

TOXINAS PROVENIENTES DE VENENOS DE SERPIENTE: BLANCOS TERAPÉUTICOS, HERRAMIENTAS EN INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA Y AGENTES CON POTENCIAL TERAPÉUTICO

Jaime Andrés Pereañez*, Ph.D.^{1,2}, Arley Camilo Patiño, Ph.D.¹, Isabel Cristina Henao-Castañeda, Ph.D.¹

¹Programa de Ofidismo/Escurpionismo, Universidad de Antioquia, Colombia

²Facultad de Medicina, Universidad Cooperativa de Colombia, sede Medellín

Recibido: 30 de agosto de 2012. **Aprobado:** 25 de noviembre del 2012.

***Autor de correspondencia:** Jaime Andrés Pereañez, Departamento de Farmacia, Facultad de Química Farmacéutica, Universidad de Antioquia, Calle 70 No. 52-21, Medellín, Colombia. Teléfono: (57-4) 4 219 66 49. Correo electrónico: andrespj20@yahoo.es

Cómo citar este artículo: Pereañez JA, Patiño AC, Henao-Castañeda IC. Toxinas provenientes de venenos de serpiente: blancos terapéuticos, herramientas en investigación biomédica y agentes con potencial terapéutico. *Curare*. 2014; 1(1): 49-60.

Resumen. El accidente ofídico es un grave problema de salud pública en regiones tropicales y subtropicales del mundo. Los signos y síntomas observados en los pacientes que sufren estos envenenamientos dependen de diversos factores como: especie de la serpiente, edad de la serpiente y del paciente, región anatómica afectada, entre otras. Asimismo se sabe que el veneno de las serpientes es una mezcla compleja de péptidos, proteínas de carácter enzimático y no enzimático, y trazas de iones, lípidos y carbohidratos. No obstante, dicha complejidad hace a los venenos una excelente fuente de moléculas bioactivas con diferentes potenciales. Esta revisión presenta de forma breve el mecanismo de acción de varias de las toxinas presentes en los venenos y su potencial como blanco terapéutico; también describe el uso de proteínas aisladas de venenos como líderes en el desarrollo de nuevos fármacos y su potencial en la biomedicina.

Palabras clave: mordeduras de serpiente, proteínas, toxinas biológicas, uso terapéutico, venenos de víboras.

TOXINS FROM SNAKE VENOMS: THERAPEUTIC USES, TOOLS FOR BIOMEDICAL RESEARCH AND AGENTS WITH THERAPEUTIC POTENTIAL

Abstract. Snakebites are a serious public health problem in tropical and subtropical regions of the world. The signs and symptoms found in patients suffering from snake envenomation depend on different factors such as: snake species, age of the snake and of the patient, and the anatomic region affected, among others. It is also known that snake venom is a complex mixture of peptides, enzymatic and non-enzymatic proteins and traces of ions, lipids and carbohydrates. However, this complexity makes venoms excellent sources of bioactive molecules with different potential applications. This review briefly presents the action mechanism of several toxins found in snake venoms and their potential therapeutic uses. It also describes the use of proteins taken from venoms as leaders in the development of new drugs and their potential in biomedicine.

Keywords: snake bites, proteins, biological toxins, therapeutic use, viper venoms.

TOXINAS PROVENIENTES DE VENENOS DE SERPENTE: ALVOS TERAPÉUTICOS, FERRAMENTAS EM PESQUISA BIOMÉDICA E AGENTES COM POTENCIAL TERAPÉUTICO

Resumo. O acidente ofídico é um grave problema de saúde pública em regiões tropicais e subtropicais do mundo. Os sinais e sintomas observados nos pacientes que sofrem esses envenenamentos dependem de diversos fatores, como: espécie da serpente, idade da serpente e do paciente, região anatómica afetada, entre outros. Além disso, sabe-se que o veneno das serpentes é uma mistura complexa de peptídeos, proteínas de caráter enzimático e não enzimático, e vestígios de íons, lípidos e carboidratos. No entanto, essa complexidade faz aos venenos uma excelente fonte de moléculas bioativas com diferentes potenciais. Nesta revisão, apresenta-se, de forma breve, o mecanismo de ação de várias das toxinas presentes nos venenos e seu potencial como alvo terapéutico; também descreve o uso de proteínas isoladas de venenos como líderes no desenvolvimento de novos fármacos e seu potencial na biomedicina.

