

**UN TOQUE ANTIGUO, QUIZAS MÁS O MENOS NUEVO:
RECONSIDERANDO LOS ENVENENAMIENTOS OFIDÍCOS Y
PROTECTORES NATURALES PRESENTES EN PROTEÍNAS ENDÓGENAS
DE MAMÍFEROS Y REPTILES**

**AN OLD TOUCH, MAY BE ROUGHLY NEW: RECONSIDERING OPHIDIC
ENVENOMATIONS AND NATURAL PROTECTORS EXISTING IN ENDOGENOUS
PROTEINS FROM MAMMALS AND REPTILES**

LUIS MANUEL SALGUEIRO, ALEXIS RODRÍGUEZ-ACOSTA

*Universidad Central de Venezuela, Facultad de Medicina, Instituto Anatómico,
Laboratorio de Inmunoquímica y Ultraestructura, Caracas, Venezuela
E-mail: rodriguezacosta1946@yahoo.es*

RESUMEN

Con base en los puntos aquí tratados, podemos considerar que todos los reportes recientes, tienden a sugerir que existe más de una proteína involucrada en la inhibición de actividades hemostáticas en reptiles y principalmente en el género *Didelphis* de mamíferos. Estas proteínas pueden ejercer su capacidad neutralizante de manera aislada, como unidades con una alta especificidad por la enzima. Además, podrían sumar su capacidad inhibidora actuando separadamente, así como actuar como sub-unidades que dependan de su acoplamiento para favorecer su inhibición, existiendo como una mezcla de inhibidores específicos é inespecíficos, que actúen separadamente o mediante una combinación de algunas o todas las anteriores.

PALABRAS CLAVE: Envenenamiento ofídico, *Didelphis marsupialis*, inhibidores de metaloproteinasas, serpientes, venenos.

ABSTRACT

Based on the points discussed here, we can consider that all recent reports tend to suggest that there is more of a protein involved in inhibiting hemostatic activities in reptiles and mainly *Didelphis* gender of mammals. These proteins can exert its neutralizing ability in isolation, as units with high specificity for the enzyme. They could add their inhibitory capacity acting separately, as well as acting as sub-units under their coupling to promote its inhibition, existing as a mixture of specific inhibitors and nonspecific, acting separately or through a combination of some or all of the above.

KEY WORDS: Snake envenomation, *Didelphis marsupialis*, Metalloproteinases inhibitors, snakes, venom.

INTRODUCCIÓN

Las serpientes venenosas exhiben en sus toxinas, una de las adaptaciones animales más interesantes de la naturaleza. Los venenos han evolucionado como mezclas complejas de sustancias orgánicas e inorgánicas, que en contacto con tejidos de otros animales, producen graves alteraciones tisulares locales o sistémicas, permitiendo la inmovilización, captura y digestión de presas, además de facilitar la supervivencia y defensa ante enemigos naturales y predadores. Las manifestaciones de daño tisular local, tales como hemorragia y mionecrosis, son entre otros, uno de los efectos más dramáticos en el envenenamiento por serpientes de las familia Crotalidae y Viperidae. La severidad puede extenderse desde una leve hemorragia local, sin necrosis, en caso de los envenenamientos menos graves, hasta necrosis muscular y sangramiento en órganos distantes y el sitio de la

mordedura, en los casos más graves (Bjarnason y Fox 1994, Rengifo y Rodríguez-Acosta 2004 Nanjaraj *et al.* 2015).

La hemorragia y mionecrosis, es el resultado de la combinación de varios factores presentes en el veneno. En la hemorragia, intervienen principalmente factores enzimáticos como las toxinas hemorrágicas, generalmente metaloproteasas, y enzimas tipo-kalitreína (Bjarnason *et al.* 1987, Asega *et al.* 2014), que degradan las proteínas de la matriz extracelular y liberan kininas del kininógeno, comprometiendo la integridad estructural y funcional de la membrana basal (Baramova *et al.* 1989). Estas enzimas, en conjunto con la acción de factores secundarios que producen la incoagulabilidad de la sangre, resultan en una permeabilidad alterada de los vasos sanguíneos, especialmente de los pequeños, lo cual induce la salida de plasma y glóbulos rojos al espacio

tisular (Ownby *et al.* 1974, Bjarnason y Fox 1994, Rodríguez-Acosta *et al.* 1998). Las toxinas hemorrágicas inicialmente fueron agrupadas según su tamaño ó peso molecular, se ha propuesto clasificarlas de acuerdo a la comparación de sus secuencias, sin embargo, hasta hace pocos años, solo se contaba con la secuencia parcial de algunas de ellas, lo que limitó el uso de este criterio (Bjarnason y Fox 1987, Gasanov *et al.* 2014). Con el advenimiento de nueva información basada en la comparación de las secuencias, el uso de este criterio, se ha generalizado. Hasta el momento, tomando en cuenta su masa molecular, las hemorraginas son clasificadas en cuatro clases, a partir de los datos provenientes de toxinas de venenos de especies de serpientes: toxinas pequeñas, medianas, y hemorrágicas grandes, además toxinas de gran tamaño, no tan hemorrágicas, donde se ubican las restantes (Bjarnason y Fox 1994, Hite *et al.* 1992, 1994, Rodríguez-Acosta *et al.* 2010).

La mionecrosis al igual que la hemorragia es producto de la acción de varios tipos de toxinas (generalmente básicas), en el veneno, incluyendo estructuras con actividad fosfolipasa A₂ (PLA₂), algunas de estas toxinas, no tienen actividad catalítica sobre la membrana plasmática del músculo esquelético, ejerciendo sus efectos al inducir el influxo de calcio, lo que resulta en un daño celular irreversible (Gutiérrez *et al.* 1991, Gutiérrez y Lomonte 1995, Gasanov *et al.* 2014).

Las miotoxinas con actividad enzimática, producen dos tipos de lesiones: Una lesión, denominada lesión delta, caracterizada por pequeñas áreas de lisis de la membrana plasmática, esparcidas a lo largo de toda la fibra muscular. El carácter no difuso de esta lesión, es producto de la acción sobre fosfolípidos y proteínas específicas en la membrana. El segundo tipo de lesión se caracteriza por un apilamiento no-funcional de las miofibrillas afectadas (Johnson y Ownby 1993, Selistre de Araujo *et al.* 1996). Análisis basados en observaciones preparadas por microscopía intravital, han demostrado que las fibras musculares expuestas a la miotoxina II, responden inicialmente con contracciones cortas y fuertes, que causan profundas alteraciones en la microvasculatura local, lo que concuerda con el influxo de calcio a través de la membrana plasmática. Posteriormente, se pierden las estriaciones a nivel local y la miofibrilla se retrae en direcciones opuestas, hasta que ocurre su ruptura. Esta lesión ocurre en varios puntos de la musculatura, dejando segmentos de fibras hipercontraídas separadas por espacios sin filamentos (Lomonte *et al.* 1994).

En cuanto a la proteasas, estas actúan hidrolizando

los enlaces peptídicos que mantienen unidos a los aminoácidos en las proteínas, alterando rápidamente su estructura y función. La clasificación de las proteasas se basa en su similitud estructural más que en su especificidad por algún sustrato, esto se debe a que existen proteasas no específicas que pueden hidrolizar el enlace peptídico entre cualquier par de aminoácidos. La clasificación estructural de las proteasas, se nombran y agrupa según algún aminoácido particular, importante en la estructura de su sitio activo, dicho sitio, y es generalmente una región muy pequeña. Han sido descritos cuatro tipos de proteasas: serino, cisteino, aspartato metaloproteasas. Estas, a su vez, consisten en cinco sub-familias: (i) Termolisinas, (ii) Astacina, (iii) Serratia, (iv) Veneno de serpiente, y (v) las Matrizinas (Friederich y Tu 1971, Peichoto *et al.* 2012).

No se conoce totalmente la función biológica de los metales que componen los venenos de serpientes, se sabe que algunos de ellos como el Ca, Mg, y Mn, son importantes para la estabilización estructural, mientras que otros como el Zn, Cu, Fe, y Co participan en los mecanismos catalíticos de algunos componentes enzimáticos de los venenos, tales como las metaloproteasas (SVMPs) (Girón *et al.* 2013a,b). Las metaloproteasas de matriz o matrizinas (MMPs), al igual que las metaloproteasas del veneno de serpientes, son una familia de zinc-endopeptidasas relacionadas estructural y funcionalmente. En general, estas enzimas, son capaces de degradar *in vivo* y/o *in vitro*, toda clase de componentes proteicos de la matriz celular, entre ellos, colágeno intersticial y de membrana basal, proteoglicanos, fibronectina y laminina, ellas están implicadas entonces en varios procesos de remodelaje tisular asociados con desarrollo embrionario, gestación, crecimiento y cicatrización. El potencial catalítico de las MMPs, es reducido por inhibidores tisulares endógenos específicos de las mismas (TIMPs), e inhibidores no específicos de proteasas (Bode *et al.* 1999, Salgueiro *et al.* 2001). Ambos MMPs y TIMPs, mantienen un balance equilibrado que permite el desarrollo normal de estos procesos de remodelaje. Cuando este equilibrio se rompe, el potencial catalítico se transforma en una fuerza degenerativa, que resulta en patologías tisulares como inflamación, osteoartritis, aterosclerosis, fibrosis, crecimiento é invasión tumoral y metástasis (Birkedal-Hansen 1995).

Las metaloproteasas del veneno de serpientes (SVMPs) en su estructura y función se hayan relacionadas con las Matrizinas y la familia de proteínas ADAMS (Friederich y Tu 1971). Ellas se sintetizan en las glándulas de veneno como zimógenos, los cuales sufren modificaciones

post-traduccionales hasta su forma catalítica activa. Las SVMPs, se pueden clasificar, de acuerdo a la estructura de sus dominios en cuatro grupos básicos, desde P-I a P-IV. En los cuatro grupos, la secuencia señal, el pro-dominio y el dominio catalítico están altamente conservados, estos tres dominios constituyen la estructura básica de la clase P-I. La clase P-II, luego del dominio catalítico, tiene un dominio desintegrina o tipo-desintegrina carboxílico adicional. La clase P-III, también tiene un dominio desintegrina y un dominio rico en cisteína carboxílico adicional al dominio catalítico. La última clase, P-IV, es similar a la clase anterior pero con un dominio de unión tipo lectina. En todas las clases existe un dominio de ~169-residuos entre el pre-dominio y la secuencia catalítica. Este dominio, se relaciona con la inactivación temporal de la metaloproteasa. Existe también una secuencia espaciadora entre el extremo C-terminal de la proteasa y el dominio tipo-desintegrina, la cual, le da estabilidad estructural a toda la secuencia y ayudados por el segmento rico en cisteína, le confieren capacidad de interactuar con la estructura, para producir efectos variados, como inhibición de la agregación plaquetaria, disrupción de la matriz celular o simple adhesión celular (Jia *et al.* 1996, Sánchez *et al.* 2009).

Las MMPs se sintetizan con un péptido señal de ~20 aminoácidos y son secretadas como una pro-forma latente, que consiste en un pro-dominio N-terminal de ~80-residuos, seguido por un dominio catalítico de ~170 residuos, covalentemente unido a través de un conector rico en prolina de 10- a 70-residuos, a un dominio tipo-hemopepsina C-terminal de ~195-residuos, este último tiene una extensión de 75 a 50-residuos, que presumiblemente forma una hélice transmembranal y un pequeño dominio citoplasmático. El dominio tipo-hemopepsina, está involucrado en el reconocimiento y especificidad de las MMPs por los diferentes sustratos en la matriz tisular (Bode *et al.* 1999).

