

VENENOS DE SERPIENTES Y MOLÉCULAS ANTIVENENO

por

Juan Fernando Duque Osorio¹, Adalberto Sánchez¹, Leonardo Fierro¹,
Silverio Garzón¹ & Rafael Santiago Castaño¹

Resumen

Duque Osorio, J.F., A. Sánchez, L. Fierro, S. Garzón & R.S. Castaño: Venenos de serpientes y moléculas antiveneno. Rev. Acad. Colomb. Cienc. **31** (118): 109-137, 2007. ISSN 0370-3908.

Los accidentes ofídicos pueden producir hemorragias (causadas por SVMPs), mionecrosis (causadas por PLAs) y dolor, y anualmente 50 mil de éstos son fatales, especialmente en los trópicos. Las terapias convencionales por inmunoglobulinas son sólo parcialmente efectivas y pueden producir efectos inmunes adversos, por lo cual se están estudiando proteínas antiveneno naturales de mamíferos [DM43 (antihemorragina) y DM64 (antimiotóxica) de la zarigüeya (Marsupialia: *Didelphis*)] que han demostrado ser más efectivas. Además las PLAs y SVMPs venosas tienen sus contrapartes endógenas normales no venenosas (PLAs y MMPs) en animales como los humanos, y cuando el balance entre estas últimas y sus inhibidores se rompe, se producen patologías como: artritis, arterioesclerosis, asma, diabetes, choques sépticos, neoplasias, inflamaciones, psoriasis, reumatismo, etc. Además de estos aspectos médicos se repasa la evolución de las serpientes y sus sistemas de veneno, concluyéndose que falta información sobre, entre otros: la parafilética y muy diversa familia “colubridae”; “carreras armamentistas evolutivas” entre serpientes venenosas y sus presas; la inusual (desafía la teoría neutral de la evolución molecular) y acelerada evolución de las moléculas de veneno de serpientes.

Palabras clave: α 1B-Glico proteína, *Didelphis*, evolución, familia supergen de las inmunoglobulinas, mamíferos (Mammalia), proteínas antiveneno (anti-SVMP, DM64, DM43, OPRIN, PLIs, PO41), serpientes (Serpentes), veneno de serpientes (PLAs, SVMPs), toxicología, Viperidae.

Abstract

Venom snake bites can produce hemorrhages (caused by SVMPs), myonecrosis (caused by PLAs) and pain. Annually, 50,000 of these bites are fatal, especially in the tropics. Conventional therapies with immunoglobulins are only partially effective and can produce adverse immune effects.

t Correo electrónico: juanferduque@hotmail.com

1 Grupo de Biología Integrativa, Escuela de Ciencias Básicas Médicas, Facultad de Salud, Universidad del Valle, Cali-Colombia.

Hence natural antivenom proteins from mammals, which are potentially more effective and secure, are being studied [Opossum's (Marsupialia: *Didelphis*) DM43 (antihemorrhagin) and DM64 (antimytotoxic protein)]. Moreover, venom PLAs and SVMPs have nonvenom normal endogen counterparts (PLAs y MMPs) in animals like humans, and when the balance between the latter and their inhibitors is disrupted, the following pathologies can happen: arthritis, arteriosclerosis, asthma, diabetes, septic shocks, neoplasias, inflammations, psoriasis, rheumatism, etc. Additionally to this medical aspects, snake and their venom systems evolution is reviewed, and it is concluded that there are research opportunities, in (among other topics): the paraphyletic and very diverse "colubridae"; "evolutionary arms races" between snakes and their prey; the unusual (defies the neutral theory of molecular evolution) and accelerated evolution of snake venom molecules.

Key words: α 1B-Glico protein, *Didelphis*, evolution, immunoglobulin supergene family, mammals (Mammalia), antivenom proteins (anti-SVMP, DM64, DM43, OPRIN, PLIs, PO41), snakes (Serpentes), snake venom (PLAs, SVMPs), toxinology, Viperidae.

Abreviaciones (en su mayoría provenientes del inglés): **3D** (tridimensional), **3FTx** (3 Finger Toxin), **α 1BG** (α 1B-Glico Proteína), **ABF-Dm** (Anti-Bothropic Fraction of *Didelphis marsupialis*), **ADAM** (A Desintegrin-like And Metalloprotease domains), **AHF** [Mongoose (Mammalia: Carnivora: Herpestidae: *Herpestes*) Anti-Hemorrhagic Factor: **AHF1/2 y 3**], **CK** (Creatine Kinase), **CRISP** (Cysteine Rich Secretory Protein), **CRD** (Carbohydrate Recognition Domain), **CTLD** (C-Type Lectin-like Domain), **Da** (Dalton, unidad de masa molecular), **DM** [grupo de proteínas antiveneno de serpientes extraídas de mamíferos, cuyos miembros típicos son aquellas extraídas de la Zarigüeya (Mammalia: Marsupialia: Didelphidae: *Didelphis marsupialis*): **DM40, 43, 64**], **FSIG** (Familia Supergen de las Inmunoglobulinas), **GBL** (Galactose Binding Lectins), **kDa** (Kilo-Dalton = 1,000 Daltons), **LDH** (Lactate Deshidrogenase), **LRRs** (Leucine Rich Repeats), **Lyt2** (Proteína de Superficie de Linfocitos T Murinos. Homóloga a T8 de Humanos), **MDC** (Metalloprotease, Desintegrin-like, Cysteine-rich), **MHC** (Major Histocompatibility Complex), **MMPs** (Matrix Metallo-Proteases), **Mt** (Mitoxina), **NCBI** (National Center for Biotechnology Information, National Library of Medicine, National Institutes of Health, USA: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), **NGF** (Nerve Growth Factor), **OPRIN** [Opossum (*Didelphis virginiana*) Proteinase Inhibitor], **PLA** (Phospholipase A), **PLI** (Phospholipase Inhibitor), **PO41** [*Philander opossum* (Didelphidae) Metalloproteinase Inhibitor], **SVMP** (Snake Venom Metallo-Protease), **T8** (Proteína de Superficie de Linfocitos T Humanos. Homóloga a la Lyt2 de Murinos), **Thy-1** (o CD90. Polipéptido de superficie de Timocitos y linfocitos T periféricos Murinos), **TIMP** (Tissue Inhibitor of Metallo-Proteases), **UPAR** (Urokinasetype Plasminogen Activator Receptor).

Introducción

1.1 Características e incidencias de los accidentes ofídicos: Las mordeduras de serpientes venenosas producen daño tisular local en forma de hemorragias, edema, mionecrosis y dolor intenso (Neves-Ferreira *et al.*, 1997; Thwin & Gopalakrishnakone, 1998), y efectos sistémicos como alteraciones en el proceso de coagulación y liberación de sustancias farmacológicamente activas como histamina, serotonina y bradiquinina (Neves-Ferreira *et al.*, 2000); todo lo cual puede llevar a la muerte de la víctima. Cerca del 15%, de las aproximadamente 3,000 especies vivas de serpientes, son consideradas como peligrosas para los humanos (Gold *et al.*, 2002), todas las cuales pertenecen al grupo tradicionalmente llamado superfamilia Colubroidea (colubroides: Fry *et al.*, 2003; Fry, 2005; Vidal, 2002). La distribución filogenética de este y los demás grupos de serpientes han sido esquema-

tizados en la figura 1. Aunque los envenenamientos por mordeduras de serpientes no son reportados en su totalidad y su incidencia global no es bien entendida (Perales & Domont, 2002), se estima que anualmente suceden en el mundo 5 millones de accidentes ofídicos, los cuales causan unas 50,000 muertes, especialmente en las áreas rurales de Asia, Sur América y África (Lizano *et al.*, 2003; Perales & Domont, 2002), sin contar los muchos que no son reportados (Gold *et al.*, 2002). Según Gold *et al.* (2002) en Estados Unidos se reportan oficialmente un promedio anual de 6,000 mordeduras, de las cuales 2,000 lo son por parte de serpientes venenosas, y 5 o 6 resultan ser fatales (Gold *et al.*, 2002). La mayoría de estos accidentes en EUA son producidos por serpientes del género *Crotalus* (Viperidae: Crotalinae) y suceden generalmente en el suroeste del país, pues en el este prácticamente estas serpientes han sido erradicadas (Gold *et al.*, 2002). Según Mattison (1995) las estadísticas en Sur América son ex-

tremadamente difíciles de conseguir dado el alto número de nativos americanos que no tienen contacto con el mundo exterior. El mismo autor cita como ejemplo la tribu Waorani de Ecuador, sobre la cual se estima que casi el 5% de sus muertes son causadas por mordeduras de serpientes, y que cerca del 80% de su población ha sido mordida al menos una vez en su vida. En otras partes de Suramérica cerca del 0.5 % de la población es mordida por serpientes al año, pero solo una fracción pequeña de estos accidentes son fatales. La mayoría de estos accidentes en Sur América son causados por vipéridos (Mattison, 1995), de los cuales según Neves-Ferreira *et al.* (1997) un 90% son causados por serpientes del género *Bothrops*, reduciéndose la tasa de mortalidad del 8% al 2.4% con cuidado médico adecuado. Se toman, de una forma muy categórica, como las más venenosas a las serpientes elápidas y vipéridas, y como las menos venenosas a las “colúbridas”. Sin embargo según Chiszar & Smith (2002) no todos los elápidos y vipéridos son peligrosos para los humanos, y reportan que hay venenos de colúbridos que pueden causar síntomas serios e incluso fatales a animales grandes como *Homo sapiens*; todo esto dentro de su completa revisión sobre envenamientos por colúbridos en Estados Unidos, dentro de lo cual destacan que muchos de los accidentes ofídicos por colúbridos en este país están aumentando por la importación de especies de serpientes exóticas para fines comerciales o experimentales, sobre las cuales se creía que su toxicidad era poca. Así, muchos de estos casos son sufridos por herpetólogos y funcionarios de zoológicos. Lo mismo fue encontrado por Gutiérrez & Sasa (2002) en su revisión sobre envenamiento por colúbridos en México y Centro América, dentro de la cual llaman la atención sobre la poca información epidemiológica sobre accidentes ofídicos y sobre lo poco que se sabe de la farmacología de los venenos de colúbridos de esta región de América. Dicen que mientras los envenamientos por vipéridos tienden a ser sufridos por los pies de personas que trabajan en el campo, las de colúbridos lo son por las manos de quienes las manipulan intencionalmente (herpetólogos y similares). En el mismo estudio (Gutiérrez & Sasa, 2002) se sugiere una explicación de porque la incidencia de envenamientos por parte de vipéridos es mayor, aún cuando hay muchas más especies de colúbridos: estos últimos son cazadores activos y por lo tanto muy móviles, por lo cual cuando se ven amenazados por un humano tienden a huir. En cambio los vipéridos son cazadores pasivos que esperan a su presa (sit and wait predators), es decir son de poca movilidad, por lo cual no van a estar tan prestos a huir ante la amenaza de un animal. De todos modos, los datos de Gutiérrez & Sasa (2002) confirman la mayor “peligrosi-

dad” de los venenos de vipéridos comparados con los de los “colúbridos”. De los reportes revisados en este último estudio para México y Centro América, se desprende que la mayoría de accidentes con “colúbridos” no pasaron de inflamación, dolor y eritema locales, y que en ningún caso llegaron a ser de naturaleza sistémica. Según Gutiérrez & Sasa (2002) el panorama en Sur América sería muy parecido. En cambio los venenos de vipéridos y elápidos producen síntomas más graves que se extienden a nivel sistémico.

1.2 Evolución y clasificación de las serpientes: Según Mattison (1995) los fósiles más antiguos de serpientes corresponden a los géneros *Lapperontophis* y *Simoliophis*, habiendo sido el primer género una serpiente terrestre de lo que ahora es el norte de África y el segundo una serpiente marina del Cretácico [hace 100 millones de años (ma)] que se distribuía por el norte de África y sur de Europa en lo que entonces era un mar. Sin embargo no se encontraron más datos sobre estos dos géneros. Según Mattison (1995) hace 65 millones de años, cuando se extinguieron la mayoría de dinosaurios, las serpientes ya se habían diversificado y extendido, pues durante este período se han encontrado serpientes fósiles por todo el mundo. El grupo más generalizado de serpientes actuales son los scolecofidios, compuesto por especies de hábitos fosoriales. Por esto, en los esquemas taxonómicos antiguos las serpientes eran relacionadas estrechamente con otros reptiles escamosos fosoriales y sin extremidades, los amphisbaenidos y los dibamidos (Lee & Scanlon, 2002).

Sin embargo, estudios más recientes (Townsend *et al.*, 2004) han demostrado que el grupo más estrechamente relacionado con las serpientes son los lagartos anguimorphos varanoideos (Lee & Scanlon, 2002). Es por esto que en la figura 1 se han utilizado estos lagartos, como grupo externo para enraizar la filogenia de serpientes. Esta no relación estrecha entre serpientes y otros grupos de reptiles escamosos sin extremidades, se ve reforzada por el hecho de que las familias extintas Pachyophiidae (*Pachyophis*, *Pachyrhachis* y *Haasiophis*), Madtsoiidae (*Wonambi*: Scanlon & Lee, 2000) y Dinilysiidae (*Dinilyisia*) son formas presumiblemente no fosoriales (Lee & Scanlon, 2002), de lo cual se concluye que los hábitos fosoriales de Scolecophidia fueron secundariamente adquiridos y no representan una condición ancestral para las serpientes (Scanlon & Lee, 2000).

Teniendo en cuenta esto y que tanto las serpientes extintas y los reptiles escamosos vivos más emparentados con las serpientes, tienden a ser animales relativamente

grandes y con hábitos predatorios activos, ya sea terrestres o acuáticos, es muy posible que las serpientes hayan evolucionado de formas que vieron reducidas en sus extremidades durante la adquisición de movimientos natatorios tipo anguila o movimientos de deslizamiento en vegetación densa.

Las serpientes se originaron a principios del Cretácico hace más de 135 millones de años (ma; **Mattison, 1995**). Las características y relaciones de las primeras serpientes son algo enigmáticas y controversiales, pues la mayoría de fósiles son solo fragmentos. Como ejemplo de estas controversias, y en contraposición a los estudios revisados hasta aquí y en los cuales se basa la figura 1, **Tchernov et al. (2000)** proponen que Pachyophiidae es el grupo hermano de Macrostromata, dentro de un estudio donde describen a *Haasiophis*, un fósil del cretácico medio a tardío. En esta controversia del grupo Tchernov (artículo publicado en Science) por un lado y el de Lee & Scanlon (Nature) por el otro, **Greene & Cundall (2000)** han toma-

do partido por el primero, defendiendo la posición de Pachyophiidae dentro de Alethinophida, diciendo que las semejanzas entre lagartos mosasauroideos (Anguimorpha) y serpientes son superficiales, y que el hecho de que *Pachyrhachis* y *Haasiophis* tengan extremidades pélvicas no los acerca a estos lagartos, pues dicen ellos que es posible que estas extremidades no sean homólogas a los de otros tetrápodos (así tengan elementos óseos similares) y que sean una adquisición nueva de estos géneros fósiles. **Vidal & Hedges (2002)**, en el marco de una muy aclaratoria filogenia molecular de serpientes, toman una posición neutral entre estas dos posiciones, llamando la atención sobre el hecho de que ambos escenarios (origen acuático o origen fosorial) son igualmente plausibles desde el punto de vista de las filogenias actuales. Toda esta controversia no solo tiene que ver con la posición filogenética de unos grupos fósiles, si no en el fondo se trata de como evolucionaron las serpientes a partir de otros lagartos. Uno de los fósiles menos incompletos es el género *Wonambi* (Matdsoiidae) descrito por **Scanlon & Lee**

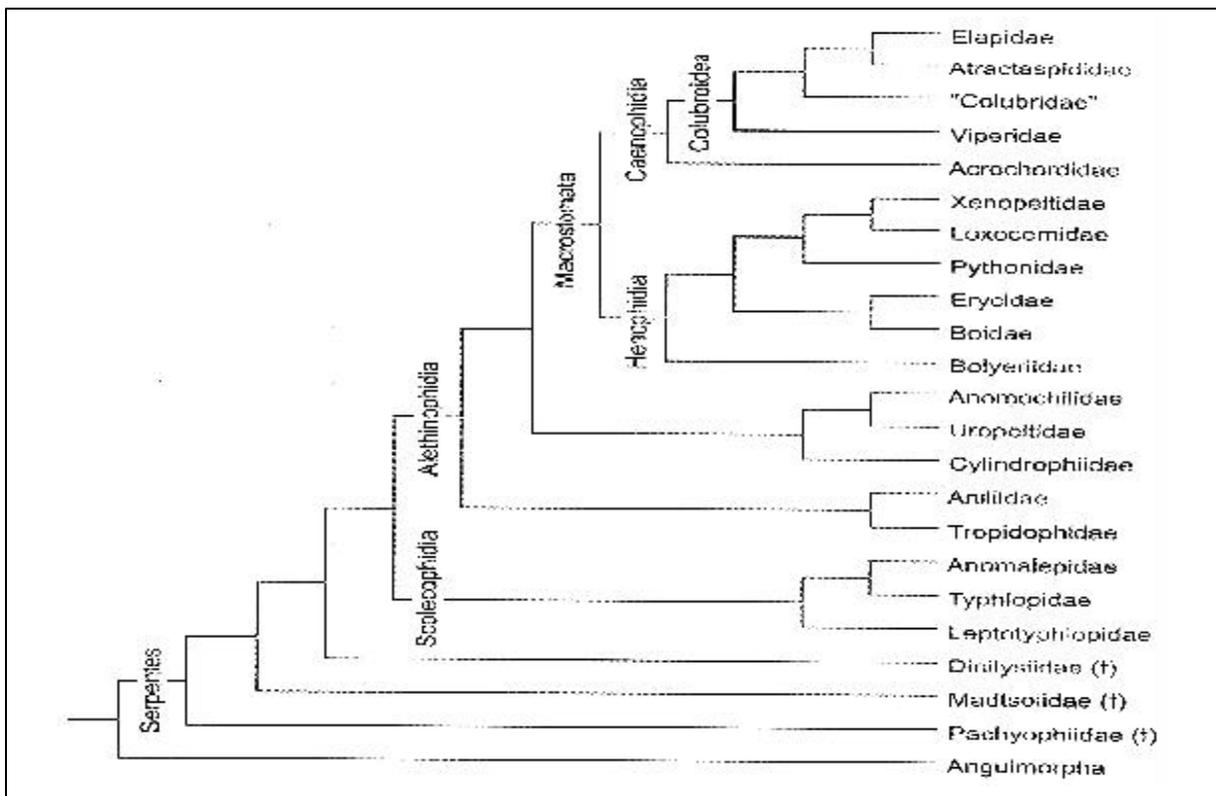


Figura 1. Filogenia de las serpientes a nivel de familias. Basada en las filogenias moleculares de **Heise et al. (1995)**, **Kelly et al. (2003)**, **Vidal & Hedges (2002)** y **Slowinski & Lawson (2002)**, complementadas con las filogenias paleontológicas de **Scanlon & Lee (2000)** y **Lee & Scanlon (2002)**. Pachyophiidae, Matdsoiidae y Dinilysiididae son a familias extintas (†). El grupo de lagartos más estrechamente relacionado con las serpientes es Anguimorpha (**Townsend et al., 2004; Lee & Scanlon, 2002**), y por lo tanto, se usa como grupo externo para enraizar el árbol.

(2000), el cual le permitió a este grupo defender una posición filogenética basal no solo para esta familia extinta, sino para Pachyophiidae y Dinilysiidae también. Según **Scanlon & Lee** (2000) los matdsoiidos eran serpientes de tamaño medio a gigante, que vivieron desde mediados del Cretácico (hace unos 100 ma) hasta el Pleistoceno (hace 1.7 ma). Otro estudio de este grupo (**Caldwell & Lee**, 1997), donde se revisa el estatus filogenético del fósil marino cretácico *Pachyrhachis* (Pachyophiidae), está en línea con la posición de Scanlon & Lee, donde se la asigna a Pachyophiidae la posición más basal dentro de las serpientes, seguido por Madstoiidae y Dinilysiidae, y se defiende un origen acuático para las serpientes, y una estrecha relación de estas con lagartos anguimorfos varanoideos como parientes vivos más próximos y mosasauroides como parientes fósiles más cercanos. Esta posición es la que aquí se ha representado en la figura 1.