Palavras-chave: mordeduras de serpente, proteínas, toxinas biológicas, uso terapéutico, venenos de víboras.

Introducción

Ante la trascendencia mundial del accidente ofídico, y de la magnitud y complejidad de su impacto en la salud pública, consideramos que este merece mucha más atención de las autoridades sanitarias nacionales y regionales, de la que se le ha dado hasta ahora. Este problema afecta igualmente a los habitantes de áreas rurales de los países en desarrollo de África, Asia, América Latina y Oceanía. Cada año, se estiman entre 420.000 y 2,5 millones los envenenamientos ofídicos, entre los cuales 20.000 a 125.000 son mortales [1, 2]. En Colombia se registran cerca de 3.000 eventos al año, con una mortalidad estimada del 5 al 8% [3].

Los signos y síntomas de los accidentes ofídicos varían de acuerdo con el ofidio (especie, tamaño, edad del animal, cantidad de veneno inoculado, entre otras), el paciente (edad, sexo, enfermedades de base, sitio de la mordedura) y el tiempo de inicio del tratamiento después del evento. Los envenenamientos provocados por la gran mayoría de serpientes de la familia *Viperidae* se caracterizan principalmente por manifestaciones locales en el sitio de la inyección del veneno, tales como: dolor, edema, sangrado, necrosis del tejido muscular, dermonecrosis y formación de ampollas [4, 5]. La severidad de esta patología local varía mucho y puede ir desde casos leves, que presentan solamente edema y dolor, hasta casos graves en los que se manifiesta importante necrosis tisular y daño permanente del tejido. Por otra parte, los venenos de este grupo de serpientes provocan alteraciones sistémicas, caracterizadas por hemorragia, alteraciones de la coagulación (desfibrinogénación), alteraciones hemodinámicas que pueden llevar a choque cardiovascular e insuficiencia renal aguda [4, 5, 6].

Igualmente, existen otras víboras que provocan accidentes ofídicos caracterizados por neurotoxicidad severa y miotoxicidad sistémica (rabdomiólisis), acompañadas de desfibrinogénación e insuficiencia renal aguda, pero no presentan una patología local importante [7]. Por su parte, los envenenamientos por serpientes coral (género *Micrurus*), se caracterizan por la ausencia de efectos patológicos locales y de coagulación, y por el predominio de la actividad neurotóxica por toxinas que bloquean las uniones neuromusculares. El cuadro clínico se basa en una secuencia de eventos paralíticos progresivos, que pueden causar, en casos severos, parálisis respiratoria y muerte [5, 8]. El tratamiento clínicamente aprobado para este grave problema de salud es la administración intravenosa de antivenenos producidos en diferentes animales.

Para la solución de la problemática esbozada es fundamental el estudio de la composición de los venenos de serpiente, que son una mezcla compleja de péptidos, enzimas, proteínas sin actividad enzimática, azúcares, lípidos y trazas de algunos cationes [9]. Los componentes proteicos de los venenos son los responsables de provocar los efectos tóxicos de estos; sin embargo, algunos de ellos pueden ser parcialmente neutralizados por los antivenenos. La variedad de componentes de los venenos estimulan las investigaciones dirigidas a la búsqueda de agentes terapéuticos y moléculas modelo en los venenos, que puedan ser usadas en un futuro cercano como fármacos para el tratamiento de diversas patologías. Este trabajo describe el uso de algunas estrategias para inhibir los efectos provocados por las toxinas, el uso de las mismas en biomedicina y los posibles efectos favorables que tienen estas sustancias sobre la salud del ser humano.

Toxinas provenientes de venenos de serpiente como blancos terapéuticos

La única terapia científicamente validada para el tratamiento del accidente ofídico es la administración intravenosa de antiveneno [10]. Sin embargo, este abordaje terapéutico presenta inconvenientes como: altos precios, acceso limitado o nulo al antiveneno en las áreas rurales de países en desarrollo (donde ocurren la gran mayoría de accidentes), variaciones significativas entre venenos que conducen a una reducida reactividad cruzada entre los mismos y baja neutralización, así como reacciones adversas; dificultad para el mantenimiento de la cadena de frío para algunos productos (difícil de lograr en áreas rurales) y eficacia limitada de la seroterapia para proteger contra el daño tisular local causado por los venenos [1, 10, 11].

