, precipitación con sulfato de amonio al 60-70% de saturación y purificación sobre sephadex G-100 y cromatografía en una columna de DEAE-celulosa.

Se ha observado una pérdida progresiva en la actividad de la 5'-nucleotidasa, cuando la enzima se incubaba a 37°C en presencia de lecitina u homogeneizados de cerebro con venenos ricos en fosfolipasa A. La lisolecitina formada por la acción de la fosfolipasa A sobre la lecitina es responsable de la inactivación de la enzima.

Cuando se comparo la actividad de la enzima en el veneno de diferentes especies de serpientes, separadas geográficamente, se encontró una actividad muy alta de ésta enzima en el veneno de la especie *Crótalus adamanteus*, en contraste, la actividad de la enzima en el veneno de la cobra *Naja naja* es baja.



La velocidad de hidrólisis de AMP es proporcional a la concentración de la enzima en el estado inicial de la reacción, según se observa en la gráfica y disminuye rápidamente cuando aumenta la concentración de la enzima.

La actividad de la enzima se incrementa con reactivos que tengan grupos SH, tales como cisteína y glutatión reducido, pero se inhibe con pirofosfato, ortofosfato y NaF.

IV.5.3 ADENOSIN TRIFOSFATASA ADENOSIN DIFOSFATASA

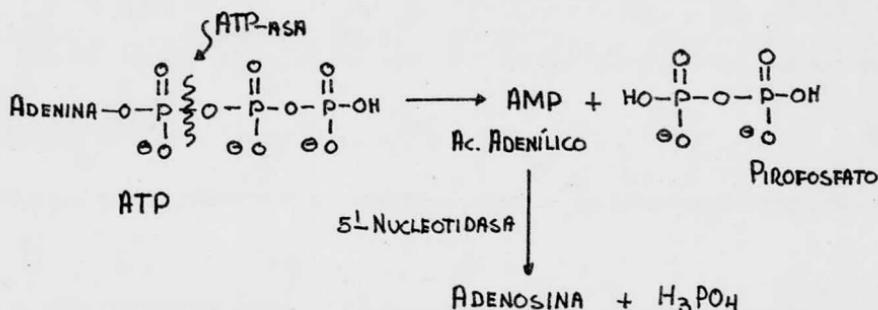
Y PIROFOSFATASA

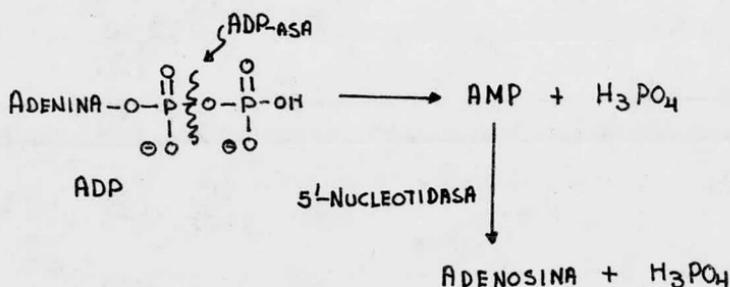
La presencia de adenosin trifosfatasa capaz de hidrolizar ATP, ha sido detectada en el veneno de las especies *Crótalus Bungarus*, *Bothrops*, *Bitis*, *Agkistrodom* y *Vípera* (130)(131). La actividad de ésta enzima frecuentemente se encuentra en la misma fracción en la que también se detecta la actividad de las enzimas 5'-nucleotidasa y DPN-pirofosfatasa, cuando el veneno se somete a electroforesis de zona.

El veneno de las serpientes también contiene una enzima que hidroliza ADP; cuando se estudio la actividad enzimática del veneno de la especie *Bitis gabónica* y otras especies, se detectó la actividad de la enzima ADPasa y ATPasa (132), sin embargo, la actividad de la ADPasa fué mas baja que la actividad de la ATPasa (133).

La aparición de un mol de ácido fosfórico por mol de ATP hidrolizado por el veneno de 21 especies de serpientes, sugiere que la enzima hidroliza ATP a ADP y H_3PO_4 ; después se observó que la hidrólisis de ATP era acompañada de adenosina, pirofosfato y ortofosfato a una concentración baja del sustrato. (131)(143)

La hidrólisis de un mol de ATP por el veneno de cobra forma un mol de adenosina, pirofosfato y ortofosfato. Primeramente el ATP se transforma a AMP y pirofosfato por la acción de la ATPasa; el AMP formado es hidrolizado a adenosina y ortofosfato por la enzima 5'-nucleotidasa presente en el veneno. Cuando el ADP actúa como sustrato, se produce un mol de adenosina y dos moles de ácido fosfórico por mol de ADP hidrolizado. El ADP se hidroliza a AMP y H_3PO_4 ; posteriormente el AMP se hidroliza a adenosina y ácido fosfórico. (133)





La actividad de la enzima ATPasa se puede medir fácilmente a partir de la cantidad de ácido fosfórico liberado, cuando una mezcla de 0.2 ml. de una solución del veneno (5.0mg/ml), 0.2 ml. de ATP (5.0 mg/ml.) y 0.4 ml. de buffer veronal 0.1M, pH 8.5, se incuba en presencia de una solución 0.001M de iones Mg⁺⁺ a 30°C durante 20 minutos. La temperatura de incubación no debe exceder de los 30°C, porque la enzima empieza a perder su actividad.