Con la caracterización de la proteína espermática PH-30, se inició el hallazgo de un grupo especial de proteínas de mamíferos que comparten una clara identidad secuencial y estructural con las metaloproteasas de veneno de serpientes (SVMPs) y las matrisinas (MMPs). Estas proteínas, se denominan ADAMS, por tener un dominio tipo-desintegrina adicional a su secuencia no catalítica, homóloga a la secuencia de las metaloproteasas. A pesar de formar parte estructural de las membranas celulares y tener estructuras análogas a las MMPs, las ADAMS, por carecer de actividad enzimática no cumplen funciones degradativas ni participan en procesos de remodelaje de la matriz tisular, pero su amplia distribución en los tejidos

animales, sugiere que esta clase de proteínas es muy importante en la biología celular. El potencial catalítico de las secuencias homólogas a las SVMPs en estas proteínas, es una materia que aun debe ser comprobada (Blobel *et al.* 1992, Jia *et al.* 1996, Kini 1996, Kini *et al.* 1997, Peichoto *et al.* 2012).

Se ha sugerido que las metaloproteasas de los venenos, son variaciones patológicas de productos celulares normales (Jia *et al.* 1996). Sin embargo, lejos de ser una desventaja, é indiferentemente de cual es la molécula primaria entre estas tres estructuras homólogas a metaloproteasas, al estudiar la relación funcional común de sus secuencias y las secuencias de sus inhibidores, podemos introducir la idea de que es posible modular la actividad biológica de cada una de estas. La formación de complejos con los TIMPs é inhibidores de SVMP ó bloqueantes de la acción de las ADAMS, es entonces un modelo atractivo para el diseño de nuevas moléculas terapéuticas (Bode *et al.* 1999, Escalante *et al.* 2000).

Inhibidores de actividad biológica de los venenos

Al referirnos al efecto de algunos inhibidores de metaloproteasas, conociendo que el efecto biológico o bioquímico de las toxinas de los venenos de serpientes, depende, en parte, de la actividad proteolítica de las toxinas, esta actividad ha sido descrita con detalle para las hemorraginas (Bjarnason y Fox 1989, 1994, Girón *et al.* 2013a,b) y las miotoxinas (Gutiérrez y Lomonte 1995). La destrucción proteolítica de las membranas basales, clásicamente ha sido prevenida ó tratada con antiveninas, las cuales, no siempre han demostrado ser totalmente efectivas para impedir el daño en el sitio de la lesión, ya sea por reacciones anafilácticas tempranas ó por el uso de antiveninas contra mezclas de toxinas diferentes (Ownby *et al.* 1986, Daudu y Theakston 1988, Gené *et al.* 1989, Carroll *et al.* 1992, Ferreira *et al.* 1992, Theakston *et al.* 1992, Borkow *et al.* 1994, 1995, Rawat *et al.* 1994).

Se ha explorado, la posibilidad de inhibir la actividad de las toxinas, al emplear inhibidores peptídicos, diseñados para interactuar específicamente con las mismas, a través de atracciones no covalentes con sus cadenas laterales. Estos inhibidores, aparte de la secuencia peptídica, están compuestos por ligandos carboxílicos, sulfidrílicos, clorometílicos, fosfonidatílicos, piroglutamatos o hidroxamatos, acoplados a los péptidos, que le confieren a estos inhibidores sintéticos la capacidad de presentar estos ligandos iónicos al núcleo catalítico, bloqueando la capacidad proteolítica de los iones de

Zn⁺⁺. El potencial inhibitorio de estos péptidos sintéticos, depende de la secuencia de péptidos escogida y el ligando acoplado (Stürzebecher *et al.* 1991, Bjarnason y Fox 1994). Basándose en el mismo principio, también se ha explorado la presencia de inhibidores endógenos en los venenos. Se han hallado tripeptidos piro-glutámicos en el veneno de *Crotalus atrox*, estos tienen la capacidad de inhibir *in situ* las hemorraginas tipo HT-e, y se cree que luego de ser inyectado el veneno, se pierde su acción inhibitoria al diseminarse los componentes del veneno en los tejidos, lo que disminuye los valores de *Ki* para la hemorragina. Bajo estas condiciones, en los tejidos afectados, los componentes del veneno se comportan con una mayor afinidad por sus moléculas blanco en la membrana plasmática de los músculos ó membrana basal de los capilares. Esto limita a la actividad inhibitoria de estos pequeños peptidos al medio glandular, lo que permite a las serpientes evitar la hidrólisis antes de inyectar su veneno en sus presas (Robeva *et al.* 1991, Francis y Kaiser 1993, Sánchez y Rodríguez-Acosta 2008).

Inhibidores endógenos naturales obtenidos de serpientes venenosas

Previamente se mencionó que los inhibidores no específicos de proteasas, en conjunto con los TIMPs, contribuyen a mantener en equilibrio al potencial degenerativo de las MMPs (Bode *et al.* 1999). Se ha investigado la utilidad de estos inhibidores endógenos de proteasas en el bloqueo de la actividad proteolítica de las toxinas de los venenos (Pifano *et al.* 1993, Rodríguez-Acosta *et al.* 1995a,b, Ramírez *et al.* 1999, Salgueiro *et al.* 2001, Pineda *et al.* 2008, Chapeaurouge *et al.* 2009, Rocha *et al.* 2009, León *et al.* 2012, Asega *et al.* 2014). Anai *et al.* (1998), investigaron la capacidad inhibitoria endógena *in vitro* del suero humano y de la rata, frente a la actividad proteolítica de una enzima hemorrágica/fibrinolítica, jararafibrasa I, purificada del veneno de *Bothrops jararaca*. Ambos sueros, y especialmente el de rata, fueron capaces de inhibir la actividad enzimática de la jararafibrasa I, y que esta actividad inhibitoria dependía de la α_1 -macroglobulina (α_1 -M) y de la murinoglobulina (MG) en el suero de la rata, y de la α_2 -macroglobulina (α_2 -M), en el suero humano. Demostraron además por electroforesis (SDS-PAGE) que estas α -macroglobulinas, formaban complejos con la toxina. Se ha planteado que la formación de estos complejos, es parte importante del mecanismo de acción de los inhibidores plasmáticos conocidos. La enzima endógena, al encontrar un enlace sensible en la secuencia peptídica del inhibidor, que conecta las globulinas, hidroliza los mismos,

produciendo un cambio conformacional, que finalmente envuelve irreversiblemente a la molécula (Heimburger 1974). Sin embargo, la capacidad inhibitoria de estas α -macroglobulinas en la prevención de los efectos hemorrágicos de las toxinas exógenas provenientes del veneno, es cuestionada para el humano. Principalmente, porque las enzimas del veneno, pueden hidrolizar varios enlaces del inhibidor endógeno, *in vivo* ó *in vitro*, lo que conduce a una inactivación enzimática del inhibidor. Esto ocurre con la antitrombina III, al ser incubada con venenos de serpientes pertenecientes a las familias Crotalidae, Viperidae y Colubridae (Kress y Catanese 1980, 1981). Existen toxinas como las Proteinerasas I y II, del veneno de *Crotalus adamanteus*, que inactivan totalmente a la α_1 -macroglobulina humana, produciendo desequilibrios en las actividades inhibitorias de enzimas importantes como la tripsina y quimotripsina. Además, la tendencia de estos inhibidores a formar complejos con las toxinas, es muy baja, y la cinética de inhibición muy lenta, lo que permite a la toxina actuar sobre sustratos de alto peso molecular, inclusive bajo la presencia de un exceso molar de α -macroglobulinas (Kamiguti *et al.* 1994).

Se conoce la resistencia de las diferentes especies de serpientes a sus venenos y al de otras especies en la misma familia. Esta resistencia característica, se debe a la presencia de inhibidores séricos específicos, siendo más eficaces y rápidos que los inhibidores séricos de la rata y los seres humanos. Noguchi, en 1909, reportó esta resistencia y especuló que la misma se debió a la falta de “sitios receptores” en los tejidos de las serpientes resistentes. Los primeros reportes al respecto, lograron demostrar que la resistencia natural era una propiedad protectora del plasma, resultado de un envenenamiento no letal previo (Kellaway 1931). Nichol *et al.* en 1933, tratando de explicar la “inmunidad” de la especie *Crotalus molossus* a su propio veneno, retaron a serpientes de diferentes tamaños a agredirse. Discuten para entonces, que las serpientes son resistentes y soportan por mayor tiempo dosis mortales de su veneno, requiriendo además mayores volúmenes de veneno que un humano o mamífero de mayor tamaño. Reportes posteriores, tomaron como indicador de resistencia, el período entre la administración de una dosis de veneno conocida y la muerte, introduciendo además el estudio del efecto de diferentes especies de serpientes y su veneno (Swanson 1946), se comprobó que la resistencia es mayor entre especies más relacionadas, y que los venenos variaban en su composición y susceptibilidad, a la inhibición de sus efectos letales. Esta idea fue reforzada por los primeros ensayos con pruebas de digestión de hemoglobina,

donde la actividad proteolítica del veneno del *Crotalus adamanteus*, fue inhibida más efectivamente que el veneno del *Agkistrodon piscivorus*, por el suero de la *Lampropeltis getulus floridana* (Deutsch y Phipot 1956). Deoras y Mhasalkar (1963), estudiaron la actividad inhibitoria de los sueros de *Vipera russelli*, cobra y *Ptyas mucosus*, antes y después de precipitarlos con 34%, 50% y 66% de sulfato de amonio, sobre el veneno de *Vipera russelli*, cobra, krait y *Echis carinatus*. La actividad antiveneno se registró como el porcentaje de mortalidad, luego de haber inyectado intraperitonealmente una mezcla de 0,25 mL de suero con la dosis letal de veneno, o como la desaparición microscópica de los glóbulos rojos de conejo al enfrentarlos a las mismas mezclas. El suero de *Vipera russelli*, cobra y krait, protegió a los ratones solo frente sus respectivos venenos, mientras que el suero de *Ptyas mucosus* protegió a los ratones del veneno de cobra, krait y *Vipera russelli*. No hubo resultados conclusivos frente al veneno de *Echis carinatus*. Las propiedades inhibitorias del suero de *Vipera russelli*, cobra y krait, se conservaron en el sobrenadante, luego de remover el precipitado. Esto sugirió que los factores antihemorrágicos plasmáticos de las serpientes estudiadas, representan un componente proteico diferente al de las inmunoglobulinas. Omori-Satoh *et al.* (1972), reforzaron esta sugerencia, al purificar un factor antihemorrágico del suero de la serpiente *Trimeresurus flavoviridis*. Este factor, inhibe la toxicidad letal y hemorrágica del principio hemorrágico HR-1, e inhibe la ruptura de la membrana basal propiciada por la hemorragina HR-2. Su caracterización le describió con un peso molecular de 70 kDa, un coeficiente de sedimentación de 4,05, un *pI* de 4,0 y una posición de migración cercana al área de la albúmina y la α -globulina. Este factor antihemorrágico, empleando ensayos de inmunodifusión, no formó precipitados con factores hemorrágicos purificados o veneno completo de *T. flavoviridis*. Straight *et al.* (1976), obtuvieron resultados similares empleando suero y veneno y hemorraginas purificadas de *Crotalus adamanteus*. Posteriormente, empleando proteínas purificadas de *T. flavoviridis*, en una columna de Sephadex G-100, la H₂-proteínasa, fue capaz de desplazar el pico de elución entre el factor antihemorrágico y la ¹²⁵I-H₂-proteínasa. Solo se obtuvo actividad inhibitoria de la proteólisis, al incubar el factor con la H₂-proteínasa de *T. flavoviridis*. La actividad proteolítica de la quimotripsina, tripsina o proteína- α de veneno de Mamushi (*Gloydius blomhoffii*), no fue inhibida, lo que revela la especificidad de especie de este factor (Omori-Satoh 1977).