Uno de los principales agentes causantes del daño tisular local son las fosfolipasas A2 (PLA2), presentes en todos los venenos de serpiente. Son enzimas dependientes de Ca^{2+} que se caracterizan por su capacidad para hidrolizar el enlace éster en la posición *sn*-2 de un glicerofosfolípido de la membrana celular. Los productos de la hidrólisis del enlace éster de la posición *sn*-2 del fosfolípido son un ácido graso y un lisofosfolípido. La superfamilia de las PLA2 cuenta con xv grupos, cuya clasificación se basa en su secuencia, masa molecular, procedencia, posición de sus puentes disulfuro, requerimiento de calcio, entre otras características. Las proteínas de los venenos de serpiente pertenecen a los grupos IA, IIA y IIB [12]. Adicionalmente, los efectos

tóxicos provocados por las PLA2 de venenos de serpientes incluyen neurotoxicidad pre o postsináptica, miotoxicidad local o sistémica, anticoagulación, cardiotoxicidad, modulación de la agregación plaquetaria, actividades hemolítica, edematizante e hipotensora y daño directo en órganos como el riñón, el pulmón y el hígado [13], aunque es evidente que no todas las PLA2 de venenos de serpiente tienen la capacidad de inducir todos los efectos mencionados.

La acción catalítica es importante para que las PLA2 induzcan los efectos mencionados; sin embargo, existe un subgrupo de PLA2 enzimáticamente inactivas, las cuales poseen variaciones en algunos aminoácidos, especialmente en la sustitución de Asp49 por Lys, Arg, Ser o Gln, lo que conduce a la pérdida de la actividad enzimática, como consecuencia de la degeneración del *loop* de unión al calcio [14]. A estas proteínas se les llama “PLA2 homólogas”; no obstante, es bien conocido que inducen miotoxicidad local y edema. Aunque se reconoce la participación del tridecapéptido catiónico C-terminal en el modo de acción de estas toxinas, los mecanismos por los cuales causan dichos efectos no han sido clarificados en su totalidad [14].

Entre los eventos que explican el daño irreversible a las células musculares se encuentra, inicialmente, la posible unión de la PLA2 a la molécula blanco. Aunque no se conoce con certeza cuál o cuáles podrían ser los aceptores de las PLA2, algunos autores han identificado receptores proteicos de alta afinidad para estas toxinas, con una masa molecular de 180 kDa y repeticiones en tándem de dominios de alta homología, con dominios de reconocimiento de carbohidratos (CDR). Estos receptores fueron llamados del tipo M por su procedencia de células musculares [15]. Posterior a este reconocimiento inicial, las toxinas causan una pérdida de la permeabilidad celular por mecanismos dependientes de la catálisis, como es el caso de las PLA2 Asp49, o por mecanismos independientes de la catálisis que involucran fuertes interacciones electrostáticas entre la región C-terminal de las PLA2 Lys49 y la bicapa lipídica [14, 16].

Subsecuente a esta pérdida de permeabilidad hay despolarización, pérdida de los gradientes iónicos, salida de moléculas citosólicas como creatina quinasa (CK) y deshidrogenasa láctica (LDH), importantes marcadores del daño muscular, entre otras, y entrada masiva de Ca^{2+} que posteriormente induce una hipercontracción de las fibras musculares, lo que causa un daño mecánico en su membrana celular. Adicionalmente, hay sobrecarga de este catión en la mitocondria con posterior daño de la maquinaria metabólica de la célula y

una posible implicación en la apoptosis, derivada de la activación de la vía de las caspasas. El calcio también puede activar las calpaínas (unas de las proteasas encargadas de la remodelación del citoesqueleto), con la subsecuente hidrólisis de proteínas estructurales clave como la titina y la desmina, lo que a su vez causa desorganización sarcomérica y pérdida de las líneas Z [16].