Los iones Zn⁺⁺, Hg⁺⁺ y Fe⁺⁺ actúan como inhibidores de la actividad enzimática; el pH óptimo de la enzima fluctúa entre 8.3 y 9.5 y se inactiva completamente cuando se calienta a 60°C durante 15 minutos. (113)

La enzima ATPasa no puede hidrolizar pirofosfato de tiamina, β-glicerofosfato y xrosafosfato, pero hidroliza inosina trifosfato. (131)

IV.5.4 FOSFATASAS NO ESPECIFICAS

La presencia de monoesterasa no específica capaz de hidrolizar monofenil fosfato, se libera fenol en la reacción, en el veneno de las serpientes ha sido demostrada. (116)

Sin embargo, no todos los venenos contienen esta enzima; la cual se encuentra siempre en las preparaciones para aislar a la enzima fosfodiesterasa. Sulkowski y colaboradores (128) en sus intentos para obtener a la enzima fosfodiesterasa libre de 5'-nucleotidasa y una fosfatasa no específica, lograron purificar a esta última enzima 200 veces.

La enzima purificada está libre de 5'-nucleotidasa y de fosfodiesterasa; se activa con la presencia de iones Mg ó Ca tiene un pH óptimo alrededor de 9.5. Puede hidrolizar 5'-AMP, 3',5'-d-AMP, 3'-AMP, ribosa 5-fosfato, flavin mononucleótido, 5'-fosforil ribosa, 1-pirofosfato, ATP, etc., pero no puede hidrolizar pirofosfato y uridin 2', 3'fosfato cíclico. También puede hidrolizar mononucleósidos 3', 5'difosfato.

De todo lo anterior se podrá observar que la naturaleza ha dotado a las serpientes de enzimas potentes, requeridas para hidrolizar ATP, AMP y DPN. Los productos de la hidrólisis de ATP y AMP son tóxicos, ya que bajan la presión sanguínea. La presencia de la enzima DPN-pirofosfatasa, asegura la destrucción de DPN, el cual es requerido por muchas enzimas que son importantes en las reacciones que se llevan a cabo en el Ciclo del Acido Cítrico y Glicolisis. La enzima 5'-nucleotidasa también juega un papel importante, ya que hidroliza AMP cuando la enzima ATPasa actúa sobre el ATP, de tal manera que los sistemas enzimáticos responsables de la fosforilación oxidativa no pueden usar los productos de hidrólisis para la resíntesis de ATP.

IV.6 HIALURONIDASA

Esta enzima ha sido encontrada en cada veneno que ha sido analizado. La enzima hidroliza el ácido hialurónico que se encuentra en los espacios entre las células y las fibras de los tejidos, particularmente en el tejido conectivo, reduciendo la viscosidad de estos tejidos.

La hidrólisis del ácido hialurónico trae como consecuencia la penetración de otras enzimas y componentes tóxicos en los tejidos, facilitando la actividad enzimática y toxicidad del veneno, manifestándose como inflamación y edema de la parte afectada.

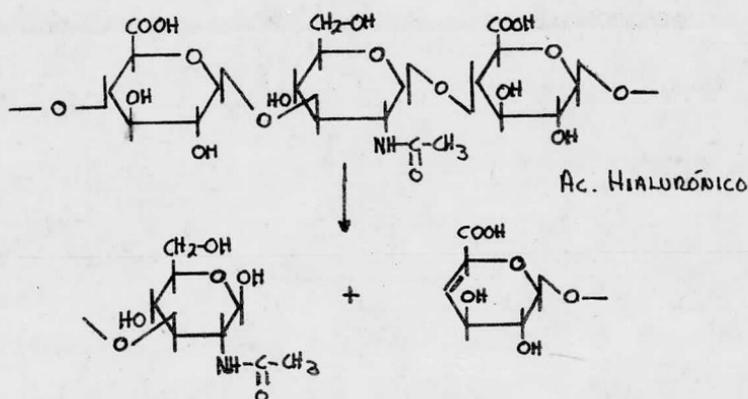
La actividad de la enzima puede ser medida mediante el método siguiente: se añaden a un tubo de ensaye 0.5 ml. de ácido hialurónico, después se añaden 0.05, 0.10, 0.15 y 0.20 ml. del veneno (19 mg. disueltos en solución salina al 0.85%) respectivamente; se añaden 3 ml. de buffer acetato de sodio-ácido acético 0.02M, pH 6.0 y se incuban los tubos a $37^{\circ}C$ durante 30 minutos, pasado este tiempo la solución se enfria y se añade un ml. de solución de ferricianuro de potasio, 1 ml. de solución de carbonato de Ca-cianuro de K y se pone a baño maría durante 15 minutos; se enfria y se añaden 5 ml. de sulfato férrico en intervalos de 30 segundos.

Posteriormente se pasa la solución de los tubos a unas cubetas para su lectura en un fotocolorímetro. El objetivo del método es medir la cantidad de glucosa liberada por la enzima. (135)

De ésta manera se midió la actividad de la enzima en varios venenos;

Veneno	
<i>Crotalus terrificus</i>	74 mg. de glucosa liberada
<i>Naja naja</i>	75 mg. por 1 mg. de ve-
<i>Agkistrodom blomhffi</i>	47 mg. neno
<i>Bothrops jararaca</i>	38 mg.
<i>Triemeresurus flavoridis</i>	57 mg.

La enzima rompe las uniones β -glucosídicas del ácido hialurónico, liberando de ésta manera a la glucosa.



Entre los inhibidores de la enzima se encuentra la heparina, la mucina gástrica y el sulfato de condroitina. La enzima no interviene en la toxicidad del veneno, pero contribuye a la introducción de los componentes tóxicos.

Con las tablas siguientes se podrá observar un panorama más amplio de la actividad enzimática y toxicidad del veneno de varias especies de serpientes pertenecientes a las familias Elapidae, Crotalidae y Viperidae.