Diversos estudios han reportado y descrito la

existencia de factores séricos que neutralizan los efectos del veneno de diversas especies de serpientes (Omori-Satoh *et al.* 1994, Rodríguez-Acosta *et al.* 1995a,b, Pérez y Sánchez 1999, Sánchez y Rodríguez Acosta 2008). Estos trabajos reflejan que la especificidad de la resistencia varía de una especie a otra, y que la actividad inhibitoria no está limitada a un solo daño patológico, sino que puede afectar las diversas manifestaciones de la función degradativa, tales como: hemorragia, liberación de bradikinas, coagulopatías y mionecrosis. Ovadia y Kochva (1977), evidenciaron que el suero de *Vipera palaestinae*, podía neutralizar la actividad neurotóxica y hemorrágica de su propio veneno. El factor purificado del suero, es una proteína termoestable con un peso molecular de 56 kDa, que además no precipitaba con el veneno en los ensayos de inmunodifusión. Las serpientes *Bothrops jararaca* y *Waglerophis merremii*, presentan factores que inactivan la capacidad coagulante de varios venenos, estos factores migran en conjunto con las bandas de fibrinógeno del plasma, el cual, tiene mucha más actividad inhibitoria que el suero de estas serpientes, donde están ausentes, además, tienen la capacidad de inhibir progresivamente la actividad tipo-trombina del plasma humano, sin embargo, esta actividad no fue atribuida al fibrinógeno, abriendo la posibilidad de que sea propia de una sustancia ligada a este (Nahas *et al.* 1983). El inhibidor de proteinasas en *Bothrops jararaca* fue purificado por Tanizaki *et al.* (1991), a partir de un esquema de tres pasos cromatográficos: (a) DEAE Sephacel®, en 0,05 M Tris-HCl, pH 7,5, con un gradiente molar de 0,0 a 0,4 M de NaCl, (b) fenil Sepharosa, en 0,05 M Tris- HCl, pH 7,5, con 1 M de NaCl y 1 M de (NH₄)₂SO₄, y (c) Bio Gel P₂₀₀, 0,05 M Tris HCL, pH 7,5. El pico final logró un aumento de 56 unidades, con respecto a la actividad caseinolítica inicial de la muestra, y presentó un peso molecular similar a otros inhibidores (entre 50.000 y 90.000 Da), además, demostró neutralizar la proteólisis inducida por la Botropasina y la J proteasa, ambas metaloproteasas no específicas del *Bothrops jararaca* que hidrolizan la caseína. Weissenberg *et al.* (1992), fueron más conservadores al sugerir la especialización de los inhibidores de actividad proteolítica del suero de *Crotalus atrox*, sin embargo, empleando antihemorraginas ácidas, purificadas, con un peso molecular de 65 a 80 kDa (Weissenberg *et al.* 1991), obtuvieron actividad antiproteolítica en contra del veneno completo o la hemorragina HT-e de *C. atrox*, probado ante películas de gelatina tipo-I, azocolágeno y colágeno tipo-IV, no así para la actividad degradativa de la tripsina frente a una película de gelatina. Borkow *et al.* (1995), purificaron un factor anti-hemorrágico de la serpiente *Bothrops asper* (BaSAH¹), esta proteína demostró tener

un peso molecular de 66 kDa y un *pI* de 5,2. Demostró ser más efectiva inhibiendo la actividad hemorrágica de la toxina *BaHI* de *B. asper*, que las inmunoglobulinas polivalentes de caballo, de estas últimas, se necesitaron 60 µg, mientras que de la *BaSAH*, solo se emplearon 4 µg. Al igual que los inhibidores caracterizados por otros autores, la *BaSAH*, no precipita con la *BaHI* en pruebas de inmunodifusión, pero si forma complejos solubles inactivos con la hemorragina, lo que fue indicado por el desplazamiento del pico de elución radioactivo de la ¹²⁵I-*BaSAH* al formar el complejo con el inhibidor. La resistencia natural de las serpientes, no solo está limitada a las especies venenosas, el factor antihemorrágico *NtAH*, purificado del suero de la serpiente de agua no venenosa *Natrix tessellata*, mostró una banda con un *pI* de 4,5 y un peso molecular de 880 kDa. No formó una línea de precipitación con el veneno completo o la toxina *BaHI* de *B. asper*. Las pruebas de ELISA y la cromatografía en la columna de Sephacril S-200, indicaron la formación de un complejo soluble entre este inhibidor y la toxina (Borkow *et al.* 1994).

Yamakawa y Omori-Satoh (1992), determinaron la secuencia completa de aminoácidos del factor antihemorrágico del suero de habu (*Trimeresurus flavoviridis*). Este factor, resultó ser una glicoproteína compuesta por 323 residuos aminoácidos y tres asparaginas (123, 185 y 263), unidas a cadenas de oligosacáridos. La molécula además contiene dos copias del dominio cistatina en la porción N-terminal sobre la posición 240. Estos dominios mostraron tener una homología cercana al 50% con las glicoproteínas α_2 -HS humanas (α_2 -HS), fetuina bovina y glicoproteína rica en histidina del plasma humano (HRG). El extremo C-terminal no cistatinico, presenta una secuencia única, sin homologías significantes a las proteínas antes mencionadas. El dominio cistatinico doble, diferencia estructuralmente a este, de los inhibidores naturales de metaloproteasas caracterizados y secuenciados de otros animales. Huang *et al.* (1999), purificaron un primer inhibidor ligeramente más pequeño, entre 47 y 36 kDa, en presencia o ausencia de α -mercaptoethanol. Este también resultó ser una glicoproteína, diferente a las purificadas anteriormente del suero de reptiles, con una especificidad marcada para el género *Trimeresurus*. Posteriormente, fue determinada la presencia de tres inhibidores endógenos en *Trimeresurus mucrosquamatus*, los mismos denominados pyroGlu-Asn-Trp (pENW), pyroGlu-Gln-Trp (pEQW) o pyroGlu-Lys-Trp (pEKW), fueron enfrentados a la SVMPTM-3 de la misma especie, para estudiar la disposición adoptada por ambas moléculas co-cristalizadas. La interacción del inhibidor con TM-3 causa un desplazamiento leve de

algunos residuos alrededor del sitio activo de la enzima, proporcionando un espacio a los grupos carboxílicos C-terminales del inhibidor, que se intercambian con las moléculas metálicas en dicho centro (Huang *et al.* 2002).

En líneas generales, los subsecuentes reportes de inhibidores de proteasas purificados del suero de serpientes venenosas, coinciden en que son glicoproteínas, con un peso molecular variable entre 36 y 80 kDa, y un mecanismo de acción, que a pesar de ser no inmunológico, es muy específico y estable para el tipo de toxina con la que se forman los complejos inactivantes (Sánchez y Rodríguez Acosta 2008).

Resistencia natural a los venenos reportada para animales homeotermos

En otro orden de ideas, la resistencia natural a los venenos, también ha sido reportada para animales homeotermos. Phisalix y Bertrand (1895), realizaron uno de los primeros estudios sobre esta resistencia natural en el erizo terrestre (*Erinaceus europeus*), frente al veneno de *Vipera berus*. Para entonces, solo lograron determinar que *E. europeus*, era 40 veces más resistente que el acure al veneno de *V. berus*. Posteriormente Phisalix y Bertrand (1899), reportaron que la resistencia se debía a un factor sérico, puesto que el suero de *E. europeus*, lograba proteger al acure, del mismo veneno. Esta especie, luego fue incluida por Ovadía y Kochva (1977), donde se estudió el efecto neutralizador del suero de varias especies de serpientes, dos especies de lagartos (*Uromastix aegyptius* y *Agama stellio*), y seis mamíferos (*Herpestes ichneumon*, *Felis doméstica*, *Oryctolagus cuniculus*, *Homo sapiens*, *Erinaceus europeus* y *Mesocricetus auratus*) sobre el efecto letal, en ratones, del veneno de seis serpientes (*Vipera palaestinae*, *Echis colorata*, *Pseudocerastes fieldi*, *Aspis cerastes*, *Walterinnesia aegyptia* y *Naja nigricollis*), administrado por vía intravenosa. La mayor resistencia en estas pruebas, fue observada en el erizo terrestre (*E. europeus*), el hámster (*Mesocricetus auratus*) y la mangosta (*H. ichneumon*). Particularmente, la mangosta, fue resistente a 20 LD₅₀ (dosis letal ciecueta) del veneno de *W. aegyptia* y a 10 DL₅₀ de *N. nigricollis*, sin embargo, su suero no protegió a los ratones del efecto de estos venenos, por lo que se sugirió que la resistencia natural de esta especie, se debe a factores de resistencia no humorales, para estos venenos.

Pérez *et al.* (1978a), exploraron la resistencia al veneno de *Crotalus atrox* en el suero de 40 especies de mamíferos. Empleando pruebas de precipitación en anillo, protección sérica e inhibición de actividad

hemorrágica, logró detectar resistencia en 16 de estos animales. En este mismo estudio, el suero de *Neotoma micropus*, fue capaz de neutralizar los factores hemorrágicos de varios venenos. No todos los animales que presentaron resistencia al veneno de *C. atrox* y un alto título de actividad antihemorrágica, lograron formar anillos en las pruebas de precipitación. Los factores de resistencia natural del *N. micropus*, son comparados con los de serpientes venenosas, planteando además que los diferentes inhibidores no son iguales, y que cada uno de ellos puede ser empleado como parte de una terapia anti-veneno más efectiva (Pérez *et al.* 1978b). De las especies de mamíferos inicialmente estudiadas, tres mostraron una marcada tolerancia fisiológica al veneno de *C. atrox*, estas fueron: *Sigmodon hispidus*, *Didelphis virginiana* y *Neotoma micropus*. En los ensayos de protección del suero, *D. virginiana* y *N. micropus*, se comportaron de manera similar en su capacidad protectora. Se necesitó aumentar 3,7 y 3,0 mg la DL_{50} de veneno, para poder producir 50% de mortalidad en los ratones inyectados, al ser protegidos con suero de *N. micropus* y *D. virginiana* respectivamente. Fue necesario un incremento menor de la DL_{50} para el *S. hispidus*. El título antihemorrágico (número de diluciones requeridas del extracto que logran conservar actividad antihemorrágica), de los extractos de tejidos fue mayor para el *N. micropus* (4), seguido por los títulos de *D. virginiana* (2) y de *S. hispidus* (1). El título antihemorrágico del suero fue igual para el *N. micropus* y *S. hispidus* (64), requiriendo más diluciones en el de *D. virginiana* (128). Esta última especie, desarrolló menores lesiones hemorrágicas que el resto, con dosis intradérmicas de veneno mayores. En otro experimento, la actividad antiproteolítica de estos sueros, fue evaluada, para nueve venenos de diferentes especies. Solo el suero de *D. virginiana*, inhibió la proteólisis producida por el veneno de *C. atrox*. La hidrólisis de caseína y gelatina, se mantuvo intacta para otros venenos. Debido a que la actividad proteolítica no fue neutralizada eficientemente, se consideró que los mecanismos envueltos en la actividad hemorrágica y proteolítica, son diferentes. Bjarnason y Tu (1978), reportaron cinco hemorraginas en el veneno de *C. atrox*. Si el suero de estos mamíferos inhibe total o parcialmente esta actividad, es posible pensar en: (a) la presencia de un factor inhibidor de múltiple acción sobre las diferentes hemorraginas, o de (b) la presencia de más de un factor neutralizante (Pérez *et al.* 1979, Huang y Pérez 1980, Sánchez y Rodríguez Acosta 2008).