La inyección intramuscular de PLA2 causa inflamación, caracterizada por incremento en la permeabilidad vascular, formación de edema, reclutamiento leucocitario a los tejidos afectados y liberación de mediadores inflamatorios [17]. Sin embargo, cabe aclarar que los mecanismos por los que estas toxinas inducen este efecto no han sido elucidados en su totalidad, si bien las PLA2 Asp49 pueden generar ácido araquidónico, que sirve como punto de partida para la producción de eicosanoides, que finalmente van a amplificar la respuesta inflamatoria.

Las PLA2 homólogas inducen edema y degranulación de mastocitos de una manera independiente de la catálisis; por tanto, es evidente que la actividad enzimática no es un requisito estricto para causar los efectos mencionados. Es probable que otras características estructurales de las PLA2 estén también involucradas en la inducción de la inflamación, tal y como ha sido demostrado con las regiones catiónicas de las toxinas, que cuando han sido neutralizadas por polianiones como la heparina, se evidencia una reducción del edema [18, 19]. Así mismo, estos investigadores identificaron que la región de unión para la heparina en una PLA2 Lys49 es el tridecapéptido C-terminal, y dicha interacción entre este glucosaminoglucano y la proteína provoca una reducción del edema, de la miotoxicidad y de la citotoxicidad. No obstante, son necesarios estudios adicionales que conduzcan a la identificación más certera de los determinantes estructurales implicados en la inducción de los efectos tóxicos mencionados.

Otro efecto importante observado en algunos accidentes ofídicos es la neurotoxicidad presináptica o β -neurotoxicidad, como por ejemplo, los causados por serpientes del género *Crotalus durissus* de Suramérica. Las proteínas responsables de tal efecto son llamadas β -neurotoxinas, las cuales estructuralmente están constituidas por entre una y cinco subunidades que interactúan covalente o no covalentemente, y una de ellas generalmente es una PLA2 enzimáticamente activa [20]. La toxicidad se da por la inhibición de la liberación de acetilcolina (ACh) que causan estas moléculas, lo que se traduce en una parálisis flácida de los músculos respiratorios.

Los eventos celulares involucrados en este efecto incluyen, inicialmente, la posible unión de la toxina a moléculas blanco. Algunos autores han identificado receptores proteicos de alta afinidad para estas proteínas y han sido llamados del tipo N, por su procedencia de tejido nervioso [21]. Seguido a la unión al receptor, que se presume está localizado cerca de los sitios donde se da la liberación de Ach, la toxina ejerce su acción catalítica sobre la membrana presináptica, y posteriormente puede entrar a la vesícula presináptica; sin embargo, este reservorio de neurotransmisores es recuperado para volver a ejercer su acción. Una vez dentro de la vesícula, la toxina también degrada los fosfolípidos de la membrana interna de esta, lo que causa una desorganización de la membrana vesicular caracterizada por movimientos tipo *Flip-Flop* de los ácidos grasos generados, y que a su vez promueven la fusión de las vesículas con la membrana presináptica e inhiben la fisión o recuperación de las mismas. Finalmente, todo lo anterior provoca una falla neuronal en la recuperación vesicular que conduce a la inhibición de la liberación de Ach [20, 22]. También se ha demostrado que estas toxinas pueden ser internalizadas en las terminales nerviosas, donde se unen a proteínas diversas y causan cambios morfológicos notables [20].

Las metaloproteasas son otro grupo importante de toxinas presentes en los venenos de las serpientes. Estas son proteasas dependientes de Zn^{2+} que degradan los componentes de la membrana basal que da sustento a las células endoteliales de los capilares; este hecho provoca el desanclaje de las células endoteliales de la membrana basal y, eventualmente, la interrupción de la continuidad de la pared capilar. Por último, ocurre la extravasación de los glóbulos rojos, que ocasiona en los pacientes una hemorragia local (en el sitio de la mordedura) o sistémica [23]. Adicionalmente, las metaloproteasas pueden provocar dermonecrosis, formación de ampollas, edema y mionecrosis [24], que a su vez aumentan el daño tisular local provocado por otras toxinas como las PLA2.

Otro grupo de toxinas presentes en los venenos de serpientes son las serinproteasas del tipo trombina (SVTL, *Snake Venom Thrombin-like Enzyme*). Estas proteínas degradan el fibrinógeno y lo convierten en polímeros inestables de fibrina que posteriormente son degradados por el sistema fibrinolítico