TABLA No.23 TOXICIDAD Y ACTIVIDAD ENZIMATICA EN ALGUNAS CROTALIDAES

Veneno	Protefna (%) (biuret)	Toxicidad		Aminoácido oxidasa	Fosfo-diesterasa	Fosfo-lipasa A	Proteinasa (caseina)	Esterasa TAME
		i.p.	i.v.					
		(g/Kg)						
A.biliniatus	62	1155	800	271	82	44	53	637
A.mokeson	65	4222	2711	425	0	35	131	1450
A.piscivorus	68	4844	2044	277	47	54	87	561
A.rhodostoma	75	4977	4711	116	26	27	750	892
B.atrox asper	75	2844	1244	84	50	29	66	230
C.adamanteus	73	2222	1333	410	84	32	20	4100
C.atrox	80	4266	2666	170	31	25	328	308
C.durissus	75	667	1244	164	52	9	22	1098
C.d.terrificus	79	400	267	263	64	5	78	450
C.horridus	80	2844	1644	150	23	0.1	51	625
C.scutulatus	70	178	178	163	23	46	31	910
C.viridis helleri	71	2444	844	500	36	18	24	2567
C.viridis	75	2000	1111	272	52	26	120	1233
S.barbouri	74	6844	2800	110	2	32	83	375
T.flavoridis	87	5066	3689	56	48	42	83	56

Todas las actividades estan expresadas como unidades/mg. de veneno para su definición ver la referencia 89

Abreviaturas: A. Agkistrodom, B. Bothrops, C. Crótalus, S. Sistrurus, T. Trimeresurus.

TABLA No. 24 TOXICIDAD Y ACTIVIDAD ENZIMATICA DE ALGUNAS ELAPIDAES

Veneno	Proteína	Toxicidad		Aminoácido oxidasa	Fosfo- diesterasa	Fosfo- lipasa A	Proteínasa (caseína)	Esterasa TAME
	(%) (biuret)	i.p.	i.v.					
B.caeruleus	87	89	111	8	0	34	6	0
B.fasciatus	91	1555	1378	2	0	11	9	0
B.multicinctus	75	80	71	7	0	27	4	0
M.fulvius	90	667	378	73	18	65	0	0
N.melanoleuca	81	324	289	20	19	68	3	0
N.naja naja	80	280	244	3	19	34	2	0
N.naja kaouthia	80	329	356	14	29	20	6	0
O.hannah	76	1644	1600	6	35	21	28	36
A.mellifera	72	3333	2933	0	0	54	0	0

Todas las actividades están expresadas como unidades/mg de veneno para su definición ver la Ref. 89

Abreviaciones: B. Bungarus, M. Micrurus, N. Naja, O. Ophiophagus, A. Apis

TABLA No. 25 TOXICIDAD Y ACTIVIDAD ENZIMATICA DE ALGUNAS VIPERIDAES

Veneno	Proteína (%) (biuret)	Toxicidad		Aminoácido oxidasa	Fosfo- diesterasa	Fosfo- lipasa A	Proteinasa (caseina)	Esterasa TAME
		i.p.	i.v.					
		(g/Kg)						
B. arietans	65	933	533	52	12	13	20	80
B. gabónica	64	1955	711	100	18	21	15	240
E. carinatus	74	1600	1111	21	16	19	141	193
V. formosensis	67	489	178	68	78	52	3	65
V. russelli	70	400	133	48	59	40	0	82

Todas las actividades están expresadas como unidades/mg de veneno para su definición ver la Ref. 89

Abreviaturas: B. Bitis, E. Echis, V. Vipera
i.p. intraperitoneal
i.v. in vitro.

CAPITULO V

SUEROS

Una de las defensas que el hombre tiene para evitar el daño producido por el veneno de las serpientes, es la producción de anti-venenos ó sueros mediante esquemas de inmunización en equinos. Para ello es necesaria la obtención de venenos monoespecíficos para la producción de anticuerpos cuando se inoculan en el tejido animal.

La obtención de venenos de especies conocidas requiere un trabajo taxonómico eficiente y un serpentario bien manejado. Actualmente, se cuenta con un serpentario en el Instituto Nacional de Higiene que, aunque rico en ejemplares de algunas de las serpientes más conocidas y comunes en la República Mexicana adolece de ejemplares del género *Micrurus*.

Los venenos se obtienen por ordeña de las serpientes haciéndolas morder sobre una copa esteril y haciendo pasar el veneno por un tamiz de tela de molino. Una vez que se obtiene el veneno, se trasvasa a un tubo de centrífuga y se somete a una centrifugación de 2000 rpm durante 30 minutos para eliminar todos los detritus celulares, partículas alimenticias y microorganismos contaminantes. El líquido sobrenadante diáfano es inmediatamente congelado y liofilizado para obtener de esta manera un polvo con una proporción no mayor de 1 a 2% de humedad. Este conserva un tiempo bastante prolongado sus propiedades tóxicas. (136)

A partir del veneno liofilizado se prepara una solución madre al 1% en solución salina al 0.85% glicerinada (50% V/V) adicionada de mertiolato al 1:3000.

Se determina la actividad tóxica en ratones (DL_{50}) y nitrógeno total por el método de Kjeldahl.

Las especies de serpientes más utilizadas en el Instituto Nacional de Higiene para la obtención del veneno son: *Crótalus basiliscus basiliscus*, *Crótalus durissus culminatus* y *Bothrops atrox*. (137)

Determinación de DL_{50}

Para efectuar esta determinación se hicieron diluciones del veneno en solución salina, inyectándose 0.5 ml. de la -

solución por vía endovenosa en la vena caudal a ratones de 18 a 20g. de peso, 6 ratones por dilución, anotándose el número de -- muertos y vivos a las 24 hrs.