Purificación de los factores naturales de resistencia a los venenos

A partir de los reportes de resistencia natural, no

tardan en aparecer los primeros esfuerzos dirigidos a purificar estos factores de las especies más resistentes. De Wit y Weströn (1987a,b), complementan los esfuerzos por purificar y caracterizar los inhibidores propios del *E. europeus*. Empleando un gel de Sephacryl S-200, lograron purificar y caracterizar una fracción de macroglobulinas antihemorrágicas compuesta por α_1 -macroglobulina, α_1 - α -macroglobulina y α -macroglobulina, indistinguibles de acuerdo a su actividad antihemorrágica, proteolítica e inmunolectroforéticas. El peso molecular de estas macroglobulinas varió entre 539 y 700 kDa. Esta fracción sérica, demostró ser activa en contra del veneno de *V. berus*. Empleando pruebas de inhibición de la actividad hemorrágica, se determinó la capacidad inhibitoria de los extractos musculares del *E. europeus*, frente al veneno de 17 especies de serpientes. Como era de esperar, en los músculos de estos animales, se obtuvieron buenos títulos de actividad antihemorrágica para los venenos de serpientes del género *Bitis* (de 3,5 a 18 mg) y *Vipera* (de 5,9 a 15 mg). Sorprendentemente, el veneno de *B. jararaca*, requirió de una menor cantidad (2,1 mg) de extracto para inhibir 10 dosis hemorrágicas mínimas del veneno. Los animales evaluados, se capturaron en áreas silvestres libres de serpientes. Las macroglobulinas musculares responsables de la inhibición de la hemorragia, presentaron un peso molecular de 700 kDa, igual al peso de las macroglobulinas plasmáticas, lo que refuerza la idea de una resistencia no mediada por previos contactos o inmunizaciones (Omori-Satoh *et al.* 1994).

Pichyangkul y Pérez (1981), purificaron y caracterizaron los factores antihemorrágicos en el suero del *Sigmodon hispidus*, mientras que García y Pérez (1984), purificaron y caracterizaron el factor antihemorrágico del *N. micropus*. El factor antihemorrágico de *Sigmodon hispidus*, conservó una estabilidad a un pH de 3-10, con un pI de 5,4 y un peso molecular de 90 kDa, el factor purificado superó 20 veces la capacidad neutralizadora del suero completo, sin precipitar con el veneno de *C. atrox*. Por su parte, el factor antihemorrágico de *N. micropus*, demostró tener un pI de 4,1, un peso molecular de 54 kDa, fallando también en la formación de líneas de precipitado con el veneno de *C. atrox*. Estos resultados sugirieron que en cada una de estas especies, había un único factor, y que este se asemejaba a las α -globulinas. Huang y Pérez (1982), señalaron ultraestructuralmente, que la inhibición producida por los factores presentes en el *N. micropus*, se extiende a los daños mionecróticos producidos por el veneno de *C. atrox*. Mientras que en ratones, las fibras del bíceps femoral inyectado se observan necróticas y hemorrágicas, las observaciones ultraestructurales de las fibras musculares del *N.*

micropus solo revelan engrosamiento de las mitocondrias y figuras mieloides ocasionales. Para producir el mismo daño ultraestructural, la dosis de veneno inyectada al *N. micropus*, debió ser mayor, sin embargo los animales sobrevivieron a la acción letal del veneno. Omori-Satoh *et al.* (1998), compararon la actividad antihemorrágica en los extractos músculo esquelético de varios mamíferos. Los extractos del *E. Europeus* (0,50 mg), *Crociodura russula* (2,05 mg) y *Talpa europaea* (2,95 mg), requirieron menor cantidad que el conejo (negativo), ratón (18,5 mg) o hámster (18,0 mg), para neutralizar 2,5 dosis hemorrágicas mínimas del veneno de *B. jararaca* en la piel de ratones.

La purificación de estos factores a partir del suero de los diferentes mamíferos, sugiere que la resistencia natural se debe a factores humorales. Sin embargo, Ovadia y Kochva (1977), hallaron que el suero de *Herpestes ichneumon* no presentaba factores de protección contra el veneno de las serpientes *Walterinnesia aegyptia* y *Naja nigricollis*, a pesar de su notable resistencia a estos venenos. Tomihara *et al.* (1987), finalmente purificaron tres factores humorales de resistencia natural contra los principios hemorrágicos del veneno de *Trimeresurus flavoviridis*, en otra especie de mangosta, *Herpestes edwardsii*, lo que sugiere que este género, también presenta un mecanismo humoral de protección. Los factores denominados AHF-1, AHF-2 y AHF-3, presentaron un peso molecular de 65 kDa, siendo estables en un rango de pH de 2,0 a 11,0. La posibilidad de que estos factores fueran α -globulinas, fue descartada al no formar líneas de precipitación con el veneno o los factores hemorrágicos HR I y HR 2, purificados del mismo.

Debido a que estos factores no son α -globulinas, se ha planteado que la resistencia natural es un carácter transmitido genéticamente y no un mecanismo de inmunidad activa. Poran *et al.* (1987), propusieron la idea de que las defensas desarrolladas por la especie *Spermophilus beecheyi*, era producto de una larga asociación entre el *S. Beecheyi* y su predador el *Crotalus viridis oreganus*. Demostraron amplias variaciones intraespecíficas e interespecie en los niveles de resistencia natural reflejados por las diferencias en las DL_{50} , y criterios como mortalidad, necrosis y tiempo de cicatrización, al ser comparados con diferentes poblaciones del *S. beecheyi*, la especie susceptible *S. parryi*. Martínez *et al.* (1999), lograron purificar un factor antihemorrágico y antiproteolítico en otra especie de ardilla, *Spermophilus mexicanus*, luego de haber purificado el factor usando un protocolo de cinco pasos, obtuvieron un incremento de 607 unidades en la actividad específica de un factor

27 veces más puro con respecto a la actividad específica del suero completo. Este factor fue muy similar a los otros factores inhibitorios humorales descritos desde las primeras experiencias de De Wit y Weströn (1987a,b).

Inhibidores de actividad proteolítica en el género *Didelphis*

En cuanto a los inhibidores de actividad proteolítica en el género *Didelphis*, este agrupa a diversas especies de mamíferos ampliamente distribuidas en el continente americano. Las especies del género distribuidas en Venezuela, son el *Didelphis marsupialis* y *Didelphis albiventris* (Pérez-Hernández *et al.* 1994), esta última, se encuentra repartida en los estados andinos y zonas selváticas del amazonas, a diferencia del *D. marsupialis*, que es un habitante perenne de toda la geografía venezolana. El *D. marsupialis* junto con su homólogo de *D. virginiana*, distribuido en Centro y Norteamérica (Schmidly 1983), son animales que por su utilidad han sido empleados en investigaciones biomédicas. Destacando su uso como modelos experimentales en gastroenterología, neuroplasticidad, regulación epitelial, estudios de enzimología celular, regulación hormonal de receptores y biología básica de los procesos de comportamiento (Jurgelsky y Porter 1974, Cohn 1989).

El primer reporte conocido acerca de la resistencia natural de la familia Didelphidae, fue realizado por Vellard (1945), en este y posteriores reportes (Vellard 1949, 1950), se plantea que: “la única hipótesis posible para explicar la resistencia de los *Didelphis* a los venenos, es una inmunidad progresiva desarrollada en animales carnívoros de vida nocturna, que deben tener con frecuencia ocasión de encontrar las serpientes venenosas, matándolas para alimentarse”. Además, sugirió que: “esta inmunidad era adquirida y constantemente reforzada pudiéndose transmitir por herencia”. Este reporte comprendió tres especies de *Didelphis* en el estudio: (a) *D. marsupialis*, (b) *D. aurita*, y (c) *D. azarae*. No distinguió los resultados individuales para cada especie. Los *Didelphis* estudiados, resistieron la letalidad y acción patógena de la inyección intramuscular de veneno, y su suero, neutralizó los venenos de *C. terrificus*, *B. neuwiedii* y *B. jararaca*, no así el veneno de *Naja tripudians* (familia Elapidae), de composición diferente. Los glóbulos rojos del *Didelphis*, resultaron ser sensibles a la acción de cualquier veneno. No se ha determinado la DL_{50} para alguna de las especies del género, debido al número de animales y la cantidad de veneno requerida, sin embargo (Pérez *et al.* 1979), reportaron que 1,121 mg/kg de veneno de *C. atrox*,

causó hemorragia masiva y la muerte en *Didelphis virginiana*. Se reportó que se requerían dosis de por lo menos 10 mg, de veneno de *C. terrificus*, para producir una caída acentuada de la presión, bradipnea o aumento de la amplitud respiratoria en didelfidos suramericanos (Vellard 1945). Kilmon (1976), reconstituyó veneno de *Agkistrodon p. piscivorus*, inyectándolo intravenoso a dosis de 15 mg/kg del *D. virginiana*, esta dosis, correspondiente a más de 5 dosis letales para perros de 15 kg, no tuvo efectos letales en estos animales, que recuperaron los valores hemodinámicos normales a los 10 minutos de administrado el veneno. No fue reportado edema, equimosis o necrosis notable en estos animales. Werner y Vick (1977), empleando las DL_{50} conocidas para mamíferos susceptibles, determinaron que *D. virginiana*, es resistente al veneno del *Crotalus adamanteus*, *C. atrox*, *Agkistrodon c. contortrix*, *A. piscivorus*, *A. h. brevicaudata* y *A. bilineatus*, de la familia Crotalidae. Pero si es susceptible al veneno del *Bitis arietans* de la familia Viperidae, *Naja naja*, *N. naja atra*, *N. nivea* y *Micrurus fulvius* de la familia Elapidae, y *Laticaudata semifasciata* de la familia Hydrophidae. Estos resultados concluyeron en la proposición de *D. virginiana* como un modelo animal para el estudio de la resistencia a los venenos, y coincidieron con la idea original de Vellard (1945), de que la resistencia humoral natural podía ser debida a “inmunizaciones naturales”.

Werner y Faiht (1978), continuaron explorando la naturaleza de los factores de resistencia. Con este objetivo, determinaron que el veneno de *Agkistrodon piscivorus*, *A. contortrix*, *C. atrox* y *C. adamanteus*, reducía su efecto letal al ir aumentando las concentraciones de suero de *D. virginiana*, *in vitro*. Estos resultados no fueron conclusivos. Menchaca y Pérez (1981), lograron purificar un factor antihemorrágico del suero de *D. virginiana*, este, migró como una banda rápida y homogénea, empleando electroforesis en geles de poliacrilamida, tuvo un punto isoeléctrico de 4,1 y un peso molecular de 68 kDa, además, no produjo la proteólisis de la gelatina ni precipitó con el veneno crudo de *C. atrox*. Con respecto al suero completo, al purificar, se logró un incremento de 204,8 unidades, en la actividad específica con una pureza 6,4 veces mayor. Este proceso fue mejorado, al emplear estas proteínas para producir anticuerpos monoclonales secretados por células de fusión entre mielomas Sp2/0 y células del bazo de ratón. Estos anticuerpos fueron acoplados a una columna de 4B Sepharosa. Con este método de purificación, y con respecto al suero completo, se logró un incremento de 150,5 unidades, en la actividad específica con una pureza 16,8 veces mayor. Además, al analizar la fracción antihemorrágica producto del proceso

de cromatografía de afinidad, se obtuvieron dos bandas, una pesada de 65 kDa y pI de 4,8, y dos bandas finas de 57 kDa y pI de 4,1 (Tarng *et al.* 1986).

Perales *et al.* (1989), empleando la electroforesis en celulosa acetato y PAGE convencional como criterios de pureza, obtuvieron del *D. marsupialis* dos fracciones heterogéneas protectoras del efecto letal del veneno de *B. jararaca*, las denominaron AGP (glicoproteína ácida) y CM-III. Ambas tuvieron propiedades ácidas y migraron en la región de las α -globulinas en la electroforesis de celulosa acetato. Las fracciones contenían carbohidratos en su estructura y su peso molecular se ubicó entre 42 y 58 kDa.