Aunque son animales con un plan corporal muy conservado (cuerpos alargados sin extremidades visibles externamente), las serpientes son grupo zoológico muy exitoso que ha invadido un rango muy amplio de ambientes (**Lee & Scanlon**, 2002), ocupando hábitats terrestres, arbóreos, fosoriales y acuáticos, en todos los continentes exceptuando la antártica (**Townsend et al.**, 2004). Esta gran diversidad junto con un plan corporal conservado a dificultado obtener clasificaciones y filogenias comprensivas y aceptadas por la mayoría de autores, basadas en caracteres morfológicos (**Kelly et al.**, 2003). La distribución de las aproximadamente 3,000 especies de serpientes vivas (**Fry et al.**, 2003; **Vidal**, 2002; **Vidal & Hedges**, 2002) no es homogénea en las familias (**Mattison**, 1995). Por ejemplo solo la familia “colubridae”, la más diversa, comprende dos tercios de las especies existentes (**Pough et al.**, 1999). Las serpientes actuales se dividen en dos grandes grupos: Scolecophidia y Alethinophidia (**Kelly et al.**, 2003; **Vidal**, 2002; **Vidal & Hedges**, 2002). Como ya se dijo, el grupo más basal de serpientes vivas es Scolecophidia, el cual incluye miembros con características primitivas, de cuerpos pequeños y hábitos fosoriales, que se alimentan principalmente artrópodos (**Vidal**, 2002; **Vidal & Hedges**, 2002) de forma frecuente, mientras que la mayoría de aletínofidios (referidos como “serpientes típicas”) no son fosoriales y se alimentan de presas grandes y de forma infrecuente, pues su tendencia evolutiva más importante es el aumento de su apertura bucal y la independencia de sus mandíbulas, lo cual les permite ingerir presas más grandes que ellas mismas (**Vidal**, 2002; **Vidal & Hedges**, 2002).

Dentro de este último grupo (Alethinophidia) tradicionalmente se ha tomado como su subgrupo más basal a

Anilioidea [Uropeltidae, Aniliidae (*Anilius*), Cyliodrophiidae (*Cyliodrophis*) y *Anomochilus*], grupo conformado por especies que en su mayoría son fosoriales (**Caldwell & Lee**, 1997; **Vidal & Hedges**, 2002). Sin embargo, estudios moleculares recientes (**Vidal & Hedges**, 2002; **Slowinski & Lawson**, 2002) han puesto de relieve que “Anilioidea” es polifilético, y que los géneros tradicionalmente incluidos dentro de este grupo forman en realidad dos clados soportados no solo por datos moleculares si no también por su distribución. Así, sobre todo según **Vidal & Hedges** (2002), existe un grupo de “Anilioideos” Americanos formado por *Anilius*, y sorpresivamente por *Tropidophis* y *Trachyboa*, dos géneros que hacen parte de la familia (o subfamilia) Tropidophidae *sensu stricto* la cual en estudios sistemáticos morfológicos ha sido posicionada entre Henophidia y Caenophidia (**Lee & Scanlon**, 2002; **Scanlon & Lee**, 2000). Según **Vidal & Hedges** (2002) el otro grupo de “Anilioideos” serían los asiáticos conformados por Cyliodrophiidae, Uropeltidae y Anomochilidae (*Anomochilus*).

El otro grupo de aletínofidios es Macrostromata, último que a su vez está dividido en: Henophidia (Boidae, Erycidae, Pythonidae, Loxecemidae, Xenopeltidae, Bolyeriidae) y Caenophidia (Acrochordidae + Colubroidea). La posición de Loxecemidae, Xenopeltidae y Bolyeriidae, entre otros, ha sido controversial. Géneros como *Ungaliophis* y *Exiliboa* (que tradicionalmente han sido clasificados dentro de Tropidophidae), de acuerdo a los estudios moleculares seguidos aquí (**Vidal & Hedges**, 2002; **Slowinski & Lawson**, 2002) pertenecen a Erycidae, grupo este que dependiendo del tratamiento dado a los datos, resulta estar embebido en o ser la familia hermana de Boidae. Henophidia incluye entonces todas las serpientes gigantes, boas, anacondas y pitones. Según **Mattison** (1995) los boidos, que junto con los pitónidos son los grupos más representativos de Henophidia, ya estaban presentes después del Cretácico, tiempo en el cual alcanzaron el pico de su especiación y formaban la familia dominante de serpientes. Dos diferencias importantes entre boidos y pitónidos es que los primeros están ubicados en el nuevo mundo y son vivíparos, mientras que los segundos se encuentran en África, Asia y Australia y se reproducen por medio de huevos (**Mattison**, 1995; **Pough et al.**, 1999). En ambos grupos existen especies con focetas termorreceptoras alrededor de sus mandíbulas, las cuales les ayudan a detectar presas de “sangre caliente” como mamíferos (**Mattison**, 1995). Los henofidios son menos derivados que los cenofidios, pues entre otras cosas (como la forma de capturar y neutralizar las presas), las boas (Boidae) y pitones (Pythonidae) tienen vestigios de cintura pélvica, lo cual se puede ver por la presencia de pequeñas garras

en el lugar de las extremidades posteriores. Estas garras generalmente son más grandes en machos que en hembras, y son utilizados por los primeros para estimular a las últimas durante el cortejo (**Mattison, 1995**).

Una diferencia ecológica puesta de relieve por **Vidal & Hedges (2002)** entre Henophidia y Caenophidia, es la forma como neutralizan sus presas. Los primeros realizan una captura unimodal, con sus sistemas de alimentación y locomoción acoplados durante la neutralización de la presa. En cambio los Cenofidios, también conocidos como “serpientes avanzadas”, utilizan modos alternos de captura complementados, en muchos casos, con inyección de saliva venenosa (=venenos de serpientes), es decir sus sistemas de alimentación y locomoción están desacoplados durante la neutralización de la presa. Dentro de Caenophidia, el grupo más grande entonces es Colubroidea, las cuales comprenden el 80% (2,500) de especies de especies vivas recocidas (**Fry et al., 2003; Kelly et al., 2003**) y constituyen el único grupo de serpientes venenosas (**Fry et al., 2003; Fry, 2005; Vidal, 2002**). Es reconocido que el grupo que junto a Colubroidea forma Caenophidia, son los acuáticos Acrocórdidos (**Vidal, 2002**). Según **Kelly et al. (2003)** y **Vidal (2002)**, aunque la composición y distribución de las familias colubroideas ha sido controversial, en la actualidad se reconocen formalmente cuatro familias colubroideas: Atractaspididae (3% de la diversidad de colubroideos, 70 especies, familia conformada por especies venenosas y cavadoras de Africa y el medio oriente; **Mattison, 1995**); Viperidae (el 10% de los colubroideos, 240 sps), Elapidae (12%, 270 sps) y “Colubridae” (75%, 1850 sps). La familia más diversa de serpientes entonces son los “colúbridos”, los cuales se han adaptado a casi todos los nichos ecológicos posibles (**Mattison, 1995**). El único continente donde los Colúbridos no son el grupo de ofidiofaúnico dominante es Australia. La diversificación de los “colúbridos” se hace patente en el Mioceno (22.5 a 5.5 ma; **Mattison, 1995; Pough et al., 1999**), lo cual coincide con la desaparición de los linajes de serpientes más antiguos y la disminución de Boidos, los cuales probablemente fueron entonces reemplazados por los primeros (**Mattison, 1995**). También durante el Mioceno se han encontrado representantes fósiles de otras dos familias de colubroideos: Viperidae y Elapidae. En conclusión y según el registro fósil, la gran diversidad Colubroidea se hace patente en el Mioceno (**Mattison, 1995**), lo cual, estaría relacionado con el surgimiento en este grupo de la habilidad de matar por medio de venenos (**Pough et al., 1999**). Sin embargo según **Fry (2005) & Vidal (2002)**, el surgimiento de los sistemas venenosos y la radiación Colubroidea, habrían empezado antes hace 60 o 80 millones de años (Cretácico-Paleoceno). Los “colúbridos” se caracteri-

zan por tener cuerpos relativamente alargados, escamas grandes en sus cabezas y grandes ojos. Algunos son vivíparos y otros ovíparos. Algunos “colúbridos” son venenosos pero sus métodos para desplegar el veneno no son tan complejos como los de los vipéridos (estas diferencias serán repasadas en el aparte de Evolución de Veneno de Serpientes). Pocas especies de colúbridos son peligrosas para el hombre, y solo el 30 al 40% de ellos posee glándula de Duvernoy, localizada en la región maxilo-temporal y especializada en la producción de veneno (**Kardong, 2002**).

Sin embargo, de todas estas características comunes y teniendo en cuenta su descomunal diversidad comparada con otras familias de serpientes, **Mattison et al. (1995)** dijo que las investigaciones futuras seguramente dividirán a “Colubridae” en familias más pequeñas. Y esto está resultando ser cierto. En las filogenias de Caenophidia construidas por **Kelly et al. (2003)** con base a 4 genes mitocondriales (Cytb, ND4, 12s y 16s rRNA), no se pudo recuperar un “Colubridae” monofilético (por eso se pone entre comillas) de acuerdo a la concepción tradicional de esta familia. Aunque a grandes rasgos, se recuperaron las principales familias de cenofidios, lo cual se ve reflejado en la figura 1, subfamilias como Pareatinae, Homalopsinae, Psammophiinae, Xenodermatinae, Pseudoxyrophiinae, Lamprophiinae (Boodontinae) quedaron en este estudio (**Kelly et al. 2003**) fuera de lo que sería este “nuevo colubridae”. De estas subfamilias, las tres primeras se recuperaron como grupos externos de “Colubridae” + Elapidae. Natricinae, otra familia tradicionalmente colúbrida, quedó dentro de este “Colubridae” redefinido pero de forma difilética. De los hallazgos de este estudio (**Kelly et al., 2003**) con respecto a “Colubridae”, el más sorprendente es que la subfamilia tradicionalmente colúbrida Xenodermatinae (=Xenoderminae) no solo quedó fuera de “Colubridae”, sino que se recuperó como grupo hermano de *Acrochordus* (Acrochordidae) en una ubicación basal dentro de Caenophidia (fuera de Colubroidea), quedando entonces este último grupo definido así: Caenophidia = (Acrochordidae + Xenodermatinae, Colubroidea).

Otra familia de colubroideos, los elápidos, incluyen las cobras, serpientes marinas, serpientes coral y varias especies Australianas que han evolucionado ocupando los nichos disponibles por la relativa escasez de colúbridos y vipéridos en este país-continente. Por lo tanto los elápidos son la principal familia de serpientes en Australia. Según **Pough et al. (1999)** los elápidos son predadores que buscan activamente su presa (a diferencia de los vipéridos, ver más adelante). En el estudio molecular filogenético de Caenophidia de **Kelly et al. (2003)** se recuperó un Elapidae aceptablemente tradicional (es decir no tan “podado” como “Colubridae”) dentro

de lo cual hay que destacar que se confirma el hecho de que Hydrophiinae es una subfamilia dentro de Elapidae. Los hidrófinos son serpientes marinas generalmente muy venenosas e incluyen a géneros como *Hydrophis*, *Pelamis*, *Enhydrina*, *Lapemis*. Dentro de los hidrófinos también se encuentran los elápidos terrestres de Australia, Papua y Melanesia (Vidal, 2002). El otro grupo de elápidos son los elapinos, que incluyen especies terrestres de África, Asia y América (Vidal, 2002). Con respecto a Elapidae, e interpretando el último árbol filogenético (Consenso Bayesiano) del estudio de molecular de Kelly *et al.* (2003) se podría llegar a concluir que dentro del Elapidae que ellos recuperaron, quedarían incluidas las familias tradicionalmente colúbridas como Pseudoxyrophiinae y Lamprophinae (Boodontinae). A diferencia de “Colubridae”, Vidal (2002) dice que Elapidae es un agrupamiento monofilético bien soportado por estudios morfológicos y moleculares. El último hallazgo de importancia de Kelly *et al.* (2003) con respecto a los elápidos, es que se recuperó como su grupo hermano a los atractaspídidos (*Atractaspis* y *Aparallactus*).

Los vipéridos son tradicionalmente considerados como la familia de serpientes más “avanzada” (Mattison, 1995), pero de acuerdo a las filogenias recientes revisadas aquí (Kelly *et al.*, 2003; Slowinski & Lawson, 2002; Vidal & Hedges, 2002), aparecen siempre como la familia más basal dentro de Colubroidea. Parecen a haber evolucionado después de que Australia se separara del resto de Gondwana, por lo cual no se encuentran en este continente. En el resto del mundo tienen una distribución más amplia, incluyendo la serpiente que vive a más altura (Himalayas). Los colmillos de los vipéridos están articulados, de modo que pueden ser retraídos cuando no están en uso (solenoglifos, definido más adelante). Según Pough *et al.* (1999) los vipéridos son predadores que esperan y emboscan a su presa (sit and wait predators). Un grupo de vipéridos de América y partes de Asia ha desarrollado un par de focetas (pits) termorreceptoras entre los ojos y las narinas por lo cual son conocidos como “pit vipers”. Estas focetas son estructuralmente diferentes a las de los Boidos por lo cual se concluye que han evolucionado independientemente (Mattison, 1995). Otro grupo de vipéridos Americanos son fácilmente reconocibles por el cascabel en sus colas (serpientes cascabel). Dentro de la filogenia molecular de Caenophidia de Kelly *et al.* (2003) y en línea con lo que se reconoce formalmente (Vidal, 2002) se recuperaron cuatro subfamilias vipéridas, una de ellas polifilética (entre comillas): Crotalinae (*Crotalus*, *Agkistrodon*), Azemiophinae, “Viperinae” y Causinae (*Causus*). Sin embargo este último género puede ser considerado como un viperino (según NCBI), caso en el cual la filogenia de Kelly *et al.* (2003) estaría reconociendo tres

subfamilias monofiléticas (Crotalinae, Azemiophinae y Viperinae) dentro de un Viperidae monofilético también.

Para concluir los comentarios sobre la sistemática de serpientes, se debe aclarar que aunque la filogenia aquí mostrada sigue los estudios revisados, particularmente los moleculares (Heise *et al.*, 1995; Kelly *et al.*, 2003; Vidal & Hedges, 2002; Slowinski & Lawson, 2002), por simpleza, tradicionalidad y conveniencia y como ya se ha venido discutiendo, se incluyeron en la figura 1 familias que formalmente son reconocidas, pero que en algunos estos estudios fueron detectadas preliminarmente como poli- y/o parafiléticas. Este es el caso por ejemplo de Boidae y sobre todo de “Colubridae” [Fry & Wüster (2004) reconocen que siguen usando este término por conveniencia], familia que ha sido reciente y ampliamente reconocida como parafilética, no solo por las filogenias moleculares revisadas aquí (Kelly *et al.*, 2003) sino por las revisiones de evolución de venenos de serpientes de Fry *et al.* (2003), Kardong (2002) & Vidal (2002). Es por eso que aquí siempre se ha puesto esta familia dentro de comillas. Con base en los estudios moleculares revisados (Kelly *et al.*, 2003; Vidal & Hedges, 2002; Slowinski & Lawson, 2002), se podría decir que en el futuro cercano se reconocerán formalmente dos grupos monofiléticos principales dentro de Colubroidea: Viperidae y Colubridae-Elapidae (incluyendo Atractaspidae).

1.3 Evolución del veneno de serpientes: Aunque ya no son utilizados como caracteres filogenéticos formales (Lee & Scanlon, 2002; Vidal, 2002), pues representan clasificaciones descriptivas a las cuales diferentes linajes han llegado por evolución convergente (Pough *et al.*, 1999), a la hora de hablar de evolución de ofidios y sus venenos, es importante repasar las categorías en que se clasifican las serpientes según las características de su dentición maxilar (basado en Lee & Scanlon, 2002; Pough *et al.*, 1999, Vidal, 2002):

- Aglifas: Ausencia de dientes maxilares con surcos. Algunos “colúbridos” presentan esta condición (Vidal, 2002).
- Opistoglifas (opisto = atrás, glifo = hueco): Serpientes que tienen uno o más dientes alargados (colmillos) en la parte de atrás de la maxila con dientes más pequeños en el frente. Estos colmillos pueden tener un surco que ayude a conducir el veneno a la herida de la víctima. Algunos “colúbridos” tienen este tipo de configuración (Fry & Wüster, 2004).
- Proteroglifas (proto = primero): Incluyen elápidos como cobras, mambas, serpientes coral y serpientes

marinas. De hecho **Vidal** (2002) dice que todos los elápidos presentan proteroglia, la cual se caracteriza por colmillos huecos permanentemente erectos y relativamente pequeños ubicados en el frente de la maxila y seguidos de dientes más pequeños.

- Solenoglifas (solen = tubería): A este tipo pertenecen los vipéridos. En estas serpientes los colmillos huecos son los únicos dientes de la maxila y rotan de modo que pueden ser “guardados” en el techo de la boca cuando no están en uso. Esto les permite tener colmillos largos que inyectan el veneno profundamente en la víctima. Por poseer este tipo de aparato venenoso, que se considera el más complejo, es que antes los vipéridos eran referidos como la familia de serpientes “más avanzada” (**Vidal**, 2002), sin embargo, y como ya se dijo, los vipéridos se ubican actualmente en la base del árbol colubroideo. El género *Atractaspis* (Atractaspididae) también tienen un aparato solenoglifo, pero no es homólogo al de los vipéridos (**Vidal**, 2002).

Estas últimas observaciones, junto con las “sorpresas” y relaciones filogenéticas no resueltas entre colubroideos, son usadas por **Vidal** (2002) para atacar la antigua visión de que las serpientes venenosas estaban evolucionando de forma lineal de sistemas aglifo-opistoglifos “colúbridos” a la solenoglifia vipérida; pues las diferentes configuraciones de la dentadura maxilar han aparecido y desaparecido varias veces de forma independiente en grupos de colubroideos con posiciones más o menos derivadas en el árbol de este grupo. De todo lo repasado hasta ahora se concluye entonces de que la evolución de los colubroideos y sus sistemas de veneno es algo mucho más complejo que una secuencia lineal donde se aumenta progresivamente la complejidad y letalidad de estos sistemas. Como ejemplo de esto, hay que tener en cuenta que la solenoglifia, configuración de la dentadura maxilar que tradicionalmente ha sido vista como la más sofisticada, es típica de los vipéridos, los cuales han resultado estar ubicados en la posición más basal de árbol filogenético colubroideo, gracias a los más recientes estudios moleculares (**Heise et al.**, 1995; **Kelly et al.**, 2003; **Vidal & Hedges**, 2002; **Slowinski & Lawson**, 2002).

Kardong (1996) llama la atención sobre la ligereza con que se escribe sobre venenos de serpientes y su evolución. Hace un llamado a diferenciar entre roles biológicos (observables en la naturaleza) y propiedades (observables en el laboratorio) de las secreciones para no llegar a denotar una sustancia erróneamente como veneno, solo por sus efectos clínicos. Por ejemplo, si se inyec-

ta saliva humana a una persona, esta sufrirá localmente de edema, dolor, eritema y alteraciones funcionales, signos clínicos típicos de un envenenamiento, pero será que por esto se puede decir que *Homo sapiens* es una especie venenosa (**Kardong**, 1996, 2002)? Dentro de estas críticas, llama la atención sobre la adopción de significados más estrictos. Para venenos cita: “Es una sustancia tóxica producida por una planta o animal en un altamente especializado órgano o grupo de células, y la cual es desplegada durante el acto de morder o picar” (**Russell**, 1980 citado por **Kardong**, 1996). En este sentido dice que hay varios grupos animales que independientemente han evolucionado sistemas venenosos, con una variada gama de roles adaptativos como la inmovilización, paralización, muerte o liquificación de la presa o adversario; usando estructuras ponzoñosas, dientes o espinas, y desplegando estos venenos por medio de comportamientos pasivos (como esperar a que la presa o adversario pase sobre espinas venenosas esparcidas) o activas (morder o picar a la presa o adversario). Es importante clarificar estos conceptos antes de hablar de evolución de venenos en serpientes.