La valoración final (DL50) se calcula de acuerdo al método de Reed y Muench. (137b)

Obtención del Suero

El esquema de inmunización consiste de dos fases:

- a) Esquema base.
- b) Esquema de refuerzo.

a) Esquema base. La primera inoculación se hace con -- 1 mg. de veneno (peso seco) en 5 ml. de solución salina mezclados con 5 ml. de adyuvante completo de Freud. El adyuvante consiste de aceites vegetales que ayudan a retener a las toxinas -- que por su pequeño tamaño se pueden eliminar fácilmente.

Ocho días después, se inmuniza nuevamente con 1 mg. de de veneno en 5 ml. de solución salina con 5 ml. de adyuvante incompleto de Freud. A la semana siguiente se inyectan 500 mg. de veneno disueltos en solución salina en forma fraccionada, repitiéndose tres veces más con un intervalo de 48 hrs. aproximadamente.

Se realizan pruebas de sangría a partir del 20. día -- después del último inóculo, obteniéndose el plasma final y determinando precisamente el día óptimo en que el título de anticuerpo sea aceptable.

b) Esquema de refuerzo. (reinmunización). La reinmunización tiene como característica la administración de antígeno -- soluble en forma fraccionada.

La duración del esquema es de 1 semana con 1 mg. de veneno en 18 ml. fraccionado en 3 inoculaciones de 6 ml. cada 2 h.

TABLA No. 26 PRUEBAS DE PROTECCION CRUZADA

Suero anti-bassiliscus

Veneno de:	DE ₅₀ /ml.	Protección(%)
<i>C. bassiliscus</i>	128.8	100
<i>C. durissus</i>	24	20
<i>C. molossus</i>	0	0
<i>A. biliniatus</i>	0	0
<i>B. atrox</i>	0	0

Suero anti-durissus

Veneno de:	DE ₅₀ /ml.	Protección(%)
<i>C. durissus</i>	124.8	100
<i>C. bassiliscus</i>	43.8	34.3
<i>C. molossus</i>	37.2	30
<i>A. biliniatus</i>	0	0
<i>B. atrox</i>	0	0

Suero anti-agkistrodom

Veneno de:	DE ₅₀ /ml.	Protección(%)
<i>A. biliniatus</i>	167.64	100
<i>B. atrox</i>	46.28	27.5
<i>C. durissus</i>	0	0
<i>C. bassiliscus</i>	0	0
<i>C. molossus</i>	0	0

Suero anti-bothrópico

Veneno de:	DE ₅₀ /ml.	Protección(%)
<i>B. atrox</i>	699.6	100
<i>A. biliniatus</i>	0	0
<i>C. durissus</i>	0	0
<i>C. bassiliscus</i>	0	0
<i>C. molossus</i>	0	0

repetiéndose cada tercer día.

Los plasmas que se obtienen en las sangrías de cosecha se tratan de tal manera de eliminar fibrina y posteriormente son fraccionados con sulfato de amonio con el objeto de obtener las betas y gamma globulinas en solución. Estas soluciones de globulinas son empleadas como sueros purificados.

Determinación de la DE₅₀ (Sueros)

Se hacen diluciones de los sueros obtenidos en el esquema de inmunización, mezclándose volumen a volumen con un veneno de toxicidad conocida (DL₅₀), obteniéndose finalmente en la mezcla 3 DL₅₀ en 0.5 ml. Se incuba 1 hora a 37°C, inyectándose 0.5 ml. de la mezcla por vía intravenosa en la vena caudal, empleando 6 ratones por dilución de 18 a 20g. de peso. El tiempo de observación es de 24 hrs.

La valoración final DE₅₀ se efectúa por el método de Reed y Muench considerando la unidad DE₅₀ como la mínima cantidad de anticuerpo específico capaz de neutralizar 12 DL₅₀ de veneno de serpiente.

De esta manera, se pueden hacer pruebas de protección cruzada entre diferentes especies de serpientes, empleando en la primera prueba el veneno homólogo y probando en las siguientes, con veneno de cada una de las especies (Tabla No. 26).

Actualmente en el Instituto Nacional de Higiene se cuenta con 90 caballos que producen 819 litros de plasma por semana el cual se sujeta a las siguientes pruebas de control de control: esterilidad, determinación de preservativo (cresol), toxicidad, sulfatos y cloruros.

Como se podrá observar de la tabla de protección cruzada se encuentra que prácticamente no existe una protección que garantice la supervivencia de un individuo mordido por una especie de serpiente cuando ha sido protegido con suero preparado por otra especie aún del mismo género, ya que el máximo de protección cruzada encontrada en los experimentos anteriores fué de 30 a 33% con el suero antidurissus y venenos de *Crótalus bassiliscus* y *Crótalus molossus*. (137)

CAPITULO VI

CONCLUSIONES

La muerte por mordedura de serpiente sigue siendo un problema del campo mexicano, particularmente en algunos estados como Oaxaca, Veracruz, Puebla y Chiapas; esto hace resaltar la importancia de efectuar estudios sobre el veneno de las serpientes mexicanas en más centros de investigación, ya que a la fecha solo el Instituto de Biología de la UNAM y en el Instituto Nacional de Higiene dependiente de la Secretaría de Salubridad y Asistencia se estudia el problema.