Inicialmente (Werner y Vick 1977, Werner y Faith 1978), desconociendo los mecanismos de resistencia natural del *D. virginiana*, se plantearon el valor de la especie, como una herramienta en la búsqueda experimental de un tratamiento más efectivo para las víctimas de accidentes ofídicos. No fue hasta después de los primeros intentos de purificación y caracterización, que se iniciaron estudios sustentados, en cifras experimentalmente aceptables, sobre la utilidad de los factores séricos del *Didelphis* sp. y otros mamíferos como tratamiento. Soto *et al.* (1988), estudiaron la actividad antihemorrágica y la inhibición de la proteólisis, en el suero de *D. marsupialis* y *N. micropus*. Emplearon venenos de 25 especies de serpientes de la familia Crotalidae. Ambas especies de mamíferos neutralizaron la actividad hemorrágica. Todos los venenos mostraron actividad hemolítica y proteolítica variada, en presencia del suero, al emplear sustratos inespecíficos. Esta variación en la proteólisis de los diferentes venenos, no pudo explicarse por causas filogenéticas o adaptativas de las serpientes. Melo *et al.* (1988), reportaron que el veneno de *B. jararacussu* incubado con heparina o los componentes ácidos purificados del suero de *D. marsupialis*, no fue capaz de producir un aumento en los niveles de enzimas sarcoplásmicas liberadas, especialmente en la Creatininkinasa (CK) producida. Sugirió entonces, que este efecto inhibitor se debía a la capacidad de formación de complejos, entre los inhibidores o el polianión heparina, con las miotoxinas básicas no catalíticas (Sánchez y Rodríguez Acosta 2008). Reportes similares han demostrado que en la especie *D. marsupialis*, también existe un complejo antibothrópico (ABC), que es un inhibidor de las metaloproteasas del veneno, con propiedades anti-edematogénicas (Perales *et al.* 1994), y antihemorrágicas, por lo menos seis veces más efectivas que las antiveninas convencionales (Neves-Ferreira *et al.* 1997). Pifano *et al.* (1993), también reportan la

propiedad neutralizante del suero de *D. marsupialis*, frente a la actividad hemorrágica y proteolítica del veneno de *B. lanceolatus* (DL_{50} de 0,5 mg/ratón), luego de usar el sobrenadante, libre de α -globulinas, resultante de precipitar el suero completo con sulfato de amonio y demostraron que los efectos del veneno de *B. lanceolatus* son inactivados por una fracción, denominada F-0.1, proveniente del pasaje del suero de *D. marsupialis* por una columna de DEAE-celulosa, con un buffer PBS 0,01 M, y un gradiente de 0,1 M de NaCl, dicha fracción, conservó las características anti-hemorrágicas y anti-proteolíticas. Solo protegen las muestras de suero con más de 20 mg de proteína. Se difiere con la idea planteada de que, el mecanismo envuelto en la neutralización de la actividad hemorrágica y proteolítica, en los venenos involucre mecanismos diferentes. Rodríguez-Acosta *et al.* (1995a), empleando SDS-PAGE para re-fraccionar a F-0.1. Usaron un gel de acrilamida (5-10%), libre de β -mercaptoethanol. Todas las bandas obtenidas fueron extraídas por electroelución. Apareció entonces, una banda única con un peso molecular de 97 kDa, que neutralizaba la actividad hemorrágica del veneno de *B. lanceolatus*, esta proteína, tuvo un peso molecular considerablemente mayor a las purificadas anteriormente en *D. marsupialis*, pero parecidas a las descritas en suero de *B. jararaca* (Tanizaki *et al.* 1991).

Los factores inhibitorios del *D. marsupialis aurita*, fueron explorados antigénicamente para ver su relación con los factores antihemorrágicos de las serpientes (AHF). Para ello, se emplearon anticuerpos anti-glicoproteínas purificadas del suero de *Didelphis*, y anticuerpos anti-AHF. Empleando pruebas de ELISA, los títulos de anticuerpos fueron determinados empleando como antígenos los sueros completos del marsupial, y cuatro especies de serpientes venenosas (*B. jararaca*, *B. alternatus*, *C. d. terrificus* y *W. merremii*). No se encontró alguna similitud antigénica entre los factores protectores de las serpientes y sus homólogos en *D. marsupialis aurita* (Moura-da-Silva y Tanizaki 1989). Las propiedades antigénicas de los inhibidores de metaloproteasas, han sido aprovechadas posteriormente. Sánchez *et al.* (1998), reportaron que los inhibidores de metaloproteasas unidos a una antihemorragina específica, pueden ser detectados con anticuerpos monoclonales anti-inhibidores en un análisis Western Blot de cinco pasos. Se desarrolló un anticuerpo monoclonal anti-inhibidor (DV-2LD#2), que se une específicamente a la anti-hemorragina de *D. virginiana*, previamente incubada con veneno. Se sugirió la especificidad del anticuerpo, porque la capacidad inhibitoria de la anti-hemorragina es neutralizada por el DV-2LD#2. El DV-

2LD#2, no reaccionaba ni inhibía las anti-hemorraginas del *N. micropus*. De esta manera, se pueden detectar fracciones hemorrágicas parcialmente purificadas, sin tener que depender de la vida y costos de animales experimentales.

Catanese y Kress (1992), purificaron cromatográficamente un inhibidor de metaloproteasas del *D. virginiana*, al cual, denominaron oprin (opossum proteinase inhibitor). Empleando un esquema seriado de cromatografías con DEAE-Sepharose, fenil-Sepharose y una columna Mono Q HR 5/5, purificaron una glicoproteína inhibidora de las metaloproteasas del veneno de *C. atrox*. El oprin, no inhibió las serino proteasas del veneno o metaloproteasas bacterianas. Presentó un peso molecular estimado de 52 kDa y un pI de 3,5. Empleando la columna Mono Q HR 5/5, y un incremento en el gradiente de NaCl de 0,3 M a 1,0 M, lograron separar y diferenciar los picos del complejo oprin- α -proteasas de estos componentes separados. El perfil electroforético demostró la aparición de un pico, correspondiente al complejo unido y otro pico correspondiente al oprin añadido, en un exceso molar de 2:1. En el mismo trabajo, se secuenciaron previamente dos secuencias internas de aminoácidos, a partir de estos, se determinó la secuencia de nucleótidos, que luego fue empleada para sondear inmunológicamente una genoteca de ADNc de *D. virginiana*. Se obtuvo una secuencia de 211 aminoácidos que no mostró homologías con los inhibidores de proteasas conocidos. Sin embargo, este inhibidor tuvo una homología general de 36%, y de 46% (26 residuos), en su extremo N-terminal, con la glicoproteína del plasma humano $\alpha 1\beta$ -glicoproteína ($\alpha 1\beta$ -G), de función desconocida, con la cual comparte cuatro dominios.

Catanese y Kress (1993), siguiendo un esquema de purificación de precipitación del suero con sulfato de amonio, seguido de cromatografía en DEAE-Sepharose y fenil-Sepharose, purificaron posteriormente un nuevo inhibidor, al cual, nuevamente secuenciaron parcialmente y sondearon inmunológicamente en una genoteca de ADNc de *D. virginiana*. El resultado demostró una proteína madura de 389-residuos, que denominaron $\alpha 1$ -PI, que al contrario de $\alpha 1\beta$ -G, demostró tener homologías de 51 a 58% con inhibidores de proteasas del tipo $\alpha 1$ -PI, en mamíferos. A pesar de su similitud, $\alpha 1$ -PI del *D. virginiana*, conserva su actividad anti-metaloproteasas de venenos, bajo condiciones inoperantes para la $\alpha 1$ -PI humana. Estos reportes, dieron fuerza a la hipótesis de que el mecanismo de resistencia natural en ciertos animales, se debe a más de un inhibidor proteico

similar a las macroglobulinas, que pueden unirse a las metaloproteasas neutralizando su capacidad hemorrágica y degenerativa.

Los primeros hallazgos reportados, en general, conducían a la existencia de una sola proteína de gran tamaño. Curiosamente los hallazgos de Rodríguez-Acosta *et al.* (1995b), sobre una banda única relativamente densa con un peso molecular de 97 kDa, correspondían a casi el doble del tamaño reportado por otros autores. Es importante notar, que esta banda fue extraída por electroelución, luego de haberla separado en SDS-PAGE bajo condiciones no reductoras. Es bastante probable que el factor inhibidor, pueda ser una estructura dimérica, que migró inalterada y completa en el gel libre de β -mercaptoetanol. Perales *et al.* (1994), habían sugerido la naturaleza dimérica de los inhibidores séricos en marsupiales, al cromatografiar una fracción anti-bohrópica (ABF) de 84 kDa, a partir del suero completo de *D. marsupialis*, *Philander opossum*, *Lutreolina crassicaudata* y *Metachirus nudicaudatus*, empleando DEAE-sefacel, en acetato de sodio 0,01 M, pH 3,7. Las ABF, fueron las últimas registradas en el patrón cromatográfico, comportándose como formas ácidas. La fracción correspondiente al *M. nudicaudatus*, fue la única que no mostró ser anti-bohrópica. La ABF, fue filtrada en una columna de TSK G-3000, empleando un buffer fosfato a pH 7,0, 0,1 M. Se recromatografió esta fracción en SDS-PAGE, 12,6%, apareciendo dos bandas, correspondientes a dos subunidades de 48.000 y 43.000 Da, repartidas a lo largo de la fracción ABF. Las unidades de 48 kDa, en las diferentes especies, de las dos, fueron las únicas con homologías secuenciales en su extremo N-terminal, y requerían de la unidad menor, de 43 kDa, para ser funcionales. Ninguna presentó homologías con cualquier otra proteína conocida. Lovo-Farah *et al.* (1996), también aislaron una proteína de 43 kDa con propiedades anti-bohrópicas. Esta proteína (DA2-II) separada de una fracción inicial (DA2), era homóloga en su extremo N-terminal con las proteínas de 48 kDa descritas previamente por Perales *et al.* (1994), para *D. marsupialis*, *P. opossum* y *L. crassicaudata*.

Neves-Ferreira *et al.* (2000), purificaron dos proteínas antihemorrágicas, a partir del suero de *D. marsupialis*. El mismo, fue inicialmente sometido a DEAE-Sephacel, seguido de fenil-Sepharose y Superdex 200. El resultado final fueron dos proteínas: (a) DM40, de 40318 AMU, y (b) DM43, de 43010 AMU, con dos isoformas. Por SDS-PAGE, sus pesos moleculares resultaron ser 44,8 y 47,3 kDa para DM40 y DM43 respectivamente.

Ambos tuvieron *pI* menores a 3,5 y porcentajes de glicosilación variables entre 20,5 y 29,0%. Sus extremos N-terminales, fueron casi idénticos, u homólogos a los oprin presentes en el suero de *D. virginiana*. Por medio de PAGE y filtración cromatográfica no se pudo demostrar la evidencia de que DM40 y DM43 formaran complejos de algún tipo. Ambos tuvieron actividad antihemorrágica y antiproteolítica en contra del veneno de *B. jararaca*. Recientemente, Neves-Ferreira *et al.* (2002), analizaron estructural y funcionalmente al inhibidor DM43. El mismo, demostró ser homólogo a la α 1B-glicoproteína humana, una proteína plasmática de función, hasta el momento, desconocida y que forma parte de los transcritos de la superfamilia de los genes de inmunoglobulinas. Se determinó experimentalmente que el inhibidor es un homodímero formado por dos unidades de DM43, cada una de las cuales tiene tres dominios tipo-inmunoglobulina. Aparte de su capacidad antihemorrágica, este homodímero fue capaz de inhibir la capacidad fibrinogenolítica de la jararagina y la botrolisina, formando un complejo estequiométrico 1:1 con ambas metaloproteasas. Estos autores, también sugirieron en su reporte que el dominio metaloproteasa es importante para la interacción inhibitoria del homodímero de DM43, lo que concuerda con los datos cristalográficos reportados para los inhibidores endógenos de la metaloproteasa de *Trimeresurus mucrosquamatus* (Huang *et al.* 2002).