El único grupo de serpientes venenosas son entonces los colubroideos, al principio de cuya radiación en el período Cretácico hace 60 a 100 ma, evolucionaron las glándulas productoras de veneno (**Fry et al.**, 2003; **Fry** 2005; **Fry & Wüster**, 2004; **Vidal**, 2002); por lo cual la anteriormente llamada “glándula de Duvernoy” de los colúbridos [nombrada así en honor del Anatomista Francés que hizo su primera descripción en 1832 (**Chiszar & Smith**, 2002)] es homóloga a las glándulas de veneno del resto de colubroideos. La evolución de venenos que pudieran ayudar a matar y digerir presas sin forcejear (**Pérez & Sánchez**, 1999), pudo haber sido una característica clave que les permitió a los colubroideos liberarse de las limitantes morfofuncionales de matar por medio de constricción [**Pough et al.** (1999): músculos estranguladores que limitan la velocidad de locomoción] y poder así diversificarse y especializarse para la rápida locomoción en los habitats abiertos típicos del Mioceno (22 ma; **Pough et al.**, 1999), época en la cual la diversidad de colubroideos se hace patente (**Mattison**, 1995). **Kardong** (1996) no está de acuerdo con la homología entre la glándula de Duvernoy de colúbridos por un lado, y vipéridos y elápidos por otro, pues la de estos dos últimos dos grupos, son accionadas por músculos estriados especializados de las maxilas derivados de aductores mandibulares, tienen reservorio grande con veneno listo para ser usado, y tienen conductos conectados a colmillos huecos (proteroglia y solenoglifia) que inyectan los venenos profundamente en la víctima (**Kardong**, 2002). **Kardong** (1996, 2002) dice que el rol biológico del veneno de los colúbridos es controlar a la presa y el del

veneno de elápidos y vipéridos es matar rápidamente. Las críticas de **Kardong** (1996) no paran allí. Dice que es muy común pensar que los venenos de serpientes evolucionaron como adaptaciones predatorias, que empezaron siendo poco venenosas para llegar a ser muy venenosas en algunas especies. Critica esta postura dentro de su llamado a ser estrictos a la hora de hablar de venenos de serpientes, y a diferenciar, no solo entre roles y propiedades de secreciones, sino también entre diferentes roles biológicos; y dice que los sistemas venenosos en colúbridos tienen diferente rol que el del resto de colubroideos, para con todo esto criticar la postura de la mayoría de autores. Sin embargo, teniendo en cuenta que es muy posible que los venenos de serpientes sean secreciones digestivas modificadas (posiblemente pancreáticas: **Fry**, 2005; **Vidal**, 2002), y los demás datos repasados hasta ahora (como el hecho de que entre las serpientes actuales las mayores tendencias evolutivas tienen que ver con alimentación) es más parsimonioso pensar lo que ha se ha sostenido aquí, y es que los sistemas de veneno de serpientes son una sinapomorfia (carácter derivado compartido) de los cenofidios, más exactamente de los colubroideos, que se derivó de características pre-existentes del sistema digestivo y que ha alcanzado composición química y grados de morbilidad, toxicidad, mortalidad y métodos de entrega al adversario variables entre los diferentes miembros de este grupo de serpientes. Entonces es esta la postura más aceptada (**Pough et al.**, 1999; **Fry**, 2005; **Fry & Wüster**, 2004; **Vidal**, 2002), es decir la homología de los sistemas venenosos en la base de radiación Colubroidea. En una publicación posterior, **Kardong** (2002) sigue defendiendo la saludable necesidad de rigurosidad en los conceptos a la hora de hablar de evolución de venenos de serpientes, pero reconoce la homología (sin olvidar las diferencias repasadas) entre la glándula de Duvernoy de los “colúbridos” y la glándula de veneno de las serpientes “verdaderamente venenosas”: Elapidae y Viperidae. Entonces, a diferencia de estas últimas familias, y resumiendo a **Kardong** (2002) los argumentos para no calificar a los colúbridos como serpientes verdaderamente venenosas es que su aparato venenoso no está tan especializado para inyectar el veneno rápida y profundamente, sus venenos carecen de algunas propiedades enzimáticas de los verdaderos venenos, la mayoría de secreciones de glándula de Duvernoy no tienen Fosfolipasas A₂ (PLA₂) y además no tienen el rol biológico de matar rápidamente al adversario. Sin embargo el mismo **Kardong** (2002) nombra excepciones a esto, pues los géneros colúbridos *Dispholidus*, *Rhabdophis*, *Philodryas* y *Thelotornis* quienes poseen glándula de Duvernoy, producen venenos que matan rápidamente a la presa, y que incluso han producido muertes humanas cuando serpientes de estos géneros muerden para defenderse. En este artículo entonces, **Kardong**

(2002) hace un excelente repaso sobre la evolución y funciones de los venenos de serpientes, y muestra una posición más en línea con el resto de autores repasados aquí.

El resultado práctico de todo esto es que los colubroideos no colúbridos han sido más estudiados que estos últimos (**Fry et al.**, 2003), lo cual podría ser médicamente aceptable por la mayor venenosidad de elápidos y vipéridos. Sin embargo, como tácitamente lo advierten (**Fry et al.**, 2003), dado que “Colubridae” es un agrupamiento artificial, contiene especies que tradicionalmente no han sido estudiadas por ser tomados como colúbridos poco peligrosos, pero que en la realidad pueden ser especies que tengan una relación filogenética más estrecha con especies vipéridas y elápidas “verdadera y peligrosamente venenosas”, que con otros “colúbridos”. Así se puede estar dejando de estudiar especies con toxinas interesantes, solo por el hecho de estar erróneamente clasificadas como “colúbridos”. Lo anterior desde un punto de vista médico, porque de cualquier forma, este sesgo investigativo es inaceptable desde el punto de vista estrictamente biológico, máxime cuando los “colúbridos” forman la gran mayoría de colubroideos y sus relaciones filogenéticas moleculares y sus “venenos” han sido poco estudiados (**Fry et al.**, 20003; **Fry & Wüster**, 2004; **Gutiérrez & Sasa**, 2002; **Vidal**, 2002).

En todas estas discusiones sobre la evolución de los sistemas de veneno en las serpientes, los mismos venenos no son tenidos en cuenta muchas veces (**Fry & Wüster**, 2004). Según los mismos autores, las toxinas encontradas en venenos de serpientes se derivan de proteínas que son reclutadas al arsenal químico de la serpiente, y aunque sufren modificaciones, conservan su motivo molecular original. Esto permite estudiar filogenéticamente los componentes de un veneno y contrastar estos datos con la filogenia de la especie, para así llegar a conclusiones sobre la evolución del veneno. El trabajo de estos autores (**Fry & Wüster**, 2004) muestra que varias familias de toxinas fueron reclutadas por los sistemas venenosos de serpientes antes de la diversificación de los existentes linajes de serpientes colubroideas. Esto se confirmó para cinco de las ocho familias de toxinas analizadas (inhibidores de proteasas tipo Kunitz, toxinas CRISP, GBL y NGF, Peptidasas M12B). Sin embargo **Fry** (2005) dice que CRISP (presentes en varios grupos animales incluidos venenos alergénicos de insectos y moléculas antifúngicas en plantas) y Kallikreina (familia presente en secreciones de varios tejidos, incluida la saliva humana) pueden ser proteínas que ya estaban presentes en los tejidos salivares que dieron origen a la glándula de veneno, dado que estas proteínas también están presentes en los sistemas vene-

nosos (no homólogos a los de las serpientes) de lagartos helodermátidos y que el último ancestro común de estos dos grupos era un lagarto varanoideo basal sin características venenosas. Por lo cual en estos dos casos (CRISP y Kallikreina) no se podría hablar de reclutamiento (Fry, 2005).

En el caso de las PLA₂s es claro que hubo al menos dos eventos de reclutamiento, lo que resultó en que los elápidos posean PLA₂s de la clase I de tipo pancreático (I PLA₂s) mientras que los vipéridos secreten II PLA₂s que son de tipo sinovial (la clasificación de las PLA₂s será ampliamente revisada mas adelante), todo lo cual confirma que estas toxinas evolucionaron independientemente y homoplásicamente (convergentemente) en estas dos familias de serpientes colubroideas (Fry & Wüster, 2004). Proteínas tipo lectina fueron reclutadas al menos dos veces también: las GBL en la base del árbol colubroideo y las lectinas tipo C después por los vipéridos, lo que resultó en que esta familia tenga ambas toxinas de tipo lectina. Un caso parecido fue hallado para las toxinas natriuréticas, en las cuales un tipo (ANP/BNP) fue reclutado al principio de la radiación colubroidea, mientras que el otro: CNP [también presente en el veneno del ornitorrinco (Mammalia: *Platypus*)] lo fue exclusivamente después por los vipéridos. La toxina CNP de los vipéridos es altamente conservada, tanto que la secuencia de esta toxina extraída de las glándulas venenosas del vipérido *Bothrops jararaca* resultó ser virtualmente idéntica a un transcrito cerebral de la misma especie. Otra familia de toxinas reclutada por los vipéridos después de su divergencia de los demás linajes colubroideos son las toxinas de tres dedos (3FTxs). Estos datos según Fry & Wüster (2004) demuestran que el último ancestro común de los colubroideos ya poseía un complejo veneno compuesto por al menos cinco de las familias de toxinas hoy compartidas por elápidos y vipéridos. Después de esto, cada linaje de colubroideos empezó independientemente a reclutar otras familias de proteínas. Como ejemplos adicionales de esto, las sarafotoxinas son exclusivas de atractaspídidos. Exclusivos de elápidos son la acetilcolinesterasa, factor venenoso de cobras, factor Xa, toxinas activadoras de protrombina, factor V, péptido tipo prokinectina, wapinas, y toxinas con dominio SPRY. Además de las familias reclutadas exclusivamente por vipéridos ya nombradas, los venenos de esta familia también son los únicos en contener: péptidos miotóxicos, peptidasas S1, toxinas tipo factor de crecimiento vascular y waglerinas.

Según los mismos autores (Fry & Wüster, 2004), la falta de toxinas de colúbridos bien caracterizadas (Gutiérrez & Sasa, 2002), le quita fuerza probatoria a su

hipótesis sobre la evolución del veneno de serpientes. Sin embargo, dado la cercanía (y casi imposible delimitación de acuerdo a las filogenias moleculares revisadas) entre “Colubridae” y Elapidae, es muy posible que las toxinas que hasta ahora se creen exclusivas de la última familia, también estén presentes en la primera (“Colubridae”). En un estudio posterior del mismo grupo (Fry, 2005) se amplian estos resultados utilizando el mismo enfoque (contraste de filogenias de las serpientes colubroideas vs. filogenias de familias selectas de toxinas). Dado que se ha postulado el origen evolutivo pancreático de las secreciones venenosas de las serpientes, se creía que el análisis de sus toxinas iba a revelar un origen parecido de las mismas. Sin embargo el estudio de Fry (2005) reveló que este no es el caso, pues se encontró que los sistemas venenosos de las serpientes han reclutado proteínas de diversos tejidos, sin ningún patrón aparente, excepto en que todas las proteínas reclutadas eran secretorias. Además se encontró que aquellas que tuvieran extensivo enlazamiento cruzado de cisteínas han sido más reclutadas, y además son las que mas se han diversificado en familias multigénicas de toxinas, lo cual se podría explicar por la estabilidad molecular que brinda este tipo de estructura, permitiendo esto “la experimentación evolutiva” en ciertos residuos, sin perder la estabilidad estructural global y conformacional 3D de la proteína; esto no sería posible por ejemplo en proteínas globulares sin enlaces covalentes, en las cuales el cambio de un solo residuo puede destabilizar completamente la estructura 3D, inutilizándola. Este sesgo hacia proteínas con enlaces cisteína, en el reclutamiento de toxinas de serpientes, también ha sido observado en los venenos de otros grupos animales (Fry, 2005).

De los estudios de este grupo (Fry & Wüster, 2004; Fry, 2005) y de los de otro grupo (Deshimaru *et al.*, 1996; Ohno *et al.*, 2003), se concluye entonces que los venenos de serpientes evolucionaron por duplicación de genes y reclutamiento de éstos como toxinas, con la subsiguiente diversificación y atípica evolución exónica acelerada de las “proteínas hijas” en los diferentes linajes, conservando estas su estructura tridimensional, gracias enlaces cisteínicos, y adquiriendo funciones diferentes por medio del reemplazo de residuos puntuales, como será ampliado mas adelante para el caso de las PLA₂s. Estos estudios (Fry, 2005; Fry & Wüster, 2004) concluyen invitando a hacer más investigación en este campo [particularmente y como ya se dijo, en los “colúbridos”, cuyos venenos no han sido tan investigados por no ser tan letales como los de elápidos y vipéridos (Gutiérrez & Sasa, 2002)] pues con respecto a venenos de serpientes faltan muchas preguntas de tipo evolutivo en ser respondidas.

Uno de los componentes más importantes de los venenos de serpientes son las PLA₂s. La evolución de estas moléculas fue revisada por **Ohno et al.** (2003), quienes dicen, como es común en otros grupos de proteínas, que las PLA₂ se originaron por duplicación de genes a partir de un gen ancestral. Cada gen “hijo”, liberado de la selección conservadora sobre la función ancestral, fue adquiriendo nuevas funciones. Estos grupos (**Deshimaru et al.**, 1996; **Ohno et al.**, 2003) dicen que apartir análisis genéticos queda claro que las PLA₂s han evolucionado de una manera acelerada, adquiriendo sus diferentes isoformas efectos diferentes (miotóxicos, neurotóxicos, edematogénicos, etc., siendo lógicamente el efecto miotóxico el principal y más común de las PLA₂s venenosas de serpientes) por medio del reemplazo evolutivo de ciertos aminoácidos y con la conservación de la misma estructura 3D. Esto podría estar relacionado, al menos en parte, con una observación curiosa. En la mayoría de genes, los intrones son mas variables que los exones (parte que contiene la información de la proteína), pero Ohno et al. (2003) encontraron que para las PLA₂s sucede lo contrario, lo cual no puede ser explicada por la extendida teoría neutral de la evolución molecular de Kimura (Kimura, 1983 citado por **Ohno et al.**, 2003), pues entre otras cosas, la tasa de sustitución no-sinónima en las regiones codificantes de proteína (exones) son iguales o mayores a las sinónimas (neutras). Además, esta evolución acelerada de las PLA₂s se confirmó con análisis moleculares comparativos que demostraron que los exones están evolucionando más rápido que los intrones, y que estos últimos están evolucionando a tasas similares a genes comunes. Estos análisis comparativos incluyeron a PLA₂s de mamíferos (y por lo tanto no venenosas) las cuales no mostraron señas de estar sufriendo evolución acelerada. Esta evolución acelerada no sería exclusiva de las PLA₂s ofídicas, pues otros componentes del veneno de serpientes muestran esta tendencia también, como por ejemplo las lectinas tipo C (**Ohno et al.**, 2003) y serin-proteasas (**Deshimaru et al.**, 1996) de vipéridos. Este grupo concluye entonces que el mecanismo como se ha producido la diversidad de PLA₂s venenosas de serpientes (y de otros componentes de estos venenos) es por medio de selección natural de mutaciones puntuales, y no por conversión génica (**Deshimaru et al.**, 1996; **Ohno et al.**, 2003).

1.4. Componentes de los venenos de serpientes: Los venenos de serpientes son secreciones de naturaleza seromucosa que de forma muy general y atendiendo criterios fármaco-cinéticos, se pueden clasificar en toxinas o enzimas (**Chippaux & Goyffon**, 1998; **Pérez & Sánchez**, 1999), haciendo la salvedad y como expodrá mas ade-

lante, que hay componentes de venenos que muestran ambos tipos de actividad:

Toxinas: Son proteínas de peso molecular variable, generalmente menos de 30kDa, que tienen como blancos, a receptores específicos de membranas celulares. Su especificidad puede ser neurológica, cardiovascular, muscular o no diferenciada de acuerdo a la distribución de sus receptores diana. Su efecto farmacológico es proporcional a la cantidad de toxina introducida, es decir son dependientes de la dosis. Los venenos de elápidos son ricos en toxinas (**Chippaux & Goyffon**, 1998).

Enzimas: Son abundantes en vipéridos, también son proteínas pero sus pesos moleculares son generalmente mayores a los de las toxinas. Sus propiedades catálicas (lo cual las diferencia de las toxinas) tienen dos efectos principales. Primero, su producto de degradación, así sea tóxico, no tiene, en principio, propiedades inmunogénicas para el organismo envenenado. Segundo, sus efectos farmacológicos dependen más del tiempo que de la dosis (**Chippaux & Goyffon**, 1998).

En una clasificación menos general y siguiendo a los mismos autores (**Chippaux & Goyffon**, 1998) las sustancias presentes en los venenos de serpientes se pueden dividir en:

- **Neuro- y/o Mio-Toxinas:** Las más importantes son las neurotoxinas pre-sinápticas con actividad fosfolipásica y las neuro-toxinas post-sinápticas parecidas al curaré.
- **Toxinas** que se acoplan de receptores membranales induciendo citolisis.
- **Hemorraginas (SVMPs):** Causan daño a endotelios vasculares.
- **Factores** que influyen la coagulación sanguínea: Son numerosos pero la mayoría son enzimas que convierten el fibrinógeno en fibrino-péptidos.
- **Enzimas:** Tienen estructura y actividad variadas pero generalmente muestran menos toxicidad que las neuro-toxinas.

Por ser los componentes más importantes de los venenos de serpientes, y por ser los inhibidos por las proteínas antiveneno de serpientes de mamíferos (**Neves-Ferreira et al.**, 2002) a ser ampliadas aquí mas adelante, se procede a ampliar las Miotoxinas y Hemorraginas.

1.4.1. Hemorraginas (SVMPs): Las proteasas en general se clasifican en serin-proteasas, cistein-proteasas,

aspartato-proteasas y metalo-proteasas (Gutiérrez & Rucavado, 2000; Matsui *et al.*, 2000; Pérez & Sánchez, 1999). Las metaloproteasas se dividen a su vez en las familias: astacinas, serralisinas y matrixinas. Las SVMPs se clasifican entonces en la familia astacinas, subfamilia reprotisinas o adamalisinas (Neves-Ferreira *et al.*, 2000; Perales & Domont, 2002). Esta subfamilia también incluye a las proteínas ADAM también conocidas como MDC, las cuales generalmente son proteínas integrales membranales multidominio que muestran alrededor de un 25% de indentidad secuencial con las SVMP y participan en procesos como la fertilización y neurogénesis (Jia *et al.*, 1996; Neves-Ferreira *et al.*, 2002; Perales & Domont, 2002). Las reprotisinas (SVMPs y ADAMs) comparten con metaloproteasas matriciales una topología general conservada, un motivo consenso para el enlazamiento de zinc y una metionina estrictamente conservada cerca de los sitios activos. Por todo esto las reprotisinas son clasificadas también como metzincinas (Neves-Ferreira *et al.*, 2002; Matsui *et al.*, 2000). Dependiendo de la estructura de su dominio (proteasa, tipo desintegrina, rico en cisteína y/o tipo lectina) las SVMPs se clasifican en tipo PI a PIV (Gutiérrez & Rucavado, 2000; Jia *et al.*, 1996; Neves-Ferreira *et al.*, 2000; Neves-Ferreira *et al.*, 2002). Las PI presentan solamente el dominio proteasa. Las PII tienen un dominio tipo desintegrina en ubicación carboxi-terminal con respecto al dominio proteasa. Las PIII tienen, después de los dos anteriores, un dominio rico en cisteínas. Las PIV, adicionalmente a los dominios anteriores, tienen un dominio tipo lectina en posición carboxiterminal (Neves-Ferreira *et al.*, 2002; Perales & Domont, 2002).

Entonces las SVMP son zinc-metaloproteasas, que constituyen importantes componentes del veneno de la mayoría de vipéridos (Bjarnason & Fox, 1994; Kamiguti *et al.*, 1998), y que actuando con alta especificidad por su sustrato (tejido conectivo, componentes de membranas basales y matrices extracelulares que rodean a vasos sanguíneos pequeños; Bjarnason & Fox, 1994; Kamiguti *et al.*, 1996; Matsui *et al.*, 2000), afectan la interacción entre las membranas basales y las células endoteliales (Gutiérrez & Rucavado, 2000) y producen la extravasación de contenido capilar (Gutiérrez & Rucavado, 2000; Neves-Ferreira *et al.* 1997; Neves-Ferreira *et al.*, 2000; Perales & Domoni, 2002). Las SVMP pueden degradar fibrinógeno, fibronectina, laminina, colágeno IV (no colágeno I, II y V), gelatininas de colágeno y nidógeno (Perales & Domont, 2002). Además de esto las SVMP afectan la coagulación (Bjarnason & Fox, 1994) y adicionalmente producen mionecrosis, inflamación y edema secundarios a la hemorragia. Existe una amplia varie-

dad de SVMP en serpientes, debido a la variedad de dominios presentes en cada una de ellas, con efectos particulares también variados (Bjarnason & Fox, 1994).