De lo expuesto a lo largo del trabajo se han sacado -- las siguientes conclusiones:

1.- México es un país rico en fauna de reptiles venenosos y se considera como de los países con mayor variedad de especies de este tipo, particularmente de los géneros *Micrurus*, *Crotalus* y las especies *Bothrops atrox asper* y *Agkistrodon bilineatus* que son las que mayor número de víctimas producen cada año.

2.- Se requiere tanto, un mejor estudio de la fauna herpetológica nacional como de su prevalencia y distribución geográfica y es indispensable contar con datos epidemiológicos más exactos sobre las especies de serpientes que más frecuentemente causan accidentes mortales en nuestro país.

3.- Se han logrado aislar y purificar del veneno de -- las serpientes, principalmente de la familia *Elapidae*, más de 50 toxinas con actividad neurotóxica libres de toda actividad enzimática y se ha logrado, también, diferenciar esta actividad de -- la toxicidad.

4.- Los estudios sobre la modificación química de las neurotoxinas con reactivos específicos, revelan que los aminoácidos básicos tales como lisina y arginina son esencial y funcionalmente importantes para la actividad biológica de la proteína.

5.- Dada la similitud de la estructura primaria y la química de las toxinas de serpientes, se sugiere que el análisis estructural de una toxina puede dar bases para la consideración de la relación estructura-toxicidad para esta clase de toxinas.

6.- Para estudios comparativos de secuencias, análisis de propiedades conformacionales y determinación de sitios acti--

vos, estas neurotoxinas son muy apropiadas.

7.- El veneno de una serpiente es una rica fuente de - enzimas, la mayoría de ellas hidrolíticas, lo cual puede servir como guía para seleccionar un veneno con particular abundancia - de enzimas y toxinas para la investigación de problemas en Bio-- química o como material de partida para estudios de purificación, propiedades, actividad, etc., sobre alguna enzima específica.

8.- Para preparar un verdadero suero polivalente que - permita mayores posibilidades de protección, se requiere un gran número de estudios de protección cruzada con la mayor parte de - especies mexicanas.

9.- Debido a la complejidad del veneno y a la gran can - tidad de antígenos, es necesario hacer un fraccionamiento del -- mismo para obtener los antígenos responsables de la toxicidad y así poder preparar un suero ideal.

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Martín del Campo, R.; *Ans. Inst. Biol. Mex.* 6: 291. (1935).
- 2.- Alvarez del Toro, M.; *Los Reptiles de Chiapas*. 1a. Ed. México: (1960).
- 3.- Brown, R.B.; *Poisonous Snakes of the World*. U.S. Government Printing Office. Washington, D.C. (1965).
- 3a.- Dirección General de Estadística.
- 4.- Devi, A.; *The Protein and Nonprotein Constituents of Snake Venom*. In: *Venomous Animals and their Venoms*. Vol. I. pag. 119. (Büchrel, W., Buckley, E.E. and Deulofeu, V. Eds.) New York: Academic Press. (1968).
- 5.- Grillo, R.O., Scannone, H.R. and Parra, N.D.; *Toxicon*. 12: -- 297. (1974).
- 6.- Gornall, A., Bardavill, C.J. and David, M.M.; *J. Biol. Chem.* 177: 751. (1949).
- 7.- Fiske, C.H., and Sibbarow, Y.; *J. Biol. Chem.* 66: 375. (1952).
- 8.- Bartlet, G.R.; *J. Biol. Chem.* 234: 466. (1959).
- 9.- Karl-Kroupa, E.; *Phosphorus*. In: *Standards Methods of Chemical Analysis*, 6Th. Ed., Vol. I, p. 798. (Furman, N.H., Ed.) Princenton, N.J. : Van Nostrand. (1962).
- 10.- Zeller, E.A.; *Advances in Enzimology*, Vol. 8, p. 459. New York: Interscience. (1948).
- 11.- Zeller, E.A.; *The Enzymes*, Vol. I, p. 986. (Sumner, J.B. and Myrbäck, K., Eds.) N.Y.: Academic Press. (1951).
- 12.- Sarkar, N.K. and Devi, A.; *Enzymes in Snake Venoms*. In: *Venomous Animals and their Venoms*. Vol. I p. 167, (Büchrel, Buckley and Deulofeu, V. Eds.) N.Y.: A. Press. (1968).
- 13.- Yang, C.C., Chen, C.J. and Su, C.C.; *J. Biol. Chem.* 46: 120. (1959).

- 14.- *Ibid.* 46: 120.
- 15.- Yang, C.C., Chiu, W.C. and Kao, K.C. J.; *Biochem.* 48: 706. (1960).
- 16.- *Ibid.* 48: 714.
- 17.- Radomski, J.L. and Deichman, W.B.; *Biochem. J.* 70: 293. (1958).
- 18.- Ohsaka, A. J.; *Biochem.* 45: 259. (1958).
- 19.- Maeno, H. and Mitsuhashi, S.; *J. Biochem.* 50: 434. (1961).
- 20.- Master, R.W.P. and Rao, S.S.; *J. BIOL. CHEM.* 236: 1986. -- (1961).
- 21.- Meldrum, B.S.; *Pharmac. Rev.* 17: 393. (1965).
- 22.- Mohamed, A.H., Kamel, A. Selim, R. and Hani-Ayobe, N.; *Toxi con.* 10: 7. (1972).
- 23.- Moroz, C., Grotto, L., Goldblum, N. and de Vries, A.; In; *Animals Toxins*, p. 299, (Russel, F.E. and Saunders, P.R. + Eds.). Oxford: Pergamon Press. (1967).
- 24.- Chang, C.C. and Yang, C.C.; *J. Inmun.* 102: 1437. (1969).
- 25.- Jimenez-Porras, J.M.; *A. Rev. Pharmac.* 8: 299. (1968).
- 26.- Yang, C.C., Yanh, H.J. and Huang, J.S.; *Biochim. Biophys. Acta.* 188: 65. (1969).
- 27.- Chang, C.C. and Hayashi, K.; *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 37: 841. (1969).
- 28.- Nakai, K., Sasaki, T. and Hayashi, K.; *Biochem. Biophys. - Res. Commun.* 44: 893. (1971).
- 29.- Karlsson, E., Armberg, H., and Eaker, D.; *Eur. J. Biochem.* 21: 1. (1971).
- 30.- Yang, C.C.; *J. Biol. Chem.* 240: 1616. (1965).