La posibilidad de que la inhibición natural de la toxicidad de los diferentes componentes del veneno descansa sobre una molécula, ha sido despistada inicialmente para el *D. virginiana* (Catanese y Kress 1992, 1993), y posteriormente para el *D. marsupialis*, con el reporte de la existencia de las proteínas DM40 (Neves-Ferreira *et al.* 2000) y más recientemente DM64 (Rocha *et al.* 2002). Esta última fue clonada y reportada fisicoquímica y biológicamente como un inhibidor ácido específico de la miotoxicidad, con un 15% de glicosilación y una masa molecular de 63,659 Da. Esta proteína homóloga a DM43 y la α 1B-glicoproteína humana, resultó ser un inhibidor específico para la acción miotóxica y citotóxica de las miotoxina I (mt-I/Asp49) y miotoxina II (mt-II/Lys49) del veneno de *B. asper*, siendo incapaz de neutralizar la acción anticoagulante y letalidad intracerebroventricular, dependientes actividad catalítica de la mt-I (disociada de su actividad toxica), o la acción hemorrágica y fibrinogenolítica de la jararagina o botrolisina. El hecho que la proteína DM43, no tenga actividad antimiotóxica reportada y que además no forme complejos con jararagina C, sin

dominio metaloproteasa (Neves-Ferreira *et al.* 2002), refuerza la idea de que en general los inhibidores naturales del género *Didelphis* son muy específicos, y que dicha especificidad ha resultado de una co-evolución funcional con las variadas toxinas presentes en los venenos (Menez 1998, Valentin y Lambeau 2000, Sánchez y Rodríguez Acosta 2008).

Consideraciones finales

Con base en los puntos antes tratados, podemos considerar ciertos aspectos importantes. Todos los reportes recientes, tienden a sugerir que existe más de una proteína involucrada en la inhibición de la actividad hemorrágica en el género *Didelphis*. Una de las interrogantes más atractivas sobre el tema, se relaciona con la creciente divergencia en cuanto al número de proteínas inhibitoras caracterizadas. Las variadas proteínas pueden entonces: (a) Ejercer su capacidad neutralizante de manera aislada, como unidades con una alta especificidad por la “enzima blanco”, (b) sumar su capacidad inhibitora actuando separadamente, (c) actuar como sub-unidades que dependan de su acoplamiento para favorecer su inhibición, (d) existir como una mezcla de inhibidores específicos e inespecíficos, que actúen separadamente, o (e) una combinación de algunas o todas las anteriores.

Al contrario de su estructura y mecanismo de acción, el aspecto donde hay más coincidencia, es el atribuirle a los inhibidores un carácter ácido, con un *pI*, cercano a 4. Es factible que el comportamiento ácido de los inhibidores, se complemente con el carácter básico de las toxinas, de esta manera se ve favorecida la probabilidad de acercamiento entre sus formas activas (Gutiérrez y Lomonte 1995).

El suero sanguíneo de cualquier animal, es uno de los fluidos más heterogéneos conocidos. Centrándose en los aspectos básicos del comportamiento bioquímico de las proteínas y en el bajo punto isoelectrico de los inhibidores, podemos elaborar esquemas racionales de purificación, que nos conduzcan a las formas moleculares involucradas. La existencia de múltiples factores, motiva a idear estrategias que faciliten la obtención cualitativa y cuantitativa de la fracción antiveneno, facilitando la purificación y caracterización definitiva de sus componentes.

Los inhibidores séricos de metaloproteasas, tanto en reptiles, como en mamíferos, han sido obtenidos

convencionalmente por procesos lentos, con bajo rendimiento cuantitativo, que involucran la muerte o eventual sacrificio del animal (Jurgilas *et al.* 1999, Neves-Ferreira *et al.* 1999), es por ello que quisimos proponer su obtención, utilizando otras metodologías de producción (Salgueiro *et al.* 2001).

El hígado es un órgano de fragmentación y síntesis de agentes xenobióticos y numerosas moléculas orgánicas (Ganong 2010). Se ha comprobado la capacidad de síntesis celular que poseen los hepatocitos en marsupiales, los cuales, poseen un aparato de expresión molecular elaborado, desarrollado para responder a las necesidades de antihemorráginas y diversas moléculas orgánicas (Catanese y Kress 1992, 1993). Las técnicas de cultivo primario de esferoides hepáticos de mamíferos, caracterizan al mismo como un modelo bien diferenciado de estudio *in vitro*, donde coexisten células con una gran capacidad metabólica y de reordenamiento citoarquitectónico (Seglen 1976, Landry *et al.* 1985, Li *et al.* 1992, Tong *et al.* 1992). Los planteamientos anteriores, nos condujeron, a la proposición de un estrategia de purificación y posterior caracterización, basada en la hipótesis de que es posible obtener las diferentes antihemorráginas (inhibidores de metaloproteasas), del sobrenadante de cultivos primarios de esferoides hepáticos de *D. marsupialis*, a partir de la cual, se puedan purificar y caracterizar estas moléculas, de una fuente menos heterogénea de proteínas (Salgueiro *et al.* 2001).

La purificación de especies moleculares responsables de la inhibición natural, avanzó inicialmente con el estudio de la actividad antihemorrágica (Pérez y Sánchez 1999). Sin embargo, los últimos reportes y la generación de ensayos con técnicas más específicas e innovadoras, tienden a demostrar que se puede discernir entre las diferentes propiedades antitóxicas, y que nos podemos aventurar en la idea de que la inhibición responsable de la resistencia natural se atribuye, en el caso del género *Didelphis*, a moléculas diferentes con diferentes grados de homología.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANAI K, SUGIKI M, YOSHIDA E, MARUYAMA M. 1998. Inhibition of a snake venom hemorrhagic metalloproteinase by human and rat a-macroglobulin. *Toxicon*. 36(8):1127-1139.
- ASEGA AF, OLIVEIRA AK, MENEZES MC, NEVES-FERREIRA

- AG, SERRANO SM. 2014. Interaction of *Bothrops jararaca* venom metalloproteinases with protein inhibitors. *Toxicon*. 80:1-8.
- BARAMOVA EN, SHANNON JD, BJARNASON JB, FOX JW. 1989. Degradation of extracellular matrix proteins by hemorrhagic metalloproteinases. *Arch. Biochem. Biophys.* 275(1):63-71.
- BIRKEDAL-HANSEN H. 1995. Proteolytic remodeling of extracellular matrix. *Curr. Opin. Cell Biol.* 7(5):728-735.
- BJARNASON JB, FOX JC. 1987. Characterization of two hemorrhagic zinc proteinases, toxin c and toxin d, from eastern diamondback rattlesnake (*Crotalus atrox*) venom. *Biochim. Biophys. Acta*. 911(3):356-363.
- BJARNASON JB, FOX JW. 1989. Hemorrhagic toxins from snake venoms. *J. Toxicol-Toxin Reviews*. 7(2):121-209.
- BJARNASON JB, FOX JW. 1994. Hemorrhagic metalloproteinases from snake venoms. *Pharmacol. Ther.* 62(3):325-372.
- BJARNASON JB, TU AT. 1978. Hemorrhagic toxins from western diamondback rattlesnake (*Crotalus atrox*) venom: Isolation and characterization of five toxins and the role of zinc in hemorrhagic toxin e. *Biochemistry*. 17(16):3395-3404.
- BLOBEL CP, WOLFSBERG TG, TURK CW, MYLES DG, PRIMAKOFF P, WHITE JM. 1992. Agential fusion peptide and an integrin ligand domain in a protein active in sperm-egg fusion. *Nature*. 356(6366):248-252.
- BODE W, FERNANDEZ-CATALAN C, TSCHESCHE H, GRAMS F, NAGASE H, MASKOS K. 1999. Structural properties of matrix metalloproteinase. *Cell. Mol. Life Sci.* 55(4):639-652.
- BORKOW G, GUTIÉRREZ JM, OVADIA M. 1994. A potent antihemorrhagin in the serum of the non-poisonous water snake *Natrix tessellata*: Isolation, characterization and mechanism of neutralization. *Biochim. Biophys. Acta*. 1201(3):482-490.
- BORKOW G, GUTIÉRREZ JM, OVADIA M. 1995. Isolation, characterization and mode of neutralization of a potent antihemorrhagic factor from the serum of the snake *Bothrops asper*. *Biochim. Biophys. Acta*. 1245(2):232-238.
- CARROLL SB, THALLEY BS, THEAKSTON RGD, LAING G. 1992. Comparison of the purity and efficacy of affinity purified avian antivenoms with commercial equine crotalids antivenoms. *Toxicon*. 30(9):1017-1025.
- CATANESE JJ, KRESS LF. 1992. Isolation from opossum serum of a metalloproteinase inhibitor homologous to human α_1 B-glycoprotein. *Biochemistry*. 31(2):410-418.
- CATANESE JJ, KRESS LF. 1993. Opossum serum α_1 -proteinase inhibitor: Purification, linear sequence, and resistance to inactivation by rattlesnake venom metalloproteinases. *Biochemistry*. 32(2):509-515.
- CHAPEAUROUGE A, MARTINS SM, HOLUB O, ROCHA SL, VALENTE RH, NEVES-FERREIRA AG, FERREIRA ST, DOMONT GB, PERALES J. 2009. Conformational plasticity of DM43, a metalloproteinase inhibitor from *Didelphis marsupialis*: chemical and pressure-induced equilibrium (un)folding studies. *Biochim. Biophys. Acta*. 1794(10):1379-1386.
- COHN JP. 1989. Beyond the lab rat, What biomedicine is learning from unconventional organism. *BioScience*. 39(8):518-522.
- DAUDU I, THEAKSTON RDG. 1987. Preliminary trial of a new polyspecific antivenom in Nigeria. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 82(3):311-313.
- DEUTSCH HF, PHIPOT VB. 1956. Inhibition and activation of venoms proteases. *Biochim. Biophys. Acta*. 21(3):524-530.
- DE WIT CA, WESTRÖN BR. 1987a. Venom resistance in the Hedgehog, *Erinaceus europaeus*: Purification and identification of macroglobulin inhibitors as plasma antihemorrhagic factors. *Toxicon*. 25(3):315-323.
- DE WIT CA, WESTRÖN BR. 1987b. Purification and characterization of Alpha2-, Alpha2-beta- and Beta-macroglobulin inhibitors in the hedgehog, *Erinaceus europaeus*: Beta-macroglobuling