El párrafo anterior estaría mostrando un panorama en el cual las SVMPs estarían produciendo principalmente hemorragia local. Sin embargo, dados, entre otros, sus efectos anticoagulantes esto no es del todo cierto. Kamiguti *et al.* (1996) dicen que los venenos de vipéridos producen, entre otras cosas, hemorragia local y sistémica; y para probar el papel en esto de las SVMPs examinan los efectos de una de las hemorraginas más nombradas en la literatura sobre venenos de serpientes, la jararagina de *Bothrops jararaca* (Viperidae), sobre las plaquetas y el sistema plasmático homeostático de la víctima. Según los mismos autores (Kamaguti *et al.*, 1996) la jararagina es una SVMP de alto peso molecular que causa la pérdida del receptor colágeno $\alpha 2\beta 1$ integrina de las plaquetas (para lo cual serían críticos los dominios desintegrina de la SVMP) y degrada el factor proteínico de adhesión plasmática de von Willebrand (Matsui *et al.*, 2000). La alteración de estos elementos confirma que las SVMP además de causar hemorragia local, también lo hacen a nivel sistémico (Kamaguti *et al.*, 1996).

Las metaloproteasas también son llamadas por Pérez & Sánchez (1999) matrix metaloproteasas (MMP) y sus inhibidores (Tissue Inhibitors of Metaloproteases; TIMP). Estas moléculas existen endógenamente y están implicadas en varios procesos fisiológicos normales, como la embrión-morfo-génesis; cuando se rompe el balance entre ellas se producen varias enfermedades como artritis, diabetes, neoplasias, arterioesclerosis, y condiciones oftálmicas, periodontales, y ortopédicas. El ataque por parte de SMVP estaría rompiendo el equilibrio entre metaloproteasas y sus inhibidores (Pérez & Sánchez, 1999), como lo sugieren Biardi *et al.* (2000) en su estudio de las capacidades antiveneno del suero de ardillas (Mammalia: Rodentia: Sciuridae: *Spermophilus*) en el cual en contraron indicios de las SVMP pueden aumentar la actividad de las metaloproteasas endógenas de la presa, para maximizar así los efectos hemorrágicos. Este desbalance explicaría porque algunas manifestaciones del envenamiento por serpientes, tienen rasgos comunes con las enfermedades acabadas de mencionar. Todo esto hace de los estudios de las SVMPs y de las metaloproteasas en general, un objetivo muy importante para el desarrollo de inhibidores que puedan contrarrestar estos efectos de los venenos de serpientes (Gutiérrez & Rucavado, 2000), además de su potencial uso en aplicaciones médicas en problemas tipo trombosis (Matsui *et al.*, 2000), y de otros tipos ya nombrados (Pérez & Sánchez, 1999).

1.4.2. Miotoxinas: Al menos tres grupos de componentes de venenos de serpientes se sabe que producen efectos miotóxicos directos (Figura 2; **Gutiérrez & Ownby 2003; Lizano et al., 2003; Lomonte et al., 2003; Rocha et al., 2002**):

a) Miotoxinas Pequeñas: Polipéptidos de cadena simple altamente básicos de 42 a 45 aminoácidos vinculados cruzadamente por tres puentes disulfuro, tales como la miotoxina a y crotaminas, las cuales no son enzimáticamente activas y se encuentran típicamente en vipéridos como *Crotalus* y *Sistrurus*.

c) Cardiotoxinas: Polipéptidos básicos presentes en algunos elápidos como *Naja naja atra*, la cobra Taiwanesa. Estas proteínas son del tipo 3FTx, contienen 60 aminoácidos y 4 enlaces disulfuro (Yu, 1998).

c) Fosfolipasas A₂ (PLA₂s): No son exclusivas de los venenos de serpientes y se clasifican en tres clases principales (**Ohno et al., 2003; Okumura et al., 2002; Okumura et al., 1999; Ownby et al. 1998**): Las I PLA₂s presentes en los venenos de elápidos. Son altamente tóxicas y además de efectos miotóxicos, también tienen actividad neurotóxica (**Lomonte et al., 2003; Murakami & Arni, 2003**). Las II PLA₂ se encuentran en vipéridos y tienen actividad miotóxica. Y aunque no están presentes en serpientes, hay que mencionar las III PLA₂, típicas del veneno de abejas (**Ownby et al. 1998**). Para entender mejor la clasificación de las miotoxinas de venenos de serpientes, se incluye el siguiente esquema (Figura 2).

1.4.2.1. Fosfolipasas A₂ (PLA₂s): Son una gran familia de proteínas que tienen funciones moleculares parecidas y muestran homología considerable (**Soares et al., 2003**). Han sido encontradas principalmente en venenos de serpientes y tejidos de mamíferos, en los cuales están involucradas en diversas funciones normales y en patologías como reuma-

tismo, osteoartritis, asma, psoriasis y choque séptico. Las PLA₂s son moléculas que hidrolizan el enlace acil-éster en la posición sn2-acil de glicerofosfolípidos liberando 3-sn-lisofosfoglicéridos y ácidos grasos (**Ohno et al., 2003; Okumura et al., 2002; Okumura et al., 1999; Ownby et al. 1998; Perales & Domont, 2002**). Además de sus efectos miotóxicos, ciertas isoenzimas de PLA₂s pueden presentar efectos neurotóxicos, anticoagulantes, edematogénicos y/o cardiotoxicos (**Deshimaru et al., 1996; Ohno et al., 2003**). Estos efectos no solo dependen de las propiedades de la PLA₂, sino también de la presencia de receptores específicos o aceptores de estas proteínas en las células diana (**Perales & Domont, 2002**). Estos receptores pueden agruparse en dos tipos principales: M (muscular) y N (neuronal). Las PLA₂s no son exclusivas de los venenos y se clasifican en tres clases principales de acuerdo a su estructura primaria, en el modo de los apareamientos disulfuro, requerimientos de calcio y localización celular (**Ohno et al., 2003; Perales & Domont, 2002; ver Figura 2**):

I PLA₂s: Son estructuralmente similares a las PLA₂ pancreáticas secretadas presentes en mamíferos. Esta clase también incluye a las PLA₂s presentes en espermatozoides humanos. En cuanto a serpientes están presentes en los venenos de elápidos (Elapinae e Hydrophiinae: **Ohno et al., 2003; Perales & Domont, 2002**). Son altamente tóxicas y además de efectos miotóxicos, también tienen actividad neurotóxica pre-sináptica (**Lomonte et al., 2003; Murakami & Arni, 2003**).

II PLA₂s: Son estructuralmente similares a las PLA₂s secretorias-inflamatorias-no-pancreáticas o sinoviales (**Fry & Wüster, 2004**) encontradas en mamíferos. También se encuentran en plaquetas, mucosa gástrica y endotelio vascular. Los venenos de vipéridos contienen esta clase de PLA₂, la cual puede a su vez ser dividida en diferentes tipos de miotoxinas, principalmente por dife-

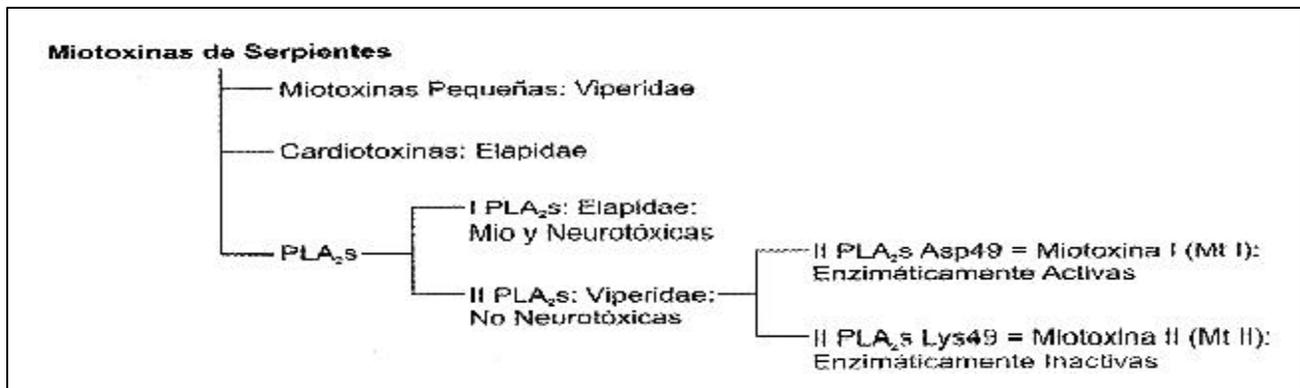


Figura 2. Clasificación de las miotoxinas de veneno de serpientes. Realizada con datos de Lomonte et al. (2003) y Ohno et al. (2003).

rencias aminoacídicas en la posición 49 (Ohno *et al.*, 2003). Son dos grupos principales: la miotoxina I (mtI) que contiene Asparagina en la posición 49 (Asp49) y la miotoxina II que tiene Lisina en la misma posición (Lys49), lo cual hace que tenga muy poca o ninguna actividad catalítica (Lizano *et al.*, 2003; Perales & Domont, 2002; Rocha *et al.*, 2002).

Las I y II PLA₂ constan de 118 a 124 aminoácidos y contienen 7 puentes disulfuro (Ohno *et al.*, 2003). Las II PLA₂ Lys 49 (mtII) han sido revisadas por Lomonte *et al.* (2003) dentro de lo cual cabe destacar que los estudios confirman que este grupo no tiene actividad enzimática en contraste a las II PLA₂ Asp49 (mtI). Las miotoxinas II son homodímeros que tienen dos conformaciones, abierto y cerrado, formando una especie de tenaza con dominios C-terminales a cada extremo. Estos dominios y particularmente su posiciones 115-129 parecen ser los sitios claves para su acción en contra de membranas biológicas, pues son ricos en residuos catiónicos e hidrofóbicos. Los dominios N-terminales parecen ayudar en el contacto de la proteína con la membrana. Las partes de la proteína que entran en contacto con la membrana a desconfigurar, están cargadas positivamente e interactúan con fosfolípidos cargados negativamente. Parece que las II PLA₂ Lys49 no necesitan la presencia de moléculasceptoras en las membranas, para atacar a las mismas. En contraste a las II PLA₂ Lys49, parece que las II PLA₂ Asp49 no utilizan su región C-terminal como un efector para hacer daño membranaral (Núñez *et al.*, 2001). Una de las proteínas antiveneno a ser ampliada aquí, DM64, es específica para las II PLA₂, teniendo máxima actividad en contra de la miotoxina II (II PLA₂ Lys49) según Rocha *et al.* (2002).

1.5. Factores antiveneno de serpientes: Las serpientes tienen en su sangre compuestos que inhiben sus propios venenos (Higashino *et al.*, 2002; Lizano *et al.*, 2003). Así como se ampliaron los dos componentes más importantes del veneno de serpientes, las Hemorragias (SVMPs) y Miotoxinas (PLA₂s), se ampliará hasta un nivel general, la información sobre los inhibidores de estas toxinas, encontradas en las propias serpientes:

1.5.1 Inhibidores de SVMPs (antihemorraginas) de serpientes: Pérez & Sánchez (1999) hacen una buena revisión sobre este tema, en la cual narran como los investigadores a principios de siglo creían que la inmunidad de las serpientes a sus venenos se debía a que carecían de receptores celulares a sus propios venenos, y años después se pensó que esta inmunidad se iba adquiriendo por mordeduras ocasionales entre congéneres. Hoy sabemos

que esta inmunidad se da por factores protectores de la sangre (Higashino *et al.*, 2002; Lizano *et al.*, 2003) que vienen codificados genéticamente. Así como los venenos varían interespecíficamente, las proteínas antiveneno veneno también varían, mostrando estas mayor actividad protectora entre más emparentada sea la serpiente de la cual proviene el veneno con que se están probando estas defensas (Pérez & Sánchez, 1999).

Dado que las SVMPs son importantes componentes en el veneno de vipéridos (Bjarnason & Fox, 1994; Kamiguti *et al.*, 1998), es en esta familia de serpientes donde más se han estudiado antihemorraginas ofídicas, como se puede concluir de la revisión de Pérez & Sánchez (1999). Por ejemplo Ovdia & Kochva (1977) estudiaron el factor antihemorrágico de *Vipera palaestinae* (Viperidae) y encontraron que este era una proteína termoestable con un peso molecular de 56kDa. Ovdia (1978) amplió este estudio, encontrando que este factor antihemorrágico de *Vipera palaestinae* efectivamente inhibe todos los efectos antihemorrágicos de su veneno, además de los venenos de otros dos vipéridos: *Echis colorata* y *Cerastes cerastes*. También se encontró que este factor tiene actividad de caseinasa y es digerible por tripsina. Es estable en temperaturas altas y pH de 6.0 a 9.5, siendo su punto isoeléctrico de 4.7 y un peso molecular de 80,000. Weissenberg *et al.* (1991) purificaron los factores antihemorrágicos de *Crotalus atrox* (Viperidae: Crotalinae), los cuales fueron capaces de inhibir los efectos hemorrágicos y proteolíticos del veneno de la misma especie. Estos factores protectores resultaron ser glicoproteínas ácidas estables hasta temperaturas de 85°C y a pH 1.3 a 11.5 por 30 minutos y con masas moleculares entre 65 y 80 kDa. El factor antihemorrágico de *Vipera palaestinae* (Ovdia, 1978) no formó líneas de precipitación en las pruebas de inmunodifusión de lo cual se concluyó que este factor no es una inmunoglobulina y más bien es una fracción tipo albúmina o a-globulina. Otros estudios sobre factores antihemorrágicos de vipéridos como *Crotalus*, *Vipera* y *Trimeresurus* dieron resultados similares a los ya repasados para *Vipera* y *Crotalus* (Pérez & Sánchez, 1999), de lo cual se concluyó que estos factores son superficialmente similares a los factores antihemorrágicos extraídos de mamíferos (Pérez & Sánchez, 1999; Ovdia, 1978). Sin embargo la gran mayoría de anti-hemorraginas de mamíferos conocidas hasta ahora pertenecen a la FSIG como las extraídas *Didelphis*, *Philander* y *Herpestes* (ampliadas en el aparte de mamíferos), y las extraídas de serpientes como la de *Trimeresurus flavoviridis* (Viperidae), pertenecen a la superfamilia de las cistaínas (Neves-Ferreira *et al.*, 1997), de lo cual es razonable concluir que las antihemorraginas

de mamíferos y serpientes han evolucionado por vías diferentes.

Para entender esta aparente contradicción, es aclarante el hecho de que **Perales & Domont** (2002) dicen que las anti-SVMP ya sean ofídicas o de mamíferos, se pueden clasificar por dos criterios: propiedades fisicoquímicas y por su secuencia aminoacídica. Por el primer criterio, las antihemorraginas se pueden clasificar en bajo (40 a 95 kDa) y alto (700 a 1090 kDa) pesos moleculares. Y por secuencias aminoacídicas se pueden afiliar a las siguientes familias de proteínas: Cistaína, FSIG y Lectina-P35-ficolina/opsonina. Así por criterios fisicoquímicos la mayoría de antihemorraginas son de bajo peso molecular, exceptuando la NtAH de la serpiente no venenosa *Natrix tessellata* (Colubridae). Esta antihemorragina tiene una masa molecular de 888 kDa, es un heterotrímero constituido por subunidades de 70, 100 y 150 kDa, presentes en proporciones todavía desconocidas (**Perales & Domont**, 2002). Las otras hemorraginas de alto peso molecular, son las de mamíferos “insectívoros” las cuales serán ampliadas en el aparte correspondiente. Hechas las comparaciones hasta aquí, se podría concluir que las antihemorraginas de mamíferos y serpientes son similares (pues la mayoría tienen pesos moleculares similarmente bajos), pero teniendo en cuenta homologías secuenciales, la mayoría de antihemorraginas de mamíferos pertenecen a la FSIG (exceptuando otra vez las de los “insectívoros” que pertenecen a la familia Lectina-P35-Ficolina/Opsonina) y la mayoría de anti-SVMP de serpientes (al menos de vipéridas) a la Familia de las Cistaínas, como el HSF de *Trimeresurus flavoviridis* y BJ46a de *Bothrops jararaca* (**Perales & Domont**, 2002).

1.5.2. Inhibidores de PLA₂s (PLIs) de serpientes: Los PLIs aislados de sangre de serpientes son glicoproteínas ácidas oligoméricas, con masas moleculares entre 75 y 180 kDa formadas por 3 a 6 subunidades de 20 a 50 kDa vinculadas por enlaces no-covalentes (**Perales & Domont**, 2002). Estas proteínas aparentemente son producidas en el hígado y se han clasificado en tres grupos de acuerdo a tres tipos de PLIs originalmente encontradas por **Ohkura et al.** (1997) en la serpiente Vipérida China *Agkistrodon blomhoffii*:

a) Las PLIs α: Son proteínas globulares compuestas de subunidades con pesos de 20-25kDa, 147 aminoácidos y un sitio de N-glicosilación. Forman estructuras de 3-6 subunidades asociadas no-convalentemente con masas reportadas entre 75-120 kDa (**Lizano et al.**, 2003; **Okumura et al.**, 2002). La característica típica de las PLIs α es la presencia de dominios C-tipo lectina (CTLDs) también

conocidos como motivos de reconocimiento de carbohidrato (CRDs). Estos dominios comprenden aproximadamente el 67% de cada subunidad y están cerca de la porción N-terminal, la cual juega un papel muy importante en el acoplamiento de una PLIα a la PLA a inhibir (**Nobuhisa et al.**, 1998). Son típicas de los vipéridos (**Kogaki et al.**, 1989; **Lizano et al.**, 1997; **Lizano et al.**, 2000; **Ohkura et al.**, 1993; **Soares et al.**, 2003) y son específicas para las II PLA₂s ácidas (**Okumura et al.**, 1999).

b) PLIs β: Son proteínas globulares de 160kDa compuestas de 3 subunidades de aproximadamente 50kDa y 308 aminoácidos y 4 sitios de glicosilación por subunidad. Lo más característico de las PLIs β es la presencia de 9 repeticiones ricas en Leucina (LRRs), cada una de 24 aminoácidos de largo y comprendiendo el 67% de cada subunidad (**Lizano et al.**, 2003; **Okumura et al.**, 2002; **Perales & Domont**, 2002). Las PLIs β son específicas para las II PLA₂ básicas (**Okumura et al.**, 1999) y son típicas de vipéridos (**Okumura et al.**, 1998) aunque también han sido encontradas en *Elaphe quadrigata*, un colúbrido (**Okumura et al.**, 2002).

c) PLIs γ: Se caracterizan por tener motivos estructurales de tres dedos, constituidos por dos patrones en tandem de residuos de cisteína (**Perales & Domont**, 2002). Estos motivos se encuentran en proteínas tan diversas como la superfamilia Ly-6 (Ly-6A/E, Ly-6C, Thb y CD59), el receptor activador de plasminogeno tipo urokinasa (UPAR) y las α-neurotoxinas de veneno de serpientes (**Lizano et al.**, 2003; **Ohkura et al.**, 1994a). Las PLIs γ son proteínas de 90 kDa compuestas de subunidades de 25 a 30 kDa. Cada una de estas subunidades presenta dos (two three finger) de los motivos estructurales mencionados (**Okumura et al.**, 2002), de los cuales uno juega un papel muy importante en el acoplamiento de estas PLIs a las PLAs que inhiben (**Nobuhisa et al.**, 1998; **Thwin et al.**, 2000). A diferencia de las otras PLIs, las PLIs γ no son tan específicas, pudiendo actuar contra PLA₂s I, II y III (**Lizano et al.**, 2003; **Okumura et al.**, 1999). Las PLIs γ han sido encontradas en vipéridos (**Fortes-Dias, et al.**, 1994; **Lizano et al.**, 1997; **Nobuhisa et al.**, 1997; **Ohkura et al.**, 1997; **Perales et al.**, 1995), colúbridos (**Okumura et al.**, 1999), elápidos (**Ohkura et al.**, 1994a,b; **Hains & Broady**, 2000; **Hains et al.**, 2000; **Hains et al.**, 2001), boídos (**Thwin et al.**, 2000) e hidrófinos (**Ohkura et al.**, 1999). Se ha propuesto que las PLIs γ tienen una relación evolutiva con las neurotoxinas y citotoxinas con motivos de tres de dedos de venenos de elápidos (3FTxs; **Perales & Domont**, 2002).

La distribución de estos inhibidores no es entonces especie-específico. Sin embargo los diferentes PLIs ex-

traídos hasta ahora tienden a mostrar mayor especificidad de acción en contra del tipo de PLA₂s específicas presentes en los venenos de las especies de donde son extraídos (Lizano *et al.*, 2000; Perales & Domont, 2002).