- 31.- Yang, C.C., Chang, C.C., Hayashi, K. and Suzuki, T.; *Toxicon.* 7: 43. (1969).
- 32.- Karlsson, E., Eaker, D.L. and Porath, J.; *Biochim. Biophys. Acta.* 127: 505. (1966).
- 33.- Botes, D.P. and Strydom, D.J.; *J. biol. Chem.* 244: 4147. -- (1969).
- 34.- Botes, D.P., Strydom, D.J., Anderson, C.C. and Christensen, P.A.; *J. Biol. Chem.* 246: 3132. (1971).
- 35.- Slotta, K., Fraenkel-Conrat, H.; *Chem. Ber.* 74: 1076. (1938)
- 36.- Breithaup, H. and Haberman, E.; *Toxicon.* 10: 525. (1972).
- 37.- Yang, C.C., Yang, H.J. and Chiu, R.H.C.; *Biochim. Biophys. Acta.* 214: 355. (1970).
- 38.- Endo, Y., Sato, S. Ishii, S. and Tamiya, N.; *Biochem.J.* 122: 463. (1971).
- 39.- Botes, D.P.; *J. Biol. Chem.* 246: 7383. (1971).
- 40.- Karlsson, E., Eaker, D. and Ponterius, G.; *Biochim. Biophys. Acta.* 257: 235. (1972).
- 41.- Yang, C.C.; *Toxicon.* 3: 19. (1965).
- 42.- Tu, A.T., Hong, B.S. and Solie, T.N.; *Biochemistry.* 10: 1295 (1971).
- 43.- Chicheportiche, R., Rochat, C., Sampieri, F. and Lazdunski, M.; *Biochemistry.* 11: 1681. (1972).
- 44.- Wong, C.H., Chang, T.W., Lee, T.J. and Yang, C.C.; *J. Biol. Chem.* 247: 608. (1972).
- 45.- Yang, C.C., Chang, C.C., Hamaguchi, K., Ikeda, K., Hayashi, K. and Suzuki, T.; *J. Biochem.* 61: 272. (1967).

- 46.- Yang, C.C., Chang, C.C., Hayashi, K., Suzuki, T., Ikeda, K. and Hamaguchi, K.; *Biochim. Biophys. Acta.* 168: 373. (1968).
- 47.- Yang, C.C.; *Biochim. Biophys. Acta.* 133: 346. (1967).
- 48.- Chang, C.C., Yang, C.C., Nakai, K. and Hayashi, K.; *Biochim. Biophys. Acta.* 251: 334. (1971).
- 49.- Cooper, D. and Reich, E.; *J. Biol. Chem.* 247: 3008. (1972).
- 50.- Yang, C.C., Chang, C.C. and Wei, H.C.; *Biochim. Biophys. Acta.* 147: 600. (1967).
- 51.- Butler, P.J.G., Harris, J.I., Hartley, B.S. and Leberman, R. *Biochem. J.* 112: 679. (1969).
- 52.- Chang, C.C., Yang, C.C., Hamaguchi, K., Nakai, K. and Hayashi, K.; *Biochim. Biophys. Acta.* 236: 164. (1971).
- 53.- Tu, A.T. and Hong, B.S.; *J. Biol. Chem.* 246: 2772. (1971).
- 54.- Hong, B.S. and Tu, A.T.; *Fed. Proc.* 29: 888. (1970).
- 55.- Seto, A., Sato, S. and Tamiya, N.; *Biochim. Biophys. Acta.* 214: 483. (1970).
- 56.- Ramachandran, L.K., Witkop, B.; *J. Am. Chem. Soc.* 81: 4028. (1959).
- 57.- Chang, C.C., Yang, C.C., Kurobe, M., Nakai, K. and Hayashi, K.; *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 43: 429. (1971).
- 58.- Huang, J.S., Liu, S.S., Ling, K.H., Chang, C.C. and Yang, C.C.; *Toxicon.* 11: 39. (1973).
- 59.- Sato, S. and Tamiya, N.; *J. Biochem.* 68: 867. (1970).
- 60.- Chang, C.C., Chen, T.F. and Chuang, S.T.; *Br. J. Pharmac.* 47: 147. (1973).
- 61.- Miledi, R. and Potter, L.T.; *Nature, London.* 233: 599. (1971).