- identified as the plasma antihemorrhagic factor. *Toxicon*. 25(11):1209-1219.
- DEORAS PJ, MHASALKAR VB. 1963. Antivenom activity of some snake sera. *Toxicon*. 1(2):89-90.
- ESCALANTE T, FRANCESCHI A, RUCAVADO A, GUTIÉRREZ JM. 2000. Effectiveness of Batismastat, a synthetic inhibitor of matrix metalloproteinase, in neutralizing local tissue damage induced by Bap1, a hemorrhagic metalloproteinase from the venom of the snake *Bothrops asper*. *Biochem. Pharmacol.* 60(2):269-274.
- FERREIRA ML, MOURA-DA-SILVA AM, MOTA I. 1992. Neutralization of different activities of venoms from nine species of *Bothrops* snakes by *Bothrops jararaca* antivenom. *Toxicon*. 30(12):1591-1602.
- FRANCIS B, KAISER II. 1993. Inhibition of metalloproteinases in *Bothrops asper* venom by endogenous peptides. *Toxicon*. 31(7):889-899.
- FRIEDERICH C, TU AT. 1971. Role of metals in snake venoms for hemorrhagic, esterase and mediates binding of laminin to collagen IV. *EMBO J*. 10:3137-3146.
- GANONG WF. 2010. Fisiología Médica. 21ª ed., Manual Moderno. México D.F, México, pp. 720.
- GARCIA VE, PÉREZ JC. 1984. The purification and characterization of an antihemorrhagic factor in woodrat (*Neotoma micropus*) serum. *Toxicon*. 22(1):129-138.
- GASANOV SE, DAGDA RK, RAEL ED. 2014. Snake venom cytotoxins, Phospholipase A_{2s}, and Zn²⁺-dependent metalloproteinases: mechanisms of action and pharmacological relevance. *J. Clin. Toxicol.* 4(1):1000181.
- GENÉ JA, ROY A, ROJAS G, GUTIÉRREZ JM, CERDAS L. 1989. Comparative study on coagulant, defibrinating, fibrinolytic and fibrinogenolytic activities of Costa Rican Crotalinae snake venoms and their neutralization by a polyvalent antivenom. *Toxicon*. 27(8):841-848.
- GIRÓN ME, RODRÍGUEZ-ACOSTA A, SALAZAR AM, SÁNCHEZ EE, GALÁN J, IBARRA C, GUERRERO B. 2013a. Isolation and characterization of two new non-hemorrhagic metalloproteinases with fibrinogenolytic activity from the mapanare (*Bothrops colombiensis*) venom. *Arch. Toxicol.* 87(1):197-208.
- GIRÓN ME, GUERRERO B, SALAZAR AM, SÁNCHEZ EE, ALVAREZ M, RODRÍGUEZ-ACOSTA A. 2013b. Functional characterization of fibrinolytic metalloproteinases (colombienases) isolated from *Bothrops colombiensis* venom. *Toxicon*. 74:116-126.
- GUTIÉRREZ JM, LOMONTE B. 1995. Phospholipase A2 myotoxins from *Bothrops* snake venoms. *Toxicon*. 33(1):1405-1424.
- GUTIÉRREZ JM, NUÑEZ J, DÍAZ C, CINTRA AOC, HOMSI-BRANDEBURGO MI, GIGLIO JR. 1991. Skeletal muscle degeneration and regeneration after injection of Bothropstoxin II, phospholipase A2 isolated from the venom of the snake *Bothrops jararacussu*. *Exp. Molec. Path.* 55(3):217-229.
- HEIMBURGER N. 1974. Biochemistry of proteinase inhibitors from human plasma: a review of recent development. Bayer-Symposium V "Proteinase Inhibitors", pp. 14-22.
- HITE LA, FOX JW, BJARMASON JB. 1992. A new family of proteinases is defined by several snake venom metalloproteinases. *Biol. Chem. Hoppe-Seyler*. 373(7):381-385.
- HITE LA, JIA LG, BJARMASON JB, FOX JW. 1994. cDNA sequence for four snake venom metalloproteinases: Structure, classification, and their relationship to mammalian reproductive proteins. *Arch. Biochem. Biophys.* 308(1):182-191.
- HUANG SY, PÉREZ JC. 1980. Comparative study on hemorrhagic and proteolytic activities of snake venoms. *Toxicon*. 18(4):421-426.
- HUANG SY, PÉREZ JC. 1982. A comparative electron microscopic study of myonecrosis induced by *Crotalus atrox* (western diamondback rattlesnake) in gray woodrats and mice. *Toxicon*. 20(2):443-449.
- HUANG KF, CHOW LP, CHIOU SH. 1999. Isolation

- and characterization of a novel proteinase inhibitor from the snake serum of Taiwan habu (*Trimeresurus mucrosquamatus*). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 263(3):610-616.
- HUANG KF, CHIOU SH, KO TP, WANG AHJ. 2002. Determinants of the inhibition of a Taiwan habu venom metalloproteinase by its endogenous inhibitors revealed by X-ray crystallography and synthetic inhibitor analogues. *Eur. J. Biochem.* 269(12):3047-3056.
- JIA LG, SHIMOKAWA KI, BJARNASON JB, FOX JW. 1996. Snake venom metalloproteinases: structure, functions and relationship to the ADAMS family of proteins. *Toxicon.* 34(11-12):1269-1276.
- JOHNSON EK, OWNBY CL. 1993. Isolation of a myotoxin from the venom of *Agkistrodon contortrix laticinctus* (broad-banded copperhead) and pathogenesis of myonecrosis induced by it in mice. *Toxicon.* 31(3):243-255.
- JURGELSKY JR W, PORTER ME. 1974. The Opossum (*Didelphis virginiana* Kerr) as a biomedical model. III. Breeding the opossum in captivity: Methods. *Lab. Anim. Sci.* 24(2):412-425.
- JURGILAS PB, NEVES FERREIRA AGC, DOMONT GB, MOUSSATCHÉ H, PERALES J. 1999. Detection of an antithrombotic fraction in opossum (*Didelphis marsupialis*) milk that neutralizes Bothrops jararaca venom. *Toxicon.* 37(1):167-172.
- KAMIGUTI AS, DESMOND HP, THEAKSTON RDG, HAY CRM, ZUZEL M. 1994. Ineffectiveness of the inhibition of the main haemorrhagic metalloproteinase from Bothrops jararaca venom by its only plasma inhibitor, alpha2-macroglobulin. *Biochim. Biophys. Acta.* 1200(3):307-314.
- KELLAWAY CH. 1931. The immunity of Australian snakes to their own venoms. *Med. J. Aus.* 2:35-52.
- KILMON SR JA. 1976. High tolerance to snake venom by the *Virginia opossum*, *Didelphis virginiana*. *Toxicon.* 14(4):337-340.
- KINI RM. 1996. Are C-type lectin-related proteins derived by proteolysis of metalloproteinase/disintegrin precursor proteins? *Toxicon.* 34(11/12):1287-1294.
- KINI RM, ZHANG CY, TAN BK. 1997. Pharmacological activity of the interdomain segment between metalloproteinase and disintegrin domains. *Toxicon.* 35(4):529-535.
- KRESS LF, CATANESE J. 1980. Enzymatic inactivation of human antithrombin III limited proteolysis of the inhibitor by snake venom proteinases in the presence of heparin. *Biochim. Biophys. Acta.* 615(1):178-186.
- KRESS LF, CATANESE JL. 1981. Effects of human plasma a2 macroglobulin on the proteolytic activity of snake venoms. *Toxicon.* 19(4):501-507.
- LANDRY J, BERNIER D, OULLET C, GOYETTE R, MARCEAU N. 1985. Spheroidal aggregate culture of rat liver cells: Histotypic reorganization, biomatrix deposition, and maintenance of functional activities. *J. Cell Biol.* 101(3):914-923.
- LEÓN IR, NEVES-FERREIRA AG, DA ROCHA SL, TRUGILHO MR, PERALES J, VALENTE RH. 2012. Using mass spectrometry to explore the neglected glycan moieties of the antiophidic proteins DM43 and DM64. *Proteomics.* 12(17):2753-2765.
- LI AP, COLBURN SM, BECK DJ. 1992. A simplified method for the culturing of primary adult rat and human hepatocytes as multicellular spheroids. *In Vitro Cell. Dev. Biol.* 28A(9-10):673-677.
- LOMONTE B, LUNDGREN J, JOHANSSON B, BAGGE U. 1994. The dynamics of local tissue damage induced by Bothrops asper snake venom and myotoxin II on the mouse cremaster muscle: An intravital and electron microscopic study. *Toxicon.* 32(1):41-55.
- LOVO-FARAH MF, ONE M, NOVELLO JC, TOYAMA MH, PERALES J, MOUSSATCHÉ H, DOMONT GB, OLIVEIRA B, MARANGONI S. 1996. Isolation of protein factors from opossum (*Didelphis albiventris*) serum which protect against Bothrops jararaca venom. *Toxicon.* 34(9):1067-1071.
- MARTÍNEZ RR, PÉREZ JC, SÁNCHEZ EE, CAMPOS R. 1999. The antihemorrhagic factor of the Mexican ground squirrel, (*Spermophilus mexicanus*). *Toxicon.* 37(6):949-954.

- Melo PA, Suarez-Kurtz G. 1988. Release of sarcoplasmic enzymes from skeletal muscle by *Bothrops jararacussu* venom: Antagonism by heparin and by the serum of South American marsupialis. *Toxicon*. 26(1):87-95.
- MENCHACA JM, PÉREZ JC. 1981 The purification and characterization of an antihemorrhagic factor in opossum (*Didelphis virginiana*) serum. *Toxicon*. 19(5):623-632.
- MENEZ A. 1998. Functional architectures of animal toxins: a clue to drug design? *Toxicon*. 36(11):1557-1572.
- MOURA-DA-SILVA AM, TANIZAKI MM. 1989. Antigenic relationship among antihemorrhagic factors from snake and opossum plasmas. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 22(6):717-719.
- NAHAS L, KAMIGUTI AS, SOUSA E SILVA MCC, RIBEIRO DE BARROS MAA, MORENA P. 1983. The inactivating effect of *Bothrops jararaca* and *Walerophis merremii* snake plasma on the coagulant activity of various snake venoms. *Toxicon*. 21(2):239-246.
- NANJARAJ URS AN, YARISWAMY M, RAMAKRISHNAN C, JOSHI V, SUVILESH KN, SAVITHA MN, VELMURUGAN D, VISHWANATH BS. 2015. Inhibitory potential of three zinc chelating agents against the proteolytic, hemorrhagic, and myotoxic activities of *Echis carinatus* venom. *Toxicon*. 93:68-78.
- NEVES-FERREIRA AGC, PERALES J, OVADIA M, MOUSSATCHE H, DOMONT GB. 1997. Inhibitory properties of the antithrotop complex from the South American opossum (*Didelphis marsupialis*) serum. *Toxicon*. 35(6):849-863.
- NEVES-FERREIRA AGC, VALENTE RH, SA PG, ROCHA SLG, MOUSSATCHE H, DOMONT GB, PERALES J. 1999. New methodology for the obtainment of antithrotop factors from the South American opossum (*Didelphis marsupialis*) and jararaca snake (*Bothrops jararaca*). *Toxicon*. 37(10):1417-1429.
- NEVES-FERREIRA AGC, CARDINALE N, ROCHA SLG, PERALES J, DOMONT GB. 2000. Isolation and characterization of DM40 and DM43, two snake venom metalloproteinase inhibitors from *Didelphis marsupialis* serum. *Biochim. Biophys. Acta*. 1474(3):309-320.
- NEVES-FERREIRA AGC, PERALES J, FOX JW, SHANNON JD, MAKINO DL, GARRATT R, DOMONT GB. 2002. Structural and functional analyses of DM43, a snake venom metalloproteinase inhibitor from *Didelphis marsupialis* serum. *J. Biol. Chem.* 277(15):13129-13137.
- NICHOL AA, DOUGLAS V, PECK L. 1933. On the immunity of rattlesnakes to their venom. *Copeia*. 4:211-213.
- NOGUCHI H. 1909. Natural immunity of certain animals from snake venom. In: *Snake venoms*. Carnegie Institute, Washington, DC, UDA, pp. 268.
- OMORI-SATOH T. 1977. Antihemorrhagic factor as a proteinase inhibitor isolated from the serum of *Trimeresurus flavoviridis*. *Biochim. Biophys. Acta*. 495(1):93-98.
- OMORI-SATOH T, SADAHIRO S, OHSAKA A, MURATA R. 1972. Purification and characterization of an antihemorrhagic factor in the serum of *Trimeresurus flavoviridis*, a crotalid. *Biochim. Biophys. Acta*. 285(2):414-426.
- OMORI-SATOH T, NAGAOKA Y, YAMAKAWA Y, MEBS D. 1994. Inhibition of hemorrhagic activities of various snake venoms by purified antihemorrhagic factor obtained from Japanese habu snake. *Toxicon*. 32(3):365-368.
- OMORI-SATOH T, TAKAHASHI M, NAGAOKA Y, MEBS D. 1998. Comparison of antihemorrhagic activities in skeletal muscle extracts from various animals against *Bothrops jararaca* snake venom. *Toxicon*. 36(2):421-423.
- OVADIA M, KOCHVA E. 1977. Neutralization of Viperidae and Elapidae snake venoms by sera of different animals. *Toxicon*. 15(6):541-547.
- OWNBY CL, KAINER RA, TU AT. 1974. Pathogenesis of hemorrhagic induced by rattlesnake venom. *Am. J. Pathol.* 76:401-408.
- OWNBY CL, COLBERG TR, ODELL GV. 1986. Short