1.6. Factores antiveneno de serpientes en grupos no ofídicos: Aunque más de la mitad de factores anti-veneno de serpientes han sido aislados de estos animales (Thwin & Gopalakrishnakone, 1998), otros grupos, especialmente algunos mamíferos (Domont *et al.* 1991), muestran grados variables de resistencia al veneno de serpientes. Incluso se han encontrado este tipo de factores en aves, más específicamente en una especie de gallina (*Gallus domesticus*) de la cual se ha extraído un factor sérico de alto peso molecular que es activo en contra de los efectos letales, hemorrágicos y defibrinogénicos del veneno de *Vipera russellii* (Alam & Gomes, 1997 citado por Thwin & Gopalakrishnakone, 1998). Además de fuentes animales, Hains *et al.* (2000) reportan estudios donde PLIs han sido extraídos de plantas, hongos y bacterias; siendo tanto el interés de investigación que despiertan estas moléculas por su potencial terapéutico, que incluso Eli Lilly ha desarrollado el PLI sintético LY311727 (Schevitz *et al.*, 1995) específico contra la II PLA₂ humana secretoria no pancreática.

Estas resistencias se pueden explicar por la presencia de proteínas neutralizadoras en la sangre que inhiben factores tóxicos importantes de los venenos (Domont *et al.*, 1991; Fortes-Dias *et al.*, 1994; Neves-Ferreira *et al.*, 2000; Perales & Domont, 2002). Estas proteínas neutralizadoras generalmente se encuentran en la fracción de albúmina o α -globulina del plasma sanguíneo. Los factores antiveneno de serpientes pueden ser entonces anti-hemorrágicos, anti-neurotóxicos, anti-miotóxicos, o combinaciones de estos (Jurgilas *et al.*, 2003; Thwin & Gopalakrishnakone, 1998).

1.6.1. Proteínas antiveneno de serpientes extraídas de mamíferos (Mammalia): Según Martínez *et al.* (1999) resistencia a veneno de serpientes ha sido reportada en varios grupos de mamíferos desde 1895 (Phisalix & Bertrand, 1895, citados por Pérez & Sánchez, 1999). Pérez *et al.* (1978) citados por Martínez *et al.* (1999) mostraron que 14 de 40 endotermos estudiados en Texas fueron capaces de neutralizar el veneno de *Crotalus atrox* (Viperidae: Crotalinae). Para facilitar la comprensión de los géneros de mamíferos cuya resistencia a veneno de serpientes será revisada, se incluye la figura 3 donde se presenta la distribución filogenética más aceptada actualmente para los principales grupos de mamíferos vivos.

Siendo entonces esta figura bien dicente, y para no salirse del espectro cubierto en esta revisión, no se va a

hacer un comentario tan largo como el que se hizo con respecto a la sistemática de serpientes, pero brevemente se puede decir que al igual que estas y aunque los registros fósiles tiendan a mostrar fechas más recientes de aparición, los principales grupos de mamíferos (lo que en taxonomía tradicional se llama ordenes) ya estaban presentes antes del fin del Cretácico, hace 65 ma (Allard *et al.*, 1999). Esto es importante con respecto a lo que se revisará aquí, pues como se verá más adelante con ejemplos concretos, el desarrollo de resistencia por parte de mamíferos a componentes del veneno de serpientes, es un evento evolutivo que toma largos tiempos geológicos de interacción entre especies presas (mamíferos) y sus predadores ofídicos. De acuerdo a lo encontrado en la literatura reciente disponible en línea revisada para hacer este escrito, resistencia al veneno de serpientes se ha encontrado en mamíferos roedores tipo ratón (Rodentia: Muridae y Heteromyidae), ardillas (Rodentia: Sciuridae), insectívoros (Eulipotyphla o "Insectivora": Erinaceidae), mangostas (Carnivora: Herpestidae), zarigüeyas (Marsupialia: Didelphidae). La lista más completa con géneros de mamíferos para los cuales existen reportes sobre resistencia a veneno de serpientes es dada por Pérez & Sánchez (1999):

"Insectívoros" (Eulipotyphla): Erizo europeo (Erinaceidae: *Erinaceus* y *Hemiechinus*), musaraña (Soricidae: *Crocidura*), topo (Talpidae: *Talpa*).

Roedores (Rodentia): Tipo hamster (Cricetidae: *Mesocricetus*, *Microtus*, *Neotoma*, *Oryzomys*, *Peromyscus*, *Sigmodon*), rata común (Muridae: Murinae: *Rattus rattus*), ratones de bolsillo (Heteromyidae: *Liomys* y *Perognathus*), lirón (Myoxidae: *Eliomys*), ardillas (Sciuridae: *Spermophilus*).

Marsupiales (Marsupialia): Zarigüeyas (Didelphidae: *Didelphis*, *Lutreolina* y *Philander*).

Carnívoros (Carnivora): Mangosta (Herpestidae: *Herpestes* y *Suricata*), mapache (Procyonidae: *Procyon*), tejón americano (Mustelidae: *Taxidea*), zorrillo (Mephitidae: *Mephitis*).

La mayoría de proteínas antiveneno extraídas hasta ahora de mamíferos son anti-hemorráginas (o anti-SVMP = anti Snake Venoms Metalloproteases) y comparten varias características como ser glicoproteínas ácidas altamente estables en rangos amplios de pH y temperatura, no poseer actividad proteolítica, no ser inmuglobulinas y no ser susceptibles a hidrolización por las SVMPs (Domont *et al.*, 1991; Neves-Ferreira *et al.*, 1997; Neves-Ferreira *et al.*, 2000; Pérez & Sánchez, 1999). Esta última característica indica que estas anti-hemorráginas no son parte

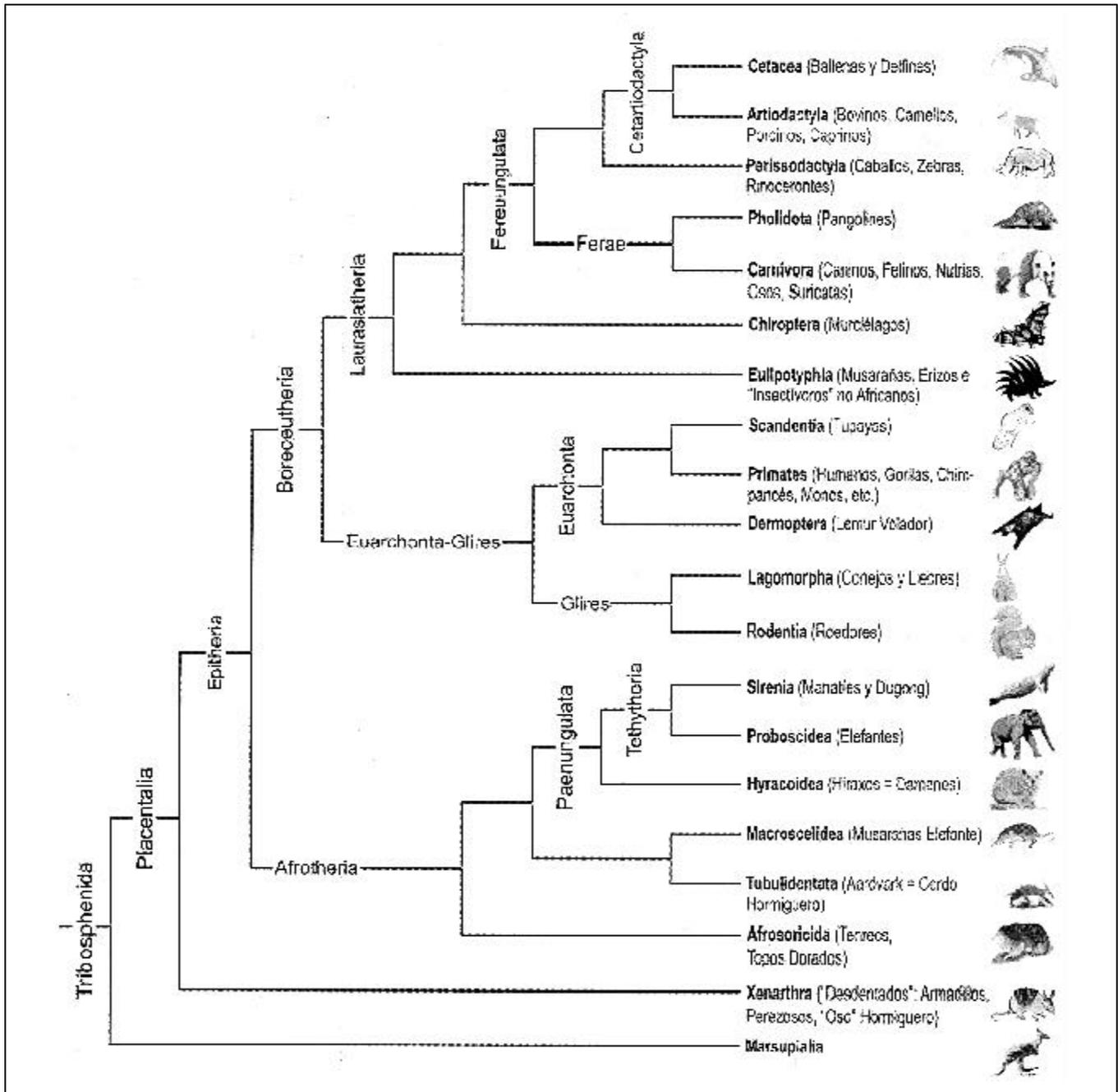


Figura 3. Árbol filogenético de los mamíferos tribosfénicos vivos. Tribosphenida incluye a todos los mamíferos vivos, excepto a *Ornithorhynchus* (Mammalia: Monotremata). Realizado con datos de Allard *et al.* (1999), Liu *et al.* (2001), Murphy *et al.* (2001) y Springer & de Jong (2001).

del sistema inhibitor de proteasas del plasma, pues los miembros de este último si son típicamente inactivados por proteólisis causada por SVMPs (Neves-Ferreira *et al.*, 1997). Con respecto a la masa molecular parece haber dos grupos de anti-hemorrinas (Perales & Domont,

2002): de alto y bajo peso molecular. Las de bajo peso (52 a 95kDa) incluyen las extraídas de *Didelphis* y *Philander* (Marsupialia: Didelphidae): DM40, DM43, OPRIN; AHF1, 2, 3 extraídas de *Herpestes* (Carnívora: Herpestidae); y presumiblemente las de roedores (García

& Pérez, 1984), aunque las afiliaciones de los factores antihemorrágicos de roedores no han sido inequívocamente determinadas (Perales & Domont, 2002). Las antihemorráginas de bajo peso molecular además de ser miembros de la FSIG también tienen en común el formar complejos no covalentes con la SVMP a inhibir (Neves-Ferreira *et al.*, 1997; Neves-Ferreira *et al.*, 2000; Thwin & Gopalakrishnakone, 1998). Estos inhibidores de SVMPs o anti-hemorráginas, no son efectivos contra serinproteasas de venenos, ni contra enzimas no venenosas como tripsina, quimotripsina, termolisina ni colegenasa microbiana. El otro grupo de anti-hemorráginas son las de alto peso (Neves-Ferreira *et al.*, 2000), que van de 700 a 1090 kDa (Perales & Domont, 2002) como la β -Macroglobulina de 700 kDa (de-Wit & Westrom, 1987a y b) y la erinacina de 1000 kDa (Omori-Satoh *et al.*, 2000) extraídas del erizo europeo (Eulipotyphla: Erinaceidae: *Erinaceus europaeus*). A continuación se ampliará la información sobre algunas de estas proteínas antiveneno de serpientes extraídas de mamíferos, haciendo énfasis en las tipo DM extraídas de didélfidos y herpéstidos.

1.6.1.1. Antihemorráginas de alto peso molecular de mamíferos “Insectívoros” (Eulipotyphla): Los mamíferos insectívoros, en términos generales son animales pequeños tipo musaraña, que se alimentan predominantemente de invertebrados. “Insectívora” se ha puesto aquí hasta ahora entre comillas porque de acuerdo a su concepción tradicional ha resultado ser un grupo difilético, teniendo en cuenta las más actualizadas filogenias moleculares (Murphy *et al.*, 2001; Liu *et al.*, 2001; Symonds, 2005; Springer & de Jong, 2001). Este “Insectívora” tradicional esta formado por al menos dos clados no relacionados directamente por un ancestro común reciente: uno originario del antiguo continente de Laurasia (los actuales Europa, Asia, Norte y Centro América, y el Caribe) llamado Eulipotyphla (o verdaderos insectívoros) que incluye las familias Erinaceidae, Soricidae, Talpidae y Solenodontidae, y uno Africano llamado Afrosoricida o Tenrecoidea que incluye las familias Tenrecidae y Chrysochloridae (Symonds, 2005). Por esto de ahora en adelante, y por continuidad terminológica con los artículos revisados sobre resistencia a venenos, el término “Insectívoros” se utilizará como uno informal y sinónimo del ahora más aceptado Eulipotyphla.

Omori-Satoh *et al.* (1994) sugieren que la resistencia a venenos puede ser un fenómeno común en mamíferos “insectívoros”. El mismo grupo empieza a comprobar esto en otro estudio (Omori-Satoh *et al.*, 1998) al encontrar que extractos musculares de los eulipotiflos *Erinaceus europaeus* (Erinaceidae), *Crocidura rossula* (Soricidae),

Talpa europaea (Talpidae) mostraron significativa actividad antihemorrágica contra el veneno de *Bothrops jararaca* (Viperidae), siendo mayor la de *Erinaceus*, el erizo europeo. Como se verá más adelante para el caso de una especie de ardilla (*Spermophilus*), este tipo de protección se da por contacto con el predador, por lo cual llama la atención que estos eulipotiflos, que son animales que en su mayoría son propios del viejo mundo, muestren actividad antiveneno en su sangre, contra las toxinas de una serpiente propia del nuevo mundo como *Bothrops jararaca*.

La actividad antihemorrágica de extractos musculares de *Erinaceus* fue evaluada por Omori-Satoh *et al.* (1994), quienes encontraron fuerte inhibición por parte de estos extractos de la actividad hemorrágica de venenos de serpientes vipéridas de los géneros *Bitis*, *Bothrops*, *Vipera*, *Agkistrodon* y *Crotalus*. Previamente, factores antihemorrágicos plasmáticos de este erizo fueron extraídos por de-Wit & Westrom (1987a), pudiéndose purificar en este estudio 3 macroglobulinas: $\alpha 2$, $\alpha 2\beta$ y β , las cuales fueron capaces de neutralizar totalmente la actividad hemorrágica del veneno de *Vipera berus* (Viperidae), pero no se hizo distinción en la actividad de cada una. El mismo grupo investigativo pero en otro estudio (de-Wit & Westrom, 1987b) caracterizó estas macroglobulinas, encontrando que la $\alpha 2$ es un homotetramero con una masa molecular de 800,000 homólogo a la $\alpha 2$ macroglobulina humana, la $\alpha 2$ globulina de rata, $\alpha 1$ macroglobulina de perro y $\alpha 2$ macroglobulina rápida de cerdo. La $\alpha 2\beta$ macroglobulina de erizo europeo resultó ser un homodímero de un peso molecular de 450,000 a 500,000. La β macroglobulina de erizo tiene un peso molecular de 700,000 con subunidades de 34,000 y 39,000 y mostró reacción cruzada con la $\alpha 2$ macroglobulina lenta de cerdo. Aunque se encontró que las tres macroglobulinas tenían actividad inhibitoria de proteasas, de-Wit & Westrom (1987b), en contradicción con su otro estudio (de-Wit & Westrom, 1987a), encontraron que solo la β macroglobulina tienen actividad antihemorrágica en contra del veneno de *Vipera berus*. Explican esto por las diferencias estructurales entre la β , $\alpha 2$ y $\alpha 2\beta$ macroglobulinas, lo cual puede hacer que estas dos últimas sean más susceptibles a inactivación por parte de proteasas de veneno. En contraste a las otras antihemorráginas extraídas de mamíferos (Omori-Satoh *et al.*, 2000), de-Wit & Westrom (1987b) encontraron que la β -macroglobulina de erizo europeo, además de actividad anti-hemorrágica, también inhibió la actividad proteolítica de serinproteasas como tripsina y quimiotripsina.

Omori-Satoh *et al.* (2000) extrajeron otro factor antihemorrágico de *Erinaceus*, llamado erinacina, para la

cual se halló un peso de 1,000 kDa, y la presencia de unidades α y β , con pesos de 37 y 35 kDa, respectivamente, en razón de 1:2. La erinacina inhibe la actividad hemorrágica y proteolítica de la principal metaloproteasa hemorrágica del veneno de *Bothrops jararaca* (Viperidae), en cantidades equimolares de erinacina y hemorragina. **Omori-Satoh et al.** (2000) encontraron que la erinacina no inhibe serin-proteasas como tripsina y quimiotripsina. Las dos subunidades de la erinacina tienen dominios tipo colágeno y fibrinógeno, homólogos a proteínas de la familia de lectinas ficolina y opsonina P35 humana, proteínas para las cuales se ha sugerido un rol en la primera línea de defensa en contra de microorganismos patógenos.

1.6.1.2. Antihemorrágicas de bajo peso molecular de mamíferos: Las anti-hemorrágicas de bajo peso molecular (52 a 90kDa) forman complejos no covalentes con la SVMP a inhibir, con estequiometría equimolar. De estas anti-SVMP de mamíferos, las más documentadas son las de marsupiales didélfidos (DM40, 43, PO41 y OPRIN) y las de la mangosta (Carnivora: Herpestidae: *Herpestes AHF1/2, 3*), las cuales son homólogas a la α 1BG humana, y por lo tanto, miembros de la FSIG. Presumiblemente pertenecen a este grupo de bajo peso molecular las antihemorrágicas encontradas en roedores.

1.6.1.2.1. Antihemorrágicas de bajo peso molecular extraídas de roedores (Mammalia: Rodentia): En uno de los reportes disponibles en línea más antiguos donde se habla de resistencia de roedores a venenos ofídicos, se encontró que **Ovadia & Kochva** (1977) evaluaron la neutralización de venenos de 3 serpientes vipéridas (*Vipera palaestinae*, *Echis colorata* y *Pseudocerastes fieldi*) y una elápidia (*Walterinnesia aegyptia*) por parte de varios animales, incluidos serpientes, lagartos y mamíferos. En cuanto a estos últimos encontraron que la mangosta (Carnivora: Herpestidae: *Herpestes*) mostró alta resistencia a estos venenos mientras que la mostrada por el hamster (Rodentia: Cricetidae: Cricetinae: *Mesocricetus auratus*) fue moderada. Sin embargo *in vitro* el suero del hamster mostró incluso más capacidad neutralizadora que la del erizo europeo *Erinaceus* (Eulipotyphla: Erinaceidae). Siguiendo en orden cronológico estos primeros estudios disponibles en línea sobre roedores y venenos de serpientes, **Pérez et al.** (1978) evaluaron la resistencia de 40 especies animales al veneno de *Crotalus atrox* (Viperidae: Crotalinae) encontrando que cuatro animales (tres roedores y un carnívoro) dieron positivo tanto en las pruebas de precipitación como en las de actividad antihemorrágica en contra del veneno. Los animales fueron el mapache (Carnivora: Procyonidae: *Procyon lotor*), una especie de ratón de bolsillo (Rodentia: Heteromyidae: *Liomys*

irroratus) y un roedor tipo hamster (Rodentia: Cricetidae: Neotominae: *Neotoma micropus*). El suero de esta última especie fue analizado en el mismo estudio (**Pérez et al.**, 1978) encontrándose que era capaz de neutralizar todos los factores hemorrágicos de *Crotalus* pero no los factores letales de venenos de elápidos.

Pérez et al. (1979) evaluaron la actividad antihemorrágica del suero de un marsupial y dos roedores: *Didelphis virginiana* (Marsupialia: Didelphidae), *Neotoma micropus* (Cricetidae: Neotominae) y *Sigmodon hispidus* (Cricetidae: Sigmodontinae), en contra del veneno de *Crotalus atrox*, encontrándose que las tres especies son resistentes al veneno de esta serpiente, mostrando la actividad antihemorrágica de las muestras de suero, clasificada de mayor a menor, el siguiente orden: *Didelphis virginiana*, *Neotoma micropus* y *Sigmodon hispidus*. Con respecto a esta última especie **Pichyangkul & Pérez** (1981) reportaron que su suero contiene un factor que neutraliza la actividad hemorrágica del veneno de *Crotalus atrox*. Este factor no mostró actividad en contra de las enzimas gelatinasa o caseinasa y mostró ser estable en un rango de pH de 3 a 10. Su peso molecular está cerca de 90,000 y su punto isoeléctrico en 5.4. En otro estudio realizado en la misma época y en la misma familia de roedores, **de-Wit** (1982) reportó disminución significativa de los efectos hemorrágicos del veneno de *Agkistrodon contortrix phaeogaster* (Viperidae: Crotalinae) por parte del suero de dos roedores: *Microtus* (Cricetidae: Arvicolinae) y *Neotoma* (Cricetidae: Neotominae), de lo cual los autores sugieren que la resistencia a venenos ofídicos en las presas de las serpientes puede ser más común de lo que antes se pensaba.