- 62.- Fambrough, D.M. and Hartzell, H.C.; *Science*. 176: 189. (1972).
- 63.- Barnard, E.A., Wieckowski, J. and Chiu, T.H.; *Nature*, London 234: 207. (1971).
- 64.- Aoyagi, H., Yonezawa, H., Takahashi, N., Kato, T., Izumiya, N. and Yang, C.C.; *Biochim. Biophys. Acta*. 263: 823. (1972).
- 65.- Merrifield, R.B.; *J. Am. Chem. Soc.* 85: 2149. (1963).
- 66.- Chang, C.C. and Yang, C.C.; *J. Immunol.* 102: 1437. (1969).
- 67.- Aloof-Hirsch, S., de Vries, A. and Berger, A.; *Biochim. Biophys. Acta*. 154: 53. (1968).
- 68.- Narita, K. and Lee, C.Y.; *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 41: 339. (1970).
- 69.- Larsen, P.R. and Wolff, J.; *Biochem. Pharmacol.* 17: 503. (1968).
- 70.- Larsen, P.R. and Wolff, J.; *J. Biol. Chem.* 243: 1283. (1968).
- 71.- Slotta, K.H. and Vick, J.A.; *Toxicol.* 6: 167. (1969).
- 72.- Condrea, E., de Vries, A., Mager, J.; *Biochim. Biophys. Acta* 84: 60. (1964).
- 73.- Tu, A.T.; *A. Rev. Biochem.* 42: 235. (1973).
- 74.- Janszky, B.; *Arch. Biochem.* 28: 139. (1950).
- 75.- Deutsch, H.F. and Diniz, C.R.; *J. Biol. Chem.* 216: 17. (1955).
- 76.- Sherry, S. and Troll, W.; *J. Biol. Chem.* 208: 95. (1954).
- 77.- Kunitz, M.; *J. Gen. Physiol.* 30: 291. (1947).
- 78.- Haverback, B.J., Dyce, B., Bundy, H. and Edmonson, H.A.; --
AM. J. Med. 29: 424. (1960).
- 79.- Maeno, H., Mitsuhashi, S. and Sato, R.; *Japan. J. Microbiol.*;
4: 173. (1960).
- 80.- Philpot, V.B., Jr.; *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*; 101: 78.
(1959).

- 81.- Hamberg, V. and Rocha e Silva, M.; *Arch. Intern. Pharmacodyn.* 110: 222. (1957).
- 82.- Henriques, O.B., Lavras, A.A.C., Fichman, M., Mandelbaum, -
F.R. and Henriques, S.B.; *Biochem. J.* 68: 597. (1958).
- 83.- Grillo, R.O., Scannone, H.R. and Parra, N.D.; *Toxicon.* 12:
297. (1974).
- 84.- Sarkar, N.K. and Devi, A.; *Proc. 9Th. Intern. Congr. Soc. -
Hematol. México, 1962. Vol. II, p. 315. U.N.A.M. (1964).*
- 85.- Rosenfeld, G., Nahas, L. and Kelen, E.M.A.; *Coagulant, Pro-
teolytic and Hemolytic Properties of some Snake Venoms. In:
Venomous Animals and their Venoms. Vol. I. P. 229. (Bücherl
W., Buckley, E.E. and Deulofeu, V., Eds.). N.Y.: Academic -
Press. (1968).*
- 86.- Meldrum, B.S.; *Pharmacol. Rev.* 17: 393. (1965).
- 87.- De Haas, G.H., Daemen, F.J. and Van Deemen, L.L.M.; *Biochim
Biophys. Acta.* 65: 260. (1962).
- 88.- Marinetti, G.V., Erbland, J., Temple, K. and Stotz, E.; *Bio
chem. Biophys. Acta.* 38: 524. (1960).
- 89.- Kocholaty, W.F., Ledford, E.B., Daly, J.G. and Billings, T.
A.; *Toxicon.* 9: 131. (1971).
- 90.- Saito, K. and Hanahan, D.J.; *Biochemistry.* 1: 521. (1962).
- 91.- Joubert, F.J. and Van der Walt, S.T.; *Biochim. Biophys. Ac-
ta.* 379: 317. (1975).
- 92.- Samesjima, Y., Iwanaga, S. and Suzuki, T.; *FEBS LETTERS.* 47
2. (1974).
- 93.- Ciasca Rendina, M.A. and Bovet-Nitti, F.; *J. Chromatogr.* 2:
111. (1960).

- 94.- Joubert, F.J.; *Biochim. Biophys. Acta.* 379: 329. (1975).
- 95.- *Ibid.* 379: 345.
- 96.- Doery, H.M. and Pearson, J.E.; *Biochem. J.* 78: 820. (1964).
- 97.- Nygaard, A.P. and Summer, J.B.; *J. Biol. Chem.* 200: 723. (1953).
- 98.- Braganca, B.M. and Quastel, J.H.; *Biochem. J.* 53: 88. (1953).
- 99.- Aravindakshan, I. and Braganca, B.M.; *Biochim. Biophys. Acta.* 31: 463. (1959).
- 100.- Aravindakshan, I. and Braganca, B.M.; *Biochem. J.* 79: 89 (1961).
- 101.- *Ibid.* 79: 86.
- 102.- Mounter, L.A.; *Biochem. J.* 50: 122. (1951).
- 103.- Zeller, E.A. and Utz, D.C.; *Helv. Chim. Acta.* 32: 338. -- (1949).
- 104.- Augustinsson, K.B. and Granhn, M.; *Acta. Chem. Scand.* 6:- 1477. (1952).
- 104a.- Wellner, D. and Meister, A. *J. Biol. Chem.* 235: 2013. --- (1960).
- 105.- Weissback, H., Roberston, A.V., Witkop, B. and Vdefriend, S.; *Anal. Biochem.* 1: 286. (1960).
- 106.- Lichtenberg, L.A. and Wellner, E.; *Anal. Biochem.* 26: 313. (1968).
- 107.- Zeller, E.A. and Maritz, A.; *Helv. Chim. Acta.* 27: 1888. (1964).
- 108.- Zeller, E.A. and Maritz, A.; *Helv. Chim. Acta.* 28: 365. (1945).
- 109.- Taborda, A.R. and Taborda, L.C.; *Mem. Inst. Butantan.* 15: 47. (1961).