- communications in vivo ability of antimyotoxin a serum plus polyvalent (Crotalidae) antivenom to neutralize prairie rattlesnake (*Crotalus viridis viridis*) venom. *Toxicon*. 24(2):197-200.
- PEICHOTO ME, TAVARES FL, SANTORO ML, MACKESSY SP. 2012. Venom proteomes of South and North American opisthoglyphous (Colubridae and Dipsadidae) snake species: a preliminary approach to understanding their biological roles. *Comp. Biochem. Physiol. Part D. Genomics. Proteomics*. 7(4):361-369.
- PERALES J, MUNOZ R, GRATEROL S, OVIEDO O, MOUSSATCHE H. 1989. New findings on the purification and characterization of an anti-bothropic factor from *Didelphis marsupialis* (opossum) serum. *Braz. J. Med. Biol. Res*. 22(1):25-28.
- PERALES J, MOUSSATCHE H, MARANGONI S, OLIVEIRA B, DOMONT GB. 1994. Isolation and partial characterization of an anti-Bothropic complex from the serum of South American Didelphidae. *Toxicon*. 32(10):1237-1249.
- PÉREZ JC, SÁNCHEZ EE. 1999. Natural protease inhibitors to hemorrhagins in snake venoms and their potential use in medicine. *Toxicon*. 37(5):703-728.
- PÉREZ JC, HAWS WC, GARCIA VE, JENNINGS BM. 1978a. Resistance of warm-blooded animals to snake venoms. *Toxicon*. 16(4):375-383.
- PÉREZ JC, HAWS WC, HATCH CH. 1978b. Resistance of woodrats (*Neotoma micropus*) to *Crotalus atrox* venom. *Toxicon*. 16(2):198-200.
- PÉREZ JC, PICHYANGKUL S, GARCIA VE. 1979. The resistance of three species of warm-blooded animals to western diamondback rattlesnake (*Crotalus atrox*) venom. *Toxicon*. 17(6):601-607.
- PÉREZ-HERNÁNDEZ R, SORIANO P, LEW D. 1994. Marsupiales de Venezuela. Cuadernos Lagoven, Caracas, Venezuela, pp. 76.
- PHISALIX C, BERTRAND G. 1895. Recherches sur l'immunité du herisson contre le venin de vipere. *C. R. Soc. Biol*. 10:639-641.
- PHISALIX C, BERTRAND G. 1899. Sur l'immunité du hérisson contre le venin de vipère. *C. R. Séanc. Soc. Biol*. 51:77.
- PICHYANGKUL S, PÉREZ JC. 1981. Purification and characterization of naturally occurring antihemorrhagic factor in the serum of the hispid cotton rat (*Sigmodon hispidus*). *Toxicon*. 19(2):205-215.
- PIFANO F, AGUILAR I, GIRÓN ME, GAMBOA N, RODRÍGUEZ-ACOSTA A. 1993. Natural resistance of opossum (*Didelphis marsupialis*) to the mapanare (*Bothrops lanceolatus*) snake venom. *Roum. Arch. Microbiol. Immunol*. 52(2):131-136.
- PINEDA ME, GIRÓN ME., ESTRELLA A, SÁNCHEZ EE, AGUILAR I, FERNÁNDEZ I, VARGAS AM, SCANNONE H, RODRÍGUEZ-ACOSTA A. 2008. Inhibition of the hemorrhagic and proteolytic activities of Lansberg's hognose pit viper (*Porthidium lansbergii hutmanni*) venom by opossum (*Didelphis marsupialis*) serum: isolation of *Didelphis marsupialis* 0.15Dm fraction on DEAE-cellulose chromatography. *Immunopharmacol. Immunotoxicol*. 30(4):883-896.
- PORAN NS, COSS RG, BENJAMINI E. 1987. Resistance of California ground squirrels (*Spermophilus beecheyi*) to the venom of the northern pacific rattlesnake (*Crotalus viridis oreganus*): a study of adaptive variation. *Toxicon*. 25(7):767-777.
- RAMÍREZ MS, SÁNCHEZ EE, GARCÍA-PRIETO C, PÉREZ JC, CHAPA GR, MCKELLER MR, RAMÍREZ R, DE ANDA Y. 1999. Screening for fibrinolytic activity in eight viperid venoms. *Comp. Biochem. Physiol. C. Pharmacol. Toxicol. Endocrinol*. 124(1):91-98.
- RAWAT S, LAING G, SMITH DC, THEAKSTON D, LANDON J. 1994. A new antivenom to treat eastern coral snake (*Micrurus fulvius fulvius*) envenoming. *Toxicon*. 32(2):185-190.
- RENGIFO C, RODRÍGUEZ-ACOSTA A. 2004. Serpientes Veneno y Tratamiento Médico en Venezuela. Fondo Editorial de la Facultad de Medicina, Universidad Central de Venezuela, Caracas, Venezuela, pp. 1-80.
- ROBEVA A, POLITI V, SHANNON JD, BJARNASON JB, FOX JW. 1991. Synthetic and endogenous inhibitors of snake venom metalloproteinases. *Biomed.*

- Biochim. Acta. 50(4-6):769-773.
- ROCHA SL, LOMONTE B, NEVES-FERREIRA AG, TRUGILHO MR, JUNQUEIRA-DE-AZEVEDO IL, HO PL, DOMONT GB, GUTIÉRREZ JM, PERALES J. 2002. Functional analysis of DM64, an antimyotoxic protein with immunoglobulin-like structure from *Didelphis marsupialis* serum. Eur. J. Biochem. 269(24):6052-6062.
- ROCHA SL, NEVES-FERREIRA AG, TRUGILHO MR, CHAPEAUROUGE A, LEON IR, VALENTE RH, DOMONT GB, PERALES J. 2009. Crotalid snake venom subproteomes unraveled by the antiophidic protein DM43. J. Proteome. Res. 8(5):2351-2360.
- RODRÍGUEZ-ACOSTA A, AGUILAR I, GIRÓN ME. 1995a. Antivenom activity of opossum (*Didelphis marsupialis*) serum fraction. Toxicon. 33(1):95-98.
- RODRÍGUEZ-ACOSTA A, AGUILAR I, GIRÓN ME. 1995b. Antivenom activity of opossum (*Didelphis marsupialis*) serum fractions against uracoan rattlesnake (*Crotalus vegrandis* Klauber, 1941) venom. Roum. Arch. Microbiol. Immunol. 54(4):325-330.
- RODRÍGUEZ-ACOSTA A, AGUILAR I, GIRÓN ME, RODRÍGUEZ-PULIDO V. 1998. Haemorrhagic activity of neotropical rattlesnake (*Crotalus vegrandis* Klauber, 1941) venom. Nat. Toxins. 6(1):15-18.
- RODRÍGUEZ-ACOSTA A, MÁRQUEZ A, SALAZAR AM, GIRÓN ME, CARVAJAL Z, IBARRA C, ESTRELLA A, GUERRERO B. 2010. Hemostatic properties of Venezuelan *Bothrops* snake venoms with special reference to *Bothrops isabelae* venom. Toxicon. 56(6):926-935.
- SALGUEIRO LM, RODRÍGUEZ-ACOSTA A, RIVAS-VETENCOURT P, ZERPA M, CARILLO G, AGUILAR I, GIRÓN ME, ACEVEDO CE, GENDZEKHADZE K. 2001. Inhibition of Crotalidae venom hemorrhagic activities by *Didelphis marsupialis* liver spheroids culture supernatants. J. Nat. Toxins. 10(2):91-97.
- SÁNCHEZ EE, RODRÍGUEZ-ACOSTA A. 2008. Inhibitors of snake venoms and development of new therapeutics. Immunopharmacol. Immunotoxicol. J. 30(4):647-678.
- SÁNCHEZ EE, GARCÍA C, PÉREZ JC, DE LA ZERDA SJ. 1998. The detection of hemorrhagic proteins in snake venoms using monoclonal antibodies against Virginia opossum (*Didelphis virginiana*) serum. Toxicon. 36(10):1451-1459.
- SÁNCHEZ EE, RODRÍGUEZ-ACOSTA A, PALOMAR R, LUCENA S, BASHIR S, SOTO JG, PÉREZ JC. 2009. Colombistatin: a disintegrin isolated from the venom of the South American snake (*Bothrops colombiensis*) that effectively inhibits platelet aggregation and SK-Mel-28 cell adhesion. Arch. Toxicol. 83(3):271-279.
- SCHMIDLY DJ. 1983. Accounts of wild animals. In: Texas mammals east of the Balcones fault zone. Texas A&M Press. College Station, pp. 34-38.
- SEGLEN PO. 1976. Preparation of isolated rat liver cells. In: PRESCOT DM. (Ed.). Methods in Cell Biology. Academic Press, New York, USA, pp. 29-83.
- SELISTRE DE ARAUJO HS, WHITE SP, OWNBY CL. 1996. cDNA cloning and sequence analysis of a lysine-49 phospholipase A2 myotoxin from *Agkistrodon contortrix laticinctus* snake venom. Arch. Biochem. Biophys. 326(1):21-30.
- SOTO JG, PÉREZ JC, MINTON SA. 1988. Proteolytic, hemorrhagic and hemolytic activities of snake venoms. Toxicon. 26(9):875-882.
- STRAIGHT RK, GLENN GL, SNYDER CC. 1976. Antivenom activity of rattlesnake blood plasma. Nature. 261(5557):259-260.
- STÜRZEBECKER J, NEUMANN U, MEIER J. 1991. Inhibition of the protein C activator PROTAC, a serine proteinase from the venom of the southern copperhead snake *Agkistrodon contortrix contortrix*. Toxicon. 29(2):151-155.
- SWANSON PL. 1946. Effects of snake venom on snakes. Copeia. 4:242-249.
- TANIZAKI MM, KAWASAKI H, SUZUKI K, MANDELBAUM FR. 1991. Purification of a proteinase inhibitor from the plasma of *Bothrops jararaca* (jararaca). Toxicon. 29(6):673-681.
- TARNG SF, HUANG SY, PÉREZ JC. 1986. Isolation of antihemorrhagic factors in opossum (*Didelphis*

- virginiana*) serum using a monoclonal antibody immunoabsorbent. *Toxicon*. 24(6):567-573.
- THEAKSTON RDG, FAN HW, WARRELL DA, DIAS DA SILVA WD, WARD SA, HIGASHI HG, BUTANTAN INSTITUTE ANTIVENOM STUDY GROUP (BIASG). 1992. Use of enzyme immunoassays to compare effect and asses the dosage regimens of three Brazilian Bothrops antivenoms. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 47(5):593-604.
- TOMIHARA Y, YONAH K, NOZAKI M, YAMAKAWA M, KAMURA T, TOYAMA S. 1987. Purification of three antihemorrhagic factors from the serum of a mongoose (*Herpestes edwardsii*). *Toxicon*. 25(6):685-689.
- TONG JZ, DE LAGASIE P, FURLAN V, CRESTEIL T, BERNARD O, ALVAREZ F. 1992. Long-term culture of adult rat hepatocyte spheroids. *Exp. Cell Res.* 200(2):326-332.
- VALENTIN E, LAMBEAU G. 2000. What can venom phospholipases A2 tell us about the functional diversity of mammalian secreted phospholipases A2? *Biochimie*. 82(9-10):815-813.
- VELLARD J. 1945. Resistencia de los "Didelphis" (zarigüeya) a los venenos ofídicos (Nota previa). *Rev. Brasil. Biol.* 5:463-467.
- VELLARD J. 1949. Investigaciones sobre inmunidad natural contra los venenos de serpientes I. *Publ. Mus. Hist. Nat. Lima Ser. A Zool.* 1:72-96.
- VELLARD J. 1950. Investigaciones sobre inmunidad natural contra los venenos de serpientes II. *Publ. Mus. Hist. Nat. Lima Ser. A Zool.* 4:72-96.
- WEISSENBERG S, OVADIA M, FLEMINGER G, KOCHVA E. 1991. Antihemorrhagic factors from the blood serum of western diamondback rattlesnake *Crotalus atrox*. *Toxicon*. 29(7):807-818.
- WEISSENBERG S, OVADIA M, KOCHVA E. 1992. Inhibition of the proteolytic activity of hemorrhagin-e from *Crotalus atrox* venom by antihemorrhagins from homologous serum. *Toxicon*. 30(5-6):591-597.
- WERNER RM, VICK JA. 1977. Resistance of the opossum (*Didelphis virginiana*) to envenomation by snakes of the family Crotalidae. *Toxicon*. 15(1):29-33.