La resistencia de otros roedores, las ardillas Californianas (Rodentia: Sciuridae: *Spermophilus beecheyi*), al veneno de *Crotalus viridis oreganus* fue evaluada directamente (inyección de 1-40 mg/kg de veneno en ardillas) e indirectamente (inyección de veneno en ratones inoculados con suero de esta ardilla) por **Poran et al.** (1987), quienes encontraron que la actividad anti-veneno del suero de esta ardilla (medida en reducción de mortalidad, necrosis y tiempo de recuperación) variaba considerablemente de acuerdo a si la ardilla provenía de poblaciones expuestas a la presencia de *Crotalus* o no; encontrándose que el suero proveniente de poblaciones expuestas era de tres a cinco veces más efectivo que el de poblaciones no expuestas. **Poran et al.** (1987) dicen que esta variación intraespecífica en la efectividad del suero de esta ardilla es probablemente el resultado de la selección natural diferencial impuesta por el grado de presencia de *Crotalus* en las diferentes poblaciones de esta especie de *Spermophilus beecheyi*. En un

estudio mucho más reciente se amplían los datos sobre la interacción entre estas dos especies (**Biardi et al.**, 2000) y se refuerza la concepción de que la variación poblacional en la efectividad antiveneno del suero de esta ardilla es innata, y por lo tanto es de origen evolutivo y no fisiológico. Relacionado con esto, se llama la atención sobre el hecho de que la simpatria entre *Spermophilus beecheyi* y *Crotalus viridis oreganus* es muy antigua, y viene desde finales del Pleistoceno como lo demuestra el registro fósil (**Biardi et al.**, 2000) o incluso antes desde el Mioceno, épocas en las cuales crotálicos y *Otospermophilus* (ancestro de estos roedores sciuridos modernos) podrían haber interactuado. Actualmente *Spermophilus beecheyi* puede constituir hasta un 67% de la dieta de *Crotalus viridis oreganus*, en ciertos lugares. Al igual que **Poran et al.** (1987), **Biardi et al.** (2000) también probaron las actividades antiveneno, particularmente la capacidad anti-hemorrágica del suero de poblaciones de esta ardilla sometidas a diferentes grados de predación por parte de *C. viridis*. Encontraron que el suero de ardillas históricamente no enfrentadas a estas serpientes, puede incluso maximizar los efectos de estos venenos, lo cual sugiere que las hemorraginas del veneno de las serpientes pueden incluso aprovechar las metaloproteasas endógenas presentes en el mamífero presa, para así maximizar su efecto tóxico. La efectividad del suero de una población de *Spermophilus* no depende tanto de la densidad actual de *Crotalus* (lo cual aduciría a adaptaciones fisiológicas) sino del tiempo de interacción con esta serpiente (adaptación evolutiva), lo cual constituye un interesante modelo de “carrera armamentista evolutiva” entre esta serpiente y este roedor. En línea con esto **Biardi et al.** (2000) dicen que por ejemplo el inhibidor de proteasa a₁ humano bloquea la acción de toxinas de venenos de serpientes solo transitoriamente, mientras que el mismo inhibidor de la zarigüeya (Mammalia: Marsupialia: Didelphidae) efectivamente inhibe metaloproteasas de *Crotalus atrox*. Todo esto confirma entonces que la evolución en una proteína de un efecto inhibidor, depende de que haya una interacción larga en el tiempo, geológicamente hablando, entre la especie que está desarrollando el inhibidor con la especie productora del veneno.

No se encontró mucha más información sobre caracterización de factores antiveneno en roedores. **Martínez et al.** (1999) muestra algunas características de los inhibidores de metaloproteasas (anti-hemorraginas) de *Spermophilus mexicanus*. Se encontró que el suero de esta ardilla mantiene actividad anti-hemorrágica entre pH 2 y 12. El factor anti-hemorrágico tiene un peso de 52 kDa y un punto isoeléctrico de 4.9. Teniendo en cuenta estos datos, **Martínez et al.** (1999) tácitamente comparan este factor

antihemorrágico de *Spermophilus* con los mucho más caracterizados y conocidos de marsupiales didelfidos. Y este factor anti-hemorrágico de *Spermophilus* no sería el del único roedor comparable a los de *Didelphis*, pues **García & Pérez** (1984) purificaron y caracterizaron un factor anti-hemorrágico de *Neotoma micropus*, para el cual se encontró un pH isoeléctrico de 4.1, un peso molecular 54,000 y el cual dicen estos autores (**García & Pérez**, 1984) que parece ser similar al de *Sigmodon* y *Didelphis*. Teniendo en cuenta todo esto, no sería arriesgado sugerir que todos estos factores anti-hemorrágicos de roedores pertenecen al grupo de bajo peso molecular y deben ser similares a los de *Didelphis*.

1.6.1.2.2. Antihemorraginas tipo DM de la Mangosta (Mammalia: Carnivora: Herpestidae: *Herpestes*): **Factores AHF1/2 y 3: Tomihara et al.** (1987) extrajeron tres factores anti-hemorrágicos del suero de este carnívoro: AHF1, AHF2 y AHF3. Los 3 factores inhibieron la actividad hemorrágica de HR1 y HR2, dos hemorraginas de la serpiente *Trimeresurus flavoviridis* (Viperidae: Crotalinae). Mostraron estos factores protectores un peso molecular de 65 kDa y fueron estables en un rango de temperatura de 0 a 60°C, y a un rango de pH de 2.0 a 11.0. **Qi et al.** (1994a) además hallaron que AHF1, AHF2 y AHF3 son glicoproteínas monoméricas que contienen 4.2%, 13.6% y 6.0% de carbohidratos como glucosa, respectivamente. Hallaron además que están compuestos de 600 aminoácidos de composición similar. Después de examinar los 32 aminoácidos de la secuencia aminoterminal, encontraron que AHF1 y AHF2 tenían la misma secuencia aminoacídica, la cual mostró una homología de 68.7% con AHF3, 42.3% con OPRIN (esta es una proteína anti-hemorrágica de marsupiales didelfidos que será ampliada más adelante) y 50% con α 1BG. Sin ser inmunoglobulinas, y como se verá para las antihemorraginas de *Didelphis*, AHF1/2 y 3 de *Herpestes* pertenecen a la FSIG. Para confirmar esto el mismo grupo en otro estudio (**Qi et al.**, 1994b) fraccionaron en varios péptidos el factor AHF1 para que ver que fragmentos eran homólogos a la α 1BG. Encontraron que 13 péptidos de AHF1 presentaban homologías con porciones de uno de los cinco dominios de α 1BG. Después de secuenciar los fragmentos se encontró una identidad de 40.2% (36/92 a.a.) entre AHF1 y el dominio I de α 1BG. Otros grupos de péptidos de AHF1 obtenidos por **Qi et al.** (1994) mostraron los siguientes porcentajes de homología con los demás dominios de α 1BG: dominio II (62.5), III (45.6), IV (44.7) V (45.9). Para una identidad total de 46.4% (167/360 a.a.) entre los péptidos secuenciados de AHF1 y α 1BG. Además de conservar varios sitios para puentes de disulfuro (7 de 10 cisteínas en el mismo lugar), las dos proteínas también

mostraron sitios comunes para el enlace de sus azúcares. Con estos datos, entre otros, **Qi et al.** (1994b) confirman entonces que AHF1 es homóloga a otros factores antihemorrágicos de mamíferos como OPRIN y es miembro de la FSIG.

1.6.1.2.3. Antihemorrágicas de Zarigüeyas (Mammalia: Marsupialia: Didelphidae): Complejo Anti-Botrópico (ABC): Perales et al. (1994) aislaron una fracción antibotrópica (anti veneno de *Bothrops jararaca*) del suero didélfidos sur americanos: *Didelphis marsupialis*, *Philander opossum* y *Lutreolina crassicaudata*. En el mismo estudio (**Perales et al.**, 1994) se aisló un complejo antibotrópico (ABC) de la fracción antibotrópica (ABF) en las tres especies. Estos complejos resultaron estar compuestos por dos subunidades de pesos moleculares de 48,000 y 43,000, de las cuales las subunidades de 48,000 de las tres especies resultaron ser altamente homólogas. En línea con lo anterior, otros estudios han mostrado que el suero de algunos marsupiales suramericanos (*Didelphis marsupialis* y *Philander opossum*), inhiben la liberación de enzimas sarcoplásmicas (CK y LDH) de músculo esquelético, inducida por el veneno de *Bothrops jararacussu* (**Melo & Suarez-Kurtz**, 1988). En otro estudio (**Soares et al.**, 1997) encontraron que el complejo anti-botrópico (ABC) de *Didelphis albiventris*, aislado del suero de este animal, tiene carácter ácido y contiene 2 cadenas de 45 y 48 kDa. Este complejo resultó ser efectivo para neutralizar los efectos hemorrágicos, miotóxicos, edematogénicos y mionecróticos de los venenos de tres especies de *Bothrops*, dentro de lo cual cabe destacar que este ABC también disminuyó considerablemente la actividad de las PLA₂s de estos venenos (**Soares et al.**, 1997). El ABC extraído de *Didelphis marsupialis* (**Neves-Ferreira et al.**, 1997), es un complejo de dos glicoproteínas ácidas de un peso molecular de 42,600 y 48,500, que mostró actividad anti-hemorrágica, anti-letal, anti-edematogénica y anti-mionecrótica. El suero del cual fue extraído este ABC de *Didelphis marsupiales* resultó ser más efectivo en neutralizar los efectos hemorrágicos de venenos de crotalinos que de viperinos. Este ABC inhibió casi completamente la hidrólisis de caseína y fibrinógeno por parte del veneno de *Bothrops jararaca*. De importancia para su actividad anti-hemorrágica, el ABC también inhibió la digestión por parte del veneno, de proteínas de la matriz extracelular como fibrina, fibrinógeno, gelatinas I y V, laminina, fibronectina y colágeno IV. Estas proteínas son importantes componentes de la membrana basal de capilares, y por lo tanto uno de los blancos de las SVMPs en su actividad hemorrágica. Teniendo en cuenta toda esta actividad inhibitoria del ABC, no es una sorpresa que sus efectos anti-hemorrágicos sean al menos seis veces más potentes

que los conseguidos con antivenenos convencionales comerciales (**Neves-Ferreira et al.**, 1997). ABC no pudo ser hidrolizado por el veneno de *B. jararaca*, lo cual, y como ya se vio, es una característica común de las antihemorrágicas; como también lo es el hecho de que el ABC inactiva las SVMPs formando complejos no covalentes con estas últimas. Además de ser probado con venenos, el ABC también lo fue con otras enzimas proteolíticas. Se encontró por ejemplo que en vez de ser un inhibidor de quimiotripsina, el ABC es un sustrato de esta enzima, ya que fue digerido por la misma. Además de ser incapaz de inhibir la quimiotripsina, el ABC tampoco pudo inhibir otras enzimas proteolíticas no-venenosas como tripsina y colagenasa bacteriana (**Neves-Ferreira et al.**, 1997), lo cual no es una sorpresa teniendo en cuenta las características comunes de estas anti-hemorrágicas.

1.6.1.2.3.1. Antihemorrágicas tipo DM de Didelphis marsupialis (Marsupialia: Didelphidae): DM40 y DM43: Estudios posteriores han tratado de aislar y caracterizar factores protectores específicos del ABC de *Didelphis*, con el fin de diferenciar cuales son efectivos y específicos contra los diferentes efectos de los venenos de serpientes. En este sentido al menos 2 proteínas, DM40 y DM43 han sido aisladas de *Didelphis marsupiales*, bautizadas de acuerdo a la especie de procedencia y peso molecular, y caracterizadas como inhibidoras de los efectos hemorrágicos producidos por metaloproteasas presentes en venenos de serpientes (**Neves-Ferreira et al.**, 2000). Encontraron un peso molecular de 40,318 para DM40 y 42,373 y 43,100 para DM43. Estos dos pesos de DM43 encontrados en abundancias similares, indican la presencia de isoformas probablemente con diferencias en su contenido de ácido N-acetilneuramínico, lo cual ya ha sido reportado en anti-hemorrágicas de serpientes y mamíferos (**Neves-Ferreira et al.**, 2000). Se encontró que ambas proteínas eran muy ácidas con puntos isoeléctricos por debajo de 3.5; un total de 287 aminoácidos y un porcentaje de 20.5 de carbohidratos (ch) para DM40, y 276 aa y 29% ch para DM43. La glicosilación permite que estas proteínas sean solubles, sin lo cual no serían funcionales. Estas dos anti-hemorrágicas tienen composición aminoácídica similar, con alrededor del 45% del total de sus aminoácidos presentando propiedades hidrofóbicas. Según **Neves-Ferreira et al.** (2000) similares porcentajes se encuentran en a1BG y en las otras anti-hemorrágicas homólogas a ella (*Herpestes edwardsii*: AHF1/2 y AHF3; *Didelphis virginiana*: OPRIN). Y también como en otras proteínas de este grupo, se encontraron puentes disulfuro, vinculando seis cisteínas. La secuencia N-terminal de DM40 y DM43 resultó ser idéntica excepto por una diferencia en la posición 9, la cual es arginina en DM40 y

prolina en DM43. DM40 y DM43 mostraron actividad anti-hemorrágica en contra de la jararagina de *Bothrops jararaca*. Además en ensayos de laboratorio, DM40 y DM43 inhibieron la típica hidrólisis que produce el veneno de *Bothrops jararaca* del fibrinógeno, fibronectina y caseína. DM43 también mostró efectos anti-letales, anti-edematogénicos y anti-hiperalgésicos contra este veneno. Sin embargo, como se ha encontrado para otras proteínas de este grupo, se demostró que DM40 y DM43 no tienen actividad enzimática (Neves-Ferreira *et al.*, 2000). Como sucede con todas las anti-hemorraginas, DM40 y DM43 inhiben la toxina al formar complejos inactivos solubles no-covalentes con una razón molar de 1:1 (toxina:inhibidor). En otro estudio del mismo grupo (Neves-Ferreira *et al.*, 2002), en el cual se concentraron en las propiedades de DM43, se halló que esta es una proteína de 42,691 kDa de los cuales el 21% corresponde a glicosilación. El peso de la proteína nativa es de 78kDa, de lo cual se concluyó que existe como un homodímero. Presenta una similaridad del 51% con α 1BG y homología con otras anti-SVMP: 86% con OPRIN de *Didelphis virginianus* [de hecho Neves-Ferreira *et al.* (2000) dicen que DM43 es la contraparte de OPRIN en *Didelphis marsupialis*] y del 44% con AHF-1 (Mangosta: *Herpestes edwardsii*). El mismo grupo (Neves-Ferreira *et al.* 2000) detectó una homología mas limitada con los dominios tipo-Ig de las moléculas KIR2 y KIR3, las cuales son receptores que se encuentran en células asesinas. DM43 inhibe la actividad fibrinogenolítica de las proteínas hemorrágicas botrolisina y jararagina formando complejos estables (estequiometría 1:1) con ambas metaloproteinasas. Como lo proponen Rocha *et al.* (2002) para DM64, Neves-Ferreira *et al.* (2002) proponen que DM43 sea considerada una proteína del sistema inmune innato, principalmente porque estructuralmente tiene muchas características comunes a los miembros de la FSIG, y porque ambas proteínas tienen la función de ofrecer protección circulatoria contra toxinas extranjeiras.

1.6.1.2.3.2. Antihemorragina tipo DM de *Didelphis virginiana*: OPRIN: Catanese & Kress (1992) aislaron y caracterizaron esta proteína a partir de *Didelphis virginiana*. Encontraron que OPRIN tiene una masa de 52 kDa, y está conformado por una sola cadena polipeptídica y residuos de carbohidratos. Esta proteína tiene un punto isoelectrico entre 3.4 y 3.6., siendo estable y funcional en un rango de pH de 2.5 a 11.5 y hasta a 70°C. Contiene cuatro puentes disulfuro y presenta un 26% de glicosilación. OPRIN inhibió completamente las metaloproteasas de los vipéridos *Crotalus atrox*, *Crotalus basisliscus* y *Bitis arietans*, formando complejos metaloproteasa/OPRIN, como es típico de estos inhibidores de SVMPs.

Un dato importante es que estos autores (Catanese & Kress, 1992) hallaron que mientras el suero completo de *Didelphis virginiana* era activo tanto contra la metaloproteasa HT-a (la hemorragina más activa de las dos) y HT-b de *C. atrox*, OPRIN solo lo es contra HT-b, a partir de lo cual, entre otros datos, estos autores predijeron que *Didelphis virginiana*, tenía al menos otra anti-hemorragina además de OPRIN. Como ya se repasó aquí, esto resultó cierto con la caracterización de DM40 y DM43 (contraparte de OPRIN) por Neves-Ferreira *et al.* (2000). Continuando con OPRIN, se halló que esta proteína solo inhibió parcialmente a metaloproteasas de *Crotalus adamanteus* (60%) y del elápidio *Dendroaspis agusticeps* (67%). Como era de esperarse de acuerdo a las características comunes repasadas aquí, para estas anti-SVMPs, OPRIN no presentó actividad inhibitoria en contra de metaloproteasas bacterianas, serin-proteasas de venenos, tripsina bovina, chimotripsina, elastasa porcina, papaína, pepsina, carboxipeptidasas A ni B. OPRIN tiene 211 aa inoácidos idénticos a α 1BG humana, conformando esto un 36.5% de homología. Se halló un 46.2% de homología entre las secuencias amino-terminales de estas dos proteínas. Como se ampliará mas adelante, la α 1BG tiene cinco dominios, de los cuales OPRIN muestra homología con los tres primeros (I a III), estando conformada esta última (OPRIN) por cuatro dominios (Catanese & Kress, 1992).

1.6.1.2.3.3. Antihemorragina tipo DM de *Philander opossum* (Marsupialia: Didelphidae): PO41: Jurgilas *et al.* (2003) aislaron otra proteína anti-hemorrágica de otro mamífero marsupial suramericano: *Philander opossum* (Marsupialia: Didelphidae). Se trata de la glico-proteína PO41 bautizada, como las anteriores, por el animal de donde fue extraída y por su peso molecular: 41,330 Da. El peso de la proteína nativa resultó de 81.5 kDa, de lo cual se concluyó que esta existe como dímero también, ya sea como homodímero o como heterodímero formado por monómeros muy similares. PO41 presentó reacción cruzada con la fracción antibotrópica de *Didelphis marsupialis* (ABF-Dm) por lo cual se concluyó que los factores antihemorrágicos de ambos animales tienen similaridad antigénica. PO41 fue caracterizada como una proteína fuertemente ácida con un punto isoelectrico por debajo de 3.5, compuesta de 272 aminoácidos de los cuales un 42.5% son hidrofóbicos. Los contenidos de cisteínas (6) y metioninas (4) son similares a las de DM40 y DM43, caracterizadas por Neves-Ferreira *et al.* (2000). Según el grupo que la aisló (Jurgilas *et al.*, 2003), la naturaleza ácida de PO41 se puede deber a la presencia de altas cantidades de residuos de aspartato y glutamato o la presencia de ácido siálico, oligosacárido frecuentemente

encontrado en glicoproteínas. La secuencia N-terminal de PO41 tiene 30 aminoácidos y es homóloga a la de DM40 (83.4%), DM43 (93.4) y OPRIN (84.6%). De acuerdo a los ensayos cromatográficos, **Jurgilas et al.** (2003) llegaron a la conclusión de que aunque PO41 actúa como dímero, forma complejos no covalentes con la SVMP a inhibir, con una estequiometría de 1 subunidad de PO41: 1 molécula de SVMP, como ya se observó para DM40 y DM43 (**Neves-Ferreira et al.**, 2000). Las SVMPs empleadas para probar la capacidad antihemorrágica de PO41 por parte de **Jurgilas et al.** (2003) fueron jararagina y botrolisina, ambas extraídas de la serpiente *Bothrops jararaca*. Los efectos proteolíticos y hemorrágicos de estas dos SVMPs fueron completamente inhibidos por PO41. De su similitud con DM40, 43 y OPRIN, se concluyó que PO41 también pertenece a la FSIG.