- 110.- Villela, G.G., Mitidieri, E. and Ribeind, L.P.; Arch. Biochem. Biophys. 56: 270. (1955).
- 111.- Blashko, H. and Stivan, J.; Biochem. J. 46: 88. (1950).
- 112.- Bender, A.E. and Krebs, H.A.; Biochem. J. 46: 210 (1950).
- 113.- Zeller, E.A.; In: *The Enzymes*. (Summer, J.B. and Myrbäck, K. Eds.) Vol.I, part. II, p. 987. Academic Press. (1951).
- 113a.- Boman, H.G. and Kaletta, U.; Biochim. Biophys. Acta. 24: 619. (1957).
- 114.- Georgatos, J.G. and Laskowski, M., Sr.; Biochemistry. 1: 288. (1962).
- 115.- Nikolskaya, I.I., Shalina, N.N. and Budowski, E.I.; Biochim. Biophys. Acta. 64: 197. (1962).
- 116.- Gulland, J.M. and Jackson, E.M.; Biochem. J. 32:590. (1938).
- 117.- Richards, G.M., Du Vair, G. and Laskowski, M., Sr.; Biochemistry. 4: 501. (1965).
- 118.- Koerner, J.F. and Sinsheimer, R.L.; J. Biol. Chem. 228: - 1045. (1957).
- 119.- Felix, F., Potter, J.L. and Laskowski, M., Sr.; J. Biol. Chem. 235: 1150. (1960).
- 120.- Bjork, W.; J. Biol. Chem. 238: 2487. (1963).
- 121.- Taborda, A.R., Taborda, L.C., Williams, J.N., Jr. and Elvehjem, C.A.; J. Biol. Chem. 194: 207. (1952).
- 122.- Ibid. 194: 227.
- 123.- Kunitz, M.; J. Gen. Physiol. 33: 349. (1950).
- 124.- Koerner, J.F. and Sinsheimer, R.L.; J. Biol. Chem. 228: - - 1049. (1957).
- 125.- Chain, E.; Biochem. J. 33: 407. (1939).

- 126.- Zeller, E.A. and Epperson, D.P.; In: *The Enzymes*. (Summer, J.B. and Myrback, K. Eds.) Vol. I Part II. Academic Press. N.Y. (1951).
- 127.- Gulland, J.M. and Jackson, E.M.; *Biochem. J.* 32: 597. (1938).
- 128.- Sulkowski, E., Björk, W. and Laskowski, M.; *J. Biol. Chem.* 238: 2677. (1963).
- 129.- *Ibid.*
- 130.- Hitchings, G.H. and Fuller, H.S.; *J. Biol. Chem.* 128: xlv. (1939).
- 131.- Zeller, E.A.; *Helv. Chim. Acta.* 33: 821. (1950).
- 132.- Schenberg, A. and Lima, F.A.P.; *Acta Physiol. Latinoam.* 11: 233. (1961).
- 133.- Johnson, M., Kaye, M.A.G., Hems, R. and Krels, H.A.; *Biochem. J.* 54: 625. (1953).
- 134.- Zeller, E.A.; *Experientia.* 4: 194. (1948).
- 135.- Slotta, K. and Ballester, A.; *Mem. Inst. Butantan.* 26: 311. (1954).
- 136.- Perez de la Mora, S., Perez, M.A. y García, P.G.; *Rev. Inv. Sal. Pub. (México).* 32: 145. (1972).
- 137.- Oropeza, R.M., García, P.G. y Calderón, M.S.; *Rev. Inv. Sal. Pub. (México).* 32: 179. (1972).
- 137a.- Reed, L.J. and Muench, H.; *Am J. Hyg.* 21: 493. (1938).
- 138.- Miranda, F., Kupeyab, C., Rochat, H., Rochat, C. and Lissitzky, S.; *Eur. J. Biochem.* 17: 477. (1970).
- 139.- Botes, D.P.; *J. Biol. Chem.* 247: 2866. (1972).
- 140.- Strydom, A.J.C. and Botes, D.P.; *J. Biol. Chem.* 246: 1341 (1971).

- 141.- Strydom, D.J.; *J. Biol. Chem.* 247: 4029. (1972).
- 142.- Joubert, F.J.; *Biochim. Biophys. Acta* 317: 85. (1973).
- 143.- Mebs, D., Narita, K., Iwanaga, S., Samejima, Y. and Lee, --
C.Y.; *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 44: 711. (1971).
- 144.- Fraenkel-Conrat, H. and Singer, B.; *Archs. Biochem. Biophys*
60: 64. (1956).
- 145.- Hendon, P.A. and Fraenkel-Conrat, H.; *Proc. Natn. Acad. Sci.*
U.S.A. 68: 1560. (1971).
- 146.- *Ibid.*
- 147.- Chang, C.C. and Lee, C.Y.; *Archs. Int. Pharmacodyn. Ther.* -
144: 241. (1963).
- 148.- Karlsson, E., Eaker, D. and Ryden, L.; *Toxicon.* 10: 405. ---
(1972).
- 149.- Bonilla, C.A. and Fiero. M.K.; *J. Chromat.* 56: 253. (1971).
- 150.- Sato, S. and Tamiya, N.; *Biochem. J.* 122: 453. (1971).
- 151.- Eaker, D.L. and Porath, J.; *Jap. J. Microbiol.* 11: 353. (1967).
- 152.- Chang, C.C.; *J. Biochem. Tokyo.* 67: 343. (1970).
- 153.- Tu, A.T. and Toom, P.M.; *J. Biol. Chem.* 246: 1012. (1971).