1.6.1.3. PLI tipo DM Extraído de *Didelphis marsupialis*: DM64: La proteína DM64, aislada y caracterizada por **Rocha et al.** (2002) del suero de la zarigüeya o chucha común *Didelphis marsupialis* (Mammalia: Marsupialia), es el primer inhibidor de miotoxinas aislado del suero de un mamífero, y le confiere a este marsupial inmunidad natural contra los efectos miotóxicos de las II PLA₂s, uno de los principales componentes del veneno de serpientes vipéridas, de las cuales estos marsupiales son predadores ocasionales. Sin embargo no evita los efectos anticoagulantes ni intracerebroventriculares letales de las II PLA₂ Asp49 (mt I). Estos últimos son efectos enzimáticos de estas II PLA₂, lo cual corroboró que en estas moléculas, las porciones miotóxicas son diferentes a las enzimáticas, siendo DM64 capaz de inhibir las primeras mas no las últimas. Las II PLA₂ Lys49 (mt II), como ya se dijo, carecen de efectos catalíticos, por lo cual DM64 inhibió completamente los efectos de esta toxina. **Rocha et al.** (2002) hallaron que DM64 es una glicoproteína ácida con un punto isoeléctrico de 4.5, compuesta por 15% de carbohidrato y con un peso molecular de 63,659 Da. Mediante técnicas cromatográficas se sugirió que la proteína nativa existe como un dímero de 110 kDa. Esta proteína mostró homología estructural con DM43 y a OPRIN (contraparte de DM43 en *Didelphis virginianus*: **Neves-Ferreira et al.**, 2000). Se halló una homología del 78% con DM43 y OPRIN, y de un 50% con la α 1BG humana, miembro esta última de la FSIG (**Ishioka et al.**, 1986). Estas proteínas presentan dominios tipo Ig: 5 en DM64 (**Rocha et al.**, 2002) y α ₁B-glicoproteína (**Ishioka et al.**, 1986), y 3 en DM43 (**Neves-Ferreira et al.**, 2002). Otras diferencias entre DM64 y DM43 incluyen un gap, en la primera (DM64), de cinco aminoácidos en el tercer dominio (**Rocha et al.**, 2002), en un loop que se cree es importante para la acción anti-metaloproteasa de DM43 (**Neves-**

Ferreira et al., 2002). La diferencia mas importante entre DM43 y DM64 es que esta última, y como ya se implicó, tiene dos dominios adicionales en el extremo C-terminal. Según **Rocha et al.** (2002) esto sugiere que la región de enlace con la miotoxina puede estar presente en estos dominios adicionales tipo Ig, y que por lo tanto estas dos diferencias (gap amino-acídico y dos dominios adicionales) podrían explicar la diferencia de función entre DM43 (anti-metaloproteasa) y DM64 (anti-miotoxina).

1.7. Afiliaciones de las proteínas antiveneno tipo DM:

Las proteínas antiveneno tipo DM repasadas aquí, es decir: DM40, DM43 (**Neves-Ferreira et al.**, 2000); DM64 (**Rocha et al.**, 2002); OPRIN (**Catanese & Kress**, 1992); PO41 (**Jurgilas et al.**, 2003) AHF1/2 y AHF3 (**Qi et al.**, 1994a, 1994b) por propiedades fisico-químicas (**Perales & Domont**, 2002) son antihemorráginas de bajo peso molecular (excepto DM64 que es una anti-miotoxina). Además, funcionalmente, y sin considerarlas inmunoglobulinas, se pueden clasificar como parte de los mecanismos naturales o innatos de inmunidad (**Lizano et al.**, 2003; **Neves-Ferreira et al.**, 2002; **Perales & Domont**, 2002; **Rocha et al.**, 2002), dado que cumplen con la primera y más importante característica de las tres que se requieren para esta clasificación: estos mecanismos están presentes antes de la exposición a las macromoléculas extrajeras, es decir, están disponibles como macro-moléculas solubles circulantes en la sangre, listas a proteger contra la toxina (**Lizano et al.**, 2003), así está nunca haya entrado antes a la sangre del animal. Y teniendo en cuenta sus secuencias aminoacídicas (**Perales & Domont**, 2002) y por ende sus altas homologías con la α 1BG humana, son clasificados como miembros de la FSIG. De hecho OPRIN y DM64, son tomadas como α 1BGs de *Didelphis*, según **Catanese & Kress** (1992) y **Lizano et al.** (2003), respectivamente. Por lo tanto las proteínas tipo DM son α 1BGs.

1.7.1. α 1B-Glicoproteína Humana (α 1BG) y Familia Supergen de las Inmuglobulinas (FSIG): La α 1BG estudiada por **Ishioka et al.** (1986), tiene un peso molecular de 68 kDa, un porcentaje de carbohidratos de 13.3, y presencia de heterogenicidad electroforética cerca de su punto isoeléctrico (4.4 a 4.6). Consiste de un solo polipéptido de 474 aminoácidos con cuatro oligosacáridos glucosalinos, dentro de lo cual cabe destacar un alto contenido de Leucina (12.0 mol %). Tiene 10 residuos de cisteína vinculados por 5 puentes disulfuro. La α 1BG presenta duplicación interna y contiene 5 dominios estructurales repetidos, cada uno con 92-98 residuos. La homología entre los 5 dominios es estadísticamente significativa; es posible que el dominio III sea el que evolutivamente este más cerca del

bloque primordial de unos 95 aminoácidos, pues es el que mas homología guarda con los demás dominios de la misma proteína y con otras proteínas de la FSIG como el receptor poli-Ig (**Ishioka et al.**, 1986). Las proteínas tipo DM, por su homología con la α 1BG, han sido clasificadas dentro de la FSIG. Una familia supergen es un conjunto de familias multigénicas relacionadas por sus secuencias, es decir por ancestría común, pero no necesariamente con funciones similares, y a su vez una familia multigénica es un grupo de genes homólogos con funciones similares (**Hood et al.**, 1985). Muchos genes de la FSIG son inmunoglobulinas y/o están involucrados en la respuesta inmune de vertebrados, y están constituidas por unidades polipeptídicas de origen evolutivo común. Las similitudes entre estas unidades homólogas se registran a niveles estructurales primarios, secundarios y terciarios (**Hood et al.**, 1985), como también a nivel de organización génica. Cada unidad homóloga tiene aproximadamente 110 amino-ácidos y tiene un puente central de disulfuro a lo largo de 65 de ellos. Cada unidad homóloga se pliega para formar una estructura terciaria conservada, llamada el plegamiento de los anticuerpos. Parejas de unidades homólogas se pliegan para formar dominios discretos. Otros miembros de la FSIG son polipéptidos de superficie celular que ayudan en la respuesta inmune de vertebrados y están constituidos por una o más unidades homólogas tipo inmunoglobulinas. A nivel de DNA, cada unidad homóloga es generalmente codificada por un exón particular, lo cual muestra una relación entre las características estructurales de estas proteínas y la distribución intrones/exones de los genes correspondientes (**Hood, et al.**, 1985). El gen que dio origen a la FSIG, podría haber sido uno que codificara para una proteína de superficie celular, la cual a su vez estaría conformada

por un péptido líder, una inmunoglobulina y una región transmembranal. La tendencia a interactuar entre sí de las unidades de homología de esta familia supergen, sugieren que la proteína primordial de la misma podría haber sido un homodímero. Y la gran variedad de proteínas presentes en esta familia supergen podría haberse obtenido por los siguientes procesos: 1) Mutación, delección e inserción de nucleótidos. 2) Mutación, delección, duplicación y entrecruzamiento de exones. 3) Duplicación y delección de genes. 4) Duplicación de familias multigénicas completas.

De esta forma la evolución de las proteínas miembros la familia supergen de las inmunoglobulinas se aceleró, a medida que los cambios iban sucediéndose en niveles jerárquicos genéticos mas complejos e inclusivos, es decir de nucleótidos individuales a familias multigénicas completas (**Hood et al.**, 1985). Teniendo en cuenta la figura 4, la familia supergen de las inmunoglobulinas se inicio por un receptor de superficie celular, el cual dio origen a los siguientes "linajes" principales: la glicoproteína Thy1, el receptor Poli-Ig, Inmunoglobulinas Pesadas, Lyt2 (molécula T8), Receptores de Células T, MHC (Complejo de Histocompatibilidad Mayor). Según **Ishioka et al.** (1986) la α 1BG humana muestra homología estadísticamente significativa con el componente secretorio de la IgA humana (IgA-SC) y también con la porción extracelular del receptor para el transporte transepitelial de inmunoglobulinas poliméricas (IgA e IgM). **Mostov et al.** (1984) citados por los mismos **Ishioka et al.** (1986) resumieron el largo nombre de esta última proteína como Receptor Poli-Ig o Poli-IgR, y dijeron que este es el precursor de la IgA-SC. En pocas palabras esto lo que está diciendo es que es la α 1BG muestra homología estadísticamente sig-

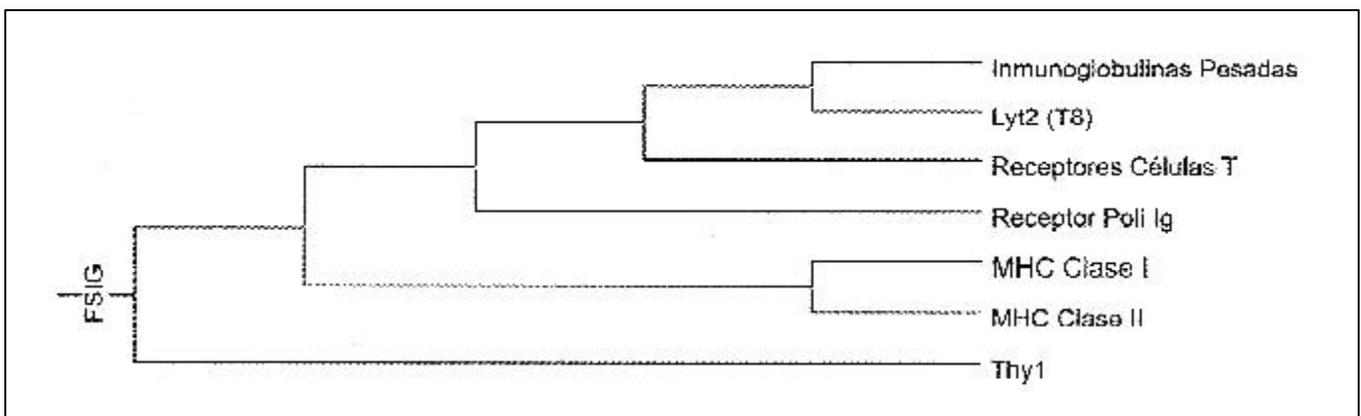


Figura 4. Filogenia de la Familia Supergen de las Inmunoglobulinas (FSIG). Propuesta filogenética sobre las relaciones evolutivas entre los principales miembros de la FSIG modificada a partir de Hood *et al.* (1985) quienes se basaron en la similitud secuencial y estructural (exónica/intrónica) entre los genes en cuestión.

nificativa con el Poli-IgR. Por lo tanto se puede decir que las proteínas antiveneno tipo DM pertenecen al linaje Poly-IgR de la genealogía de la FSIG (Figura 4; Hood *et al.*, 1985)? Si la respuesta a esta pregunta es positiva, y teniendo en cuenta que según los mismos autores (Hood *et al.*, 1985) el Poli-IgR está compuesto de 5 dominios como lo están DM64 y α 1BG, se podría pensar que DM43, que tiene 3 dominios, desciende de DM64 y no al revés como lo sugieren Rocha *et al.* (2002)?

Discusión, conclusiones y preguntas pendientes

Además de las anteriores preguntas, ciertamente esta revisión deja mas cuestiones por resolver y ayuda a identificar aspectos interesantes a investigar en cuanto a serpientes, sus venenos y sus defensas. Es un “macro-tema” que invita a ser abordado desde varias disciplinas. Se necesita por ejemplo ayuda de la Epidemiología y ramas relacionadas para mejorar la calidad y cantidad de las estadísticas de accidentes ofídicos. En cuanto a biología, falta recabar mas datos de tipo morfológico (fósiles), biogeográfico y molecular para llegar a construir filogenias ofídicas menos controversiales. Dentro de esto se destacan dos grandes temas a investigar: uno es la evolución de las primeras serpientes (origen acuático, terrestre o fosorial?), y las relaciones del grupo mas diverso y menos estudiado de serpientes: los “colúbridos”. Tienen los sistemas de veneno de los colubroideos un origen común? Parece que sí, pero esto debe ser investigado mas a fondo, dentro de lo cual, hacen falta otra vez, mas estudios sobre los venenos de colúbridos. La acelerada evolución de los venenos de serpientes reta la extendida teoría neutral de la evolución molecular, lo cual también resulta interesante. Además estos venenos y las defensas que han evolucionado en las principales presas de las serpientes colubroideas, los mamíferos, son un interesante escenario para estudiar casos de “carreras armamentistas evolutivas”. De aquí saldrían varias preguntas, como: así como los venenos de serpientes están evolucionando de una forma acelerada, lo están las defensas contra estos en mamíferos también? Teniendo en cuenta lo revisado para las propiedades antihemorrágicas del suero de ardillas del género *Spermophilus* se podría decir que no, pues la variación interpoblacional en la efectividad de estas defensas da para pensar que el desarrollo de éstas depende de largos tiempos geológicos de exposición a sus predadores venenosos vipéridos. Pero teniendo en cuenta que también se han observado propiedades antihemorrágicas en sueros de otros roedores, como múridos y heterómidos, y teniendo en cuenta que Rodentia es el grupo de mamíferos que más rápido está evolucionando (camadas grandes y generaciones cortas), no estaría este grupo, o al menos

los “roedores tipo ratón” evolucionando defensas antiveneno de serpientes de una forma acelerada también? Curiosamente, así como en serpientes el grupo más diverso y menos estudiado son los colúbridos, en cuanto a defensas antiveneno de serpientes, el grupo de mamíferos menos estudiado son los roedores, los cuales también son el más diverso de la clase Mammalia.

Pasando a campos mas aplicados de la biología, es decir la medicina, otras preguntas interesantes son: ¿Cuándo aparecieron, cómo evolucionan y cómo llevan a cabo, a nivel molecular, su acción antiveneno las a1BGs tipo DM? Las respuestas a estas preguntas ayudarían al desarrollo de terapias anti-ofídicas más efectivas, pues los antivenenos convencionales son algunas veces solo parcialmente efectivos y pueden producir reacciones inmunes adversas como choques anafilácticos, siendo los PLIs y anti-SVMPs naturales potencialmente más efectivos (Hains & Broady, 2000, Lizano *et al.*, 2003; Neves-Ferreira *et al.*, 1997, 2000; Ovadia, 1978; Pérez & Sánchez, 1999; Soares *et al.*, 2003; Thwin & Gopalakrishnakone, 1998, Weissenberg *et al.*, 1991). Estos es lo que aquí se ha llamado el interés directo de la medicina en estos temas: el desarrollo de mejores terapias anti-ofídicas. Además, y como ya se dijo, las SVMPs y PLAs de serpientes también tienen sus contrapartes endógenas normales no venenosas, y muchas enfermedades son el resultado de la disrupción del balance natural entre estas y sus inhibidores: entre PLAs y PLIs: asma, choques sépticos, inflamación, osteoartritis, reumatismo (Soares *et al.*, 2003; Thwin *et al.*, 2000); y entre MMPs y TIMPs: arterioesclerosis, artritis, diabetes, neoplasias, y condiciones oftálmicas, ortopédicas y periodontales (Pérez & Sánchez, 1999). En este sentido por ejemplo Hains & Broady (2000) encontraron en el elárido Australiano *Notechis ater* un PLI (NAI) que inhibe la II PLA₂s humanas involucradas en artritis. Por lo tanto entre mas se sepa de SVMPs y PLAs venenosas y de sus moléculas inhibidoras, mas cerca se estará de darle solución a estas patologías (Hains & Broady, 2000). Esto constituye un interés directo de la medicina en estos temas: el parecido de las interacciones de PLAs-PLIs y SVMPs-antiSVMPs, y las patologías no venenosas mencionadas.

Agradecimientos

Los autores de esta revisión agradecen, por posibilitar la ejecución del proyecto del cual hace parte la misma, a las directivas del Grupo de Biología Integrativa de la Escuela de Ciencias Básicas Médicas de la Facultad de Salud de la Universidad del Valle, y especialmente al Director del Postgrado de dicha Escuela, Dr. Leonardo Fierro, por la diligencia y deferencia mostrada.

Bibliografía

- Allard M.W., Honeycutt R.L. & M. J. Novacek.** 1999. Advances in Higher Level Mammalian Relationships. *Cladistics* 15: 213-219.
- Biardi J.E., Coss R.G. & D.G. Smith.** 2000. California Ground Squirrel (*Spermophilus beecheyi*) Blood Sera Inhibits Crotalid Venom Proteolytic Activity. *Toxicon* 38(5): 713-721.
- Bjarnason, J.B. & J.W. Fox.** 1994. Hemorrhagic Metalloproteases from Snake Venoms. *Pharmac. Ther.* 62 (3): 325-372.
- Caldwell M.W. & M.S.Y. Lee.** 1997. A Snake with Legs From the Marine Cretaceous of the East. *Nature* 386: 705-709.
- Catanese J.J. & L.F. Kress.** 1992. Isolation from Opossum Serum of a Metalloproteinase Inhibitor Homologous to Human α 1B-glycoprotein. *Biochemistry* 31: 410-418.
- Chippaux J.P. & Goyfon M.** 1998. Venoms, Antivenoms and Immunotherapy. *Toxicon* 36(6):823-846.
- Chiszar D. & H.M. Smith.** 2002. Colubrid Envenomations in the United States. *J. Toxicol.—Toxin Reviews* 21(1&2): 85–104.
- de-Wit C.A.** 1982. Resistance of the Prairie Vole (*Microtus ochrogaster*) and The Woodrat (*Neotoma floridana*), in Kansas, to Venom of the Osage Copperhead (*Agkistrodon contortrix phaeogaster*). *Toxicon* 20(4): 709-714.
- _____ & **B.R. Westrom.** 1987a. Venom Resistance in The Hedgehog, *Erinaceus europaeus*: Purification and Identification of Macroglobulin Inhibitors as Plasma Antihemorrhagic Factors. *Toxicon* 25(3): 315-23.
- _____. 1987b. Purification and Characterization of α 2-, α 2 β - and β -Macroglobulin Inhibitors In the Hedgehog, *Erinaceus europaeus*: β -Macroglobulin Identified as the Plasma Antihemorrhagic Factor. *Toxicon* 25(11): 1209-1219.
- Deshimaru M., Ogawa T., Nakashima K., Nobuhisa I., Chijiwa T., Shimohigashi Y., Fukumaki Y., Niwa M., Yamashina I., Hattori S. & M. Ohno.** 1996. Accelerated Evolution of Crotalinae Snake Venom Gland Serine Proteases. *FEBS Lett* 397(1): 83-88.
- Domont G.B., Perales J. & H. Moussatche.** 1991. Natural Anti-Snake Venom Proteins. *Toxicon* 29(10):1183-94.
- Fortes-Dias C.L., Diniz C.R., Liu T.H. & Y. Lin.** 1994. A Phospholipase A_2 Inhibitor from the Plasma of the South American Rattlesnake (*Crotalus durissus terrificus*). *J Biol Chem* 269: 15641-15646.
- Fry B.G.** 2005. From Genome to “Venome”: Molecular Origin and Evolution of the Snake Venom Proteome Inferred From Phylogenetic Analysis of Toxin Sequences and Related Body Proteins. *Genome Research* 15: 403-420.
- _____, **Wüster W. R, Ramjan S.F.R., Jackson T., Martelli P. & R.M Kini.** 2003. Analysis of Colubroidea snake Venoms by Liquid Chromatography with Mass Spectrometry: Evolutionary and Toxinological Implications. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 17: 2047 - 2062.
- _____ & **W. Wüster.** 2004. Assembling an Arsenal: Origin and Evolution of the Snake Venom Proteome Inferred from Phylogenetic Analysis of Toxin Sequences. *Molecular Biology and Evolution* 21(5): 870-883.
- García V.E. & J.C. Pérez.** 1984. The Purification and Characterization of an Antihemorrhagic Factor in Woodrat (*Neotoma micropus*) Serum. *Toxicon* 22(1): 129-138.
- Gold B.S., Dart R.C. & R.A. Barish.** 2002. Bites of Venomous Snakes. *N. Engl. J. Med.* 347: 347-356.
- Greene H.W. & D. Cundall.** 2000. Limbless Tetrapods and Snakes with Legs. *Science* 287:1939-1941.
- Gutiérrez J.M. & A. Rucavado.** 2000. Snake Venom Metalloproteases: Their Role in The Pathogenesis of Local Tissue Damage. *Biochimie* 82(9-10): 841-50.
- Gutiérrez J.M. & M. Sasa.** 2002. Bites and Envenomations by Colubrid Snakes in Mexico and Central America. *J. Toxicol-Toxin Reviews* 21(1&2):105-115.
- Gutiérrez J.M. & C.L. Ownby.** 2003. Skeletal Muscle Degeneration Induced by Venom Phospholipases A_2 : Insights Into the Mechanisms of Local and Systemic Myotoxicity. *Toxicon* 42(8): 915-931.
- Hains P.G. & K.W. Broady.** 2000. Purification and Inhibitory Profile of Phospholipase A_2 Inhibitors from Australian Elapid Sera. *Biochem J* 346: 139-146.
- Hains P.G., Sung K.L., Tseng A. & K.W. Broady.** 2000. Functional Characteristics of a Phospholipase A_2 Inhibitor from *Notechis ater* Serum. *J Biol Chem* 275: 983-991.
- _____, **Nield B., Skuloski S., Dunn R. & K. Broady.** 2001. Sequencing and Two-dimensional Structure Prediction of a Phospholipase A_2 Inhibitor from the Serum of the Common Tiger Snake (*Notechis scutatus*). *J Mol Biol* 312: 875-884.
- Heise P.J., Maxson L.R., Dowling H.G. & S. B. Hedges.** 1995. Higher-Level Snake Phylogeny Inferred from Mitochondrial DNA Sequences of 12s rRNA and 16s rRNA Genes. *Mol Biol Evol* 12(2): 259-265.
- Higashino K., Yokota Y., Ono T., Kamitani S., Arita H. & K. Hanasaki.** 2002. Identification of a Soluble Form Phospholipase A_2 Receptor as a Circulating Endogenous Inhibitor for Secretory Phospholipase A_2 . *J Biol Chem* 277(16): 13583-13588.
- Hood L., Kronenberg M. & T. Hunkapiller.** 1985. T Cell Antigen Receptors and the Immunoglobulin Supergene Family. *Cell* 40: 225-229.
- Ishioka N., Takahashi N. & F.W. Putnam.** 1986. Amino Acid Sequence of Human Plasma α -1B-glycoprotein: Homology to the Immunoglobulin Supergene Family. *PNAS* 83: 2363-2367.
- Jia L.G., Shimokawa K., Bjarnason J.B. & J.W. Fox.** 1996. Snake Venom Metalloproteases: Structure, Function and Relationship to the ADAMs Family of Proteins. *Toxicon* 34(11-12): 1269-1276.
- Jurgilas P.B., Neves-Ferreira A.G.C., Domont G.B. & J. Perales.** 2003. PO41, a Snake Venom Metalloprotease Inhibitor Isolated From Philander Opossum Serum. *Toxicon* 42: 621-628.
- Kamiguti A.S., Hay C.R., Theakston R.D. & M. Zuzel.** 1996. Insights into the Mechanism of Haemorrhage Caused by Snake Venom Metalloproteases. *Toxicon* 34(6): 627-642.

- _____. **Zuzel M. & R.D. Theakston.** 1998. Snake Venom Metalloproteases and Disintegrins: Interactions With Cells. *Braz J Med Biol Res* 31(7): 853-62.
- Kardong K.V.** 1996. Snake Toxins and Venoms: An Evolutionary Perspective. *Herpetologica* 52(1): 36-46.
- _____. 2002. Colubrid Snakes and Duvernoy's "Venom" Glands. *J. Toxicol.—Toxin Reviews* 21(1&2): 1-19.
- Kelly C.M.R., Barker N.P. & M.H. Villet.** 2003. Phylogenetics of Advanced Snakes (Caenophidia) Based on Four Mitochondrial Genes. *Systematic Biology* 52(4):439-459.
- Kogaki H., Inoue S., Ikeda K., Samejima Y., Omori-Satoh T. & K. Hamaguchi.** 1989. Isolation and Fundamental Properties of a Phospholipase A₂ Inhibitor from the Blood Plasma of *Timeresurus flavoviridis*. *J Biochem* 106: 966-971.
- Lee M.S.Y. & J.D. Scanlon.** 2002. Snake Phylogeny Based on Osteology, Soft Anatomy and Ecology. *Biol Rev Camb Philos Soc* 77: 333-401.
- Lizano S., Lomonte B., Fox J.W. & J.M. Gutiérrez.** 1997. Biochemical Characterization and Pharmacological Properties of an Inhibitor of Basic Phospholipase A₂ Myotoxins from the Plasma of the Snake *Bothrops asper*. *Biochem J* 326: 853-859.
- _____, **Angulo Y., Lomonte B., Fox J.W., Lambeau G., Lazdunski M. & J.M. Gutiérrez.** 2000. Two Phospholipase A₂ Inhibitors from the Plasma of *Cerrophidion (Bothrops) godmani* which selectively inhibit two different Group II Phospholipase A₂ Myotoxins from its own Venom: Isolation, Molecular Cloning and Biological Properties. *Biochem J* 346: 631-639.
- Lizano S., Domont G. & J. Perales.** 2003. Natural Phospholipase A₂ Myotoxin Inhibitor Proteins from Snakes, Mammals and Plants. *Toxicon* 42: 963-977.
- Liu F.G.R., Miyamoto M.M., Freire N.P., Ong, P.Q., Tennant M.R., Young T.S. & K.F. Gugel.** 2001. Molecular and Morphological Supertrees for Eutherian (Placental) Mammals. *Science* 291: 1786-1789.
- Lomonte B., Angulo Y. & L. Calderón.** 2003. An Overview of Lysine-Phospholipase A₂ Myotoxins from Crotalid Snake Venoms and their Structural Determinants of Myotoxic Action. *Toxicon* 42(8): 885-901.
- Martínez R.R., Pérez J.C., Sánchez E.E. & R. Campos.** 1999. The Antihemorrhagic Factor of the Mexican Ground Squirrel, (*Spermophilus mexicanus*). *Toxicon* 37: 949-954.
- Matsui T., Fujimura Y. & K. Titani.** 2000. Snake Venom Proteases Affecting Hemostasis and Thrombosis. *Biochim Biophys Acta* 1477(1-2): 146-156.
- Mattison C.** 1995. *The Encyclopedia of Snakes*. Facts on Life, Inc. New York. 256 pp.
- Melo P.A. & G. Suarez-Kurtz.** 1988. Release of Sarcoplasmic Enzymes from Skeletal Muscle by *Bothrops jaracussu* venom: Antagonism by Heparin and by the Serum of South American Marsupials. *Toxicon* 26(1):87-95.
- Murakami M.T. & R.K. Arni.** 2003. A Structure Based Model for Liposome Disruption and the Role of Catalytic Activity in Myotoxic Phospholipase A₂s. *Toxicon* 42(8): 903-913.
- Murphy W. J., Eizirik E., Johnson E., Zhang Y.P., Ryder O.A. & S.J. O'Brien.** 2001. Molecular Phylogenetics and the Origins of Placental Mammals. *Nature* 409: 614-618.
- Nei M. & S. Kumar. 2000. *Molecular Evolution and Phylogenetics*. Oxford University Press. 333 pp.
- Neves-Ferreira A.G.C., Perales J., Ovidia M., Moussatché H. & G.B. Domont.** 1997. Inhibitory Properties of the Antibiothropic Complex from the South American Opossum (*Didelphis marsupialis*) Serum. *Toxicon* 35(6): 849-863.
- _____, **Cardinale N.; Rocha S.L.G., Perales J. & G.B. Domont.** 2000. Isolation and Characterization of DM40 and DM43, Two Snake Venom Metalloprotease Inhibitors from *Didelphis marsupialis* Serum. *Biochim Biophys Acta* 1474: 309-320.
- _____, **Perales J., Fox J.W., Shannon J.D., Makino D.L., Garratt R.C. & G.B. Domont.** 2002. Structural and Functional Analyses of DM43, a Snake Venom Metalloprotease Inhibitor from *Didelphis marsupialis* Serum. *J Biol Chem* 277: 13129-13137.
- Nobuhisa I., Inamasu S., Nakai M., Tatsui A., Mimori T., Ogawa T., Shimohigashi Y., Fukumaki Y., Hattori S., Kihara H. & M Ohno.** 1997. Characterization and Evolution of a Gene Encoding a *Timeresurus flavoviridis* Serum Protein that Inhibits Basic Phospholipase A₂ Isozymes in the Snake's Venom. *Eur J Biochem (FEBS)* 249: 838-845.
- Nobuhisa I., Chiwata T., Fukumaki Y., Hattori S., Shimohigashi Y. & M. Ohno.** 1998. Structural Elements of *Timeresurus flavoviridis* Serum Inhibitors for Recognition of its Venoms Phospholipase A₂ Isozymes. *FEBS Lett.* 429: 385-389.
- Núñez C.C., Angulo Y. & B. Lomonte.** 2001. Identification of the Myotoxic site of the Lys49 Phospholipase A₂ from *Agkistrodon piscivorus piscivorus* Snake Venom: Synthetic C-terminal Peptides from Lys49, but not from Asp49 Myotoxins, Exert Membrane-damaging Activities. *Toxicon* 39(10): 1587-1594.
- Ohkura N., Inoue S., Ikeda K. & K. Hayashi.** 1993. Isolation and Amino Acid Sequence of a Phospholipase A₂ Inhibitor from the Blood Plasma of *Agkistrodon blomhoffii siniticus*. *J Biochem* 113: 413-419.
- _____. 1994a. The Two Subunits of a Phospholipase A₂ Inhibitor from the Plasma of Thailand Cobra Having Structural Similarity to Urokinase-type Plasminogen Activator Receptor and LY-6 Related Proteins. *Biochem Biophys Res Commun* 204: 1212-1218.
- _____. 1994b. Isolation and Characterization of a Phospholipase A₂ Inhibitor from the blood plasma of the Thailand Cobra, *Naja naja kaouthia*. *Biochem Biophys Res Commun* 200: 784-788.
- Ohkura N., Okuhara H., Inoue S., Ikeda K. & K. Hayashi.** 1997. Purification and Characterization of Three Distinct Types of Phospholipase A₂ Inhibitors from the Blood Plasma of the Chinese Mamushi, *Agkistrodon blomhoffii siniticus*. *Biochem J* 325: 527-531.
- Ohkura N., Kitahara Y., Inoue S., Ikeda K. & K. Hayashi.** 1999. Isolation and Amino Acid Sequence of a Phospholipase A₂ Inhibitor from the Blood Plasma of the Sea Krait, *Laticauda semifasciata*. *J Biochem* 125: 375-382.

- Ohno M., Chijiwa T., Oda-Ueda N., Ogawa T. & S. Hattori.** 2003. Molecular Evolution of Myotoxic Phospholipases A₂ from Snake Venom. *Toxicon* 42(8): 841-854.
- Okumura K., Ohkura N., Inoue S., Ikeda K. & K. Hayashi.** 1998. A Novel Phospholipase A₂ Inhibitor with Leucine-rich Repeats from the Blood Plasma of *Agkistrodon blomhoffii siniticus*: Sequence Homologies with Human Leucine-rich α₂-glycoprotein. *J Biol Chem* 273: 19469-19475.
- _____, **Masui K., Inoue S., Ikeda K. & K. Kayashi.** 1999. Purification, Characterization and cDNA Cloning of a Phospholipase A₂ Inhibitor from the Serum of the Non-venomous Snake *Elaphe quadrivirgata*. *Biochem J* 341: 165-171.
- Okumura K., Inoue S., Ikeda K. & K. Hayashi.** 2002. Identification of β-type Phospholipase A₂ Inhibitor in a Nonvenomous Snake, *Elaphe quadrivirgata*. *Arch Biochem Biophys*. 408: 124-130.
- Omori-Satoh T., Nagaoka Y. & D. Mebs.** 1994. Muscle Extract of Hedgehog, *Erinaceus europaeus*, Inhibits Hemorrhagic Activity of Snake Venoms. *Toxicon* 32 (10): 1279-1281.
- Omori-Satoh T., Takahashi M., Nagaoka Y. & D. Mebs.** 1998. Comparison of Antihemorrhagic Activities in Skeletal Muscle Extracts from Various Animals Against *Bothrops jararaca* Snake Venom. *Toxicon* 36 (2): 421-423
- _____, **Yamakawa Y. & D. Mebs.** 2000. The Antihemorrhagic Factor, Erinacin, from the European Hedgehog (*Erinaceus europaeus*), a Metalloprotease Inhibitor of Large Molecular Size Possessing Ficolin/Opsonin P35 Lectin Domains. *Toxicon* 38(11): 1561-1580.
- Ovadia M. & E. Kochva.** 1977. Neutralization of Viperidae and Elapidae Snake Venoms by Sera of Different Animals. *Toxicon* 15(6): 541-547.
- Ovadia M.** 1978. Purification and Characterization of an Antihemorrhagic Factor from the Serum of the Snake *Vipera palaestinae*. *Toxicon* 16(6): 661-672.
- Ownby C.L., Colberg T.R. & H.S. Selistre-de-Araujo.** 1998. Phospholipase A₂ Toxins: Diversity in Structure and Function. 12th World Congress on Animal, Plant and Microbial Toxins. *Toxicon* 36(9): 1219-1232.
- Perales J., Moussatche H., Oliveira B., Marangoni S. & G.B. Domont.** 1994. Isolation and Partial Characterization of an Antibothropic Complex From Serum of South American Didelphidae. *Toxicon* 32: 1237-1249.
- Perales J., Villela C.G., Domont G.B., Chourmet V., Saliou B., Moussatché H., Bon C. & G. Faure.** 1995. Molecular Structure and Mechanism of Action of the Crotoxin Inhibitor from *Crotalus durissus terrificus* Serum. *Eur J Biochem (FEBS)* 227:19-26.
- Perales J. & G.B. Domont.** 2002. Are Inhibitors of Metalloproteases, Phospholipases A₂ and Myotoxins Members of the Innate Immune System?. Pp: 435-455 *En: Menéz A. (ed.). Perspectives in Molecular Toxinology.* John Wiley & Sons. 485 pp.
- Pérez J.C., Haws W.C., García V.E. & B.M. Jennings.** 1978. Resistance of Warm-Blooded Animals to Snake Venoms. *Toxicon* 16(4): 375-383.
- _____, **Pichyangkul S. & V.E. García.** 1979. The resistance of three species of warm-blooded animals to western diamondback rattlesnake (*Crotalus atrox*) venom. *Toxicon* 17(6): 601-607.
- _____, **& E.E. Sánchez.** 1999. Natural Protease Inhibitors to Hemorrhagins in Snake Venoms and Their Potential Use in Medicine. *Toxicon* 37(5): 703-28.
- Pichyangkul S. & Pérez J.C.** 1981. Purification and Characterization of a Naturally Occurring Antihemorrhagic Factor in The Serum of The Hispid Cotton Rat (*Sigmodon Hispidus*). *Toxicon* 19(2): 205-215.
- Poran N.S., Coss R.G. & E. Benjamini.** 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.
- Pough F.H., Janis C.M. & J.B. Heiser.** 1999. Vertebrate Life. Fifth Edition. Prentice Hall Inc., Simon & Shuster Inc. New Jersey. 733 pp.
- Qi Z.Q., Yonaha K., Tomihara Y. & S. Toyama.** 1994a. Characterization of the Antihemorrhagic Factors of Mongoose (*Herpestes edwardsii*). *Toxicon* 32(11): 1459-1469.
- Qi Z.Q., Yonaha K., Tomihara Y. & S. Toyama.** 1994b. Isolation of Peptides Homologous to Domains of Human α1B-Glycoprotein From a Mongoose Antihemorrhagic Factor. *Toxicon* 33 (2):241-245.
- Rocha S.L.G., Lamonte B., Neves-Ferreira A.G.C., Trugilho M.R.O., Junqueira-de-Azevedo I.L.M., Ho P.L., Domont G.B., Gutiérrez J.M. & J. Perales.** 2002. Functional Analysis of DM64, an Antimyotoxic Protein with immunoglobulin-like Structure from *Didelphis marsupialis* serum. *Eur J Biochem* 269: 6052-6062.
- Scanlon J.D. & M.S. Lee.** 2000. The Pleistocene Serpent Wonambi and the Early Evolution of Snakes. *Nature* 403(6768): 416-420.
- Schevitz R.W., Bach N.J., Carlson D.G., Chirgadze N.Y., Clawson D.K., Dillard R.D., Draheim S.E., Hartley L.W., Jones N.D. & E.D. Mihelich.** 1995. Structure-Based Design of the first Potent and Selective Inhibitor of Human Non-Pancreatic Secretory Phospholipase A₂. *Nat Struct Biol* 2(6): 458-465.
- Slowinski J.B. & R. Lawson.** 2002. Snake Phylogeny: Evidence From Nuclear and Mitochondrial Genes. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 24: 194-202.
- Soares A.M., Rodrigues V.M., Borges M.H., Andriao-Escarso S.H., Cunha O.A., Homsí-Brandeburgo M.I. & J.R. Giglio.** 1997. Inhibition of Proteases, Myotoxins and Phospholipases A₂ from Bothrops Venoms by the Heteromeric Protein Complex of *Didelphis Albiventris* Opossum Serum. *Biochem Mol Biol Int* 43(5): 1091-1099.
- Soares A.M., Marcussi S., Stábeli R.G., França S.C., Giglio J.R., Ward R.J. & E.C. Arantes.** 2003. Structural and Functional Analysis of BmjMIP, a Phospholipase A₂ Myotoxin Inhibitor Protein from *Bothrops moojeni* plasma. *Biochem Biophys Res Comm* 302:193-200.
- Springer M.S. & W.W. de Jong.** 2001. Which Mammalian Supertree to Bark Up?. *Science* 291: 1709-1711.

- Symonds M.R.** 2005. Phylogeny and Life Histories of the 'Insectivora': Controversies and Consequences. *Biol Rev Camb Philos Soc* 80(1): 93-128.
- Tchernov E., Rieppel O., Zaher H., Polcyn M.J. & L.L. Jacobs.** 2000. A Fossil Snake with Limbs. *Science* 287: 2010-2012.
- Thwin M.M. & P. Gopalakrishnakone.** 1998. Snake Envenomation and Protective Natural Endogenous Proteins: A Mini Review of Recent Developments. *Toxicon* 36(11): 1471-1482.
- _____, **Gopalakrishnakone P., Kini R.M., Armugam A. & K. Jeyaseelan.** 2000. Recombinant Antitoxic and Anti-inflammatory Factor from the Nonvenomous Snake *Python reticulatus*: Phospholipase A₂ Inhibition and Venom Neutralizing Potential. *Biochemistry* 39: 9604-9611.
- Tomihara Y., Yonaha K., Nozaki M., Yamakawa M., Kamura T. & S. Toyama.** 1987. Purification of three antihemorrhagic factors from the serum of a mongoose (*Herpestes edwardsii*). *Toxicon* 25(6): 685-689.
- Townsend T.M., Larson A., Louis E. & J.R. Macey.** 2004. Molecular Phylogenetics of Squamata: The Position of Snakes, Amphisbaenians, and Dibamids, and the Root of the Squamate Tree. *Systematic Biology* 53(5):735-757.
- Vidal N.** 2002. Colubroid Systematics: Evidence for an Early Appearance of the Venom Apparatus Followed by Extensive Evolutionary Tinkering. *J Toxicol Toxin Rev* 21:21-41.
- _____, **S.B. Hedges.** 2002. Higher-Level Relationships of Snakes Inferred from Four Nuclear and Mitochondrial Genes. *C.R. Biologies* 325: 977-985.
- Weissenberg S., Ovadia M., Fleminger G. & E. Kochva.** 1991. Antihemorrhagic Factors from the Blood Serum of the Western Diamondback Rattlesnake *Crotalus atrox*. *Toxicon* Volume 29(7): 807-818.
- Yu C.** 1998. The NMR Studies of Cardiotoxins from Taiwan cobra (*Naja naja atra*): Structure, Dynamics, Folding and Interaction. 12th World Congress on Animal, Plant and Microbial Toxins. *Toxicon* 36(9): 1233-1263.

Recibido el 27 de febrero de 2006

Aceptado para su publicación el 23 de enero de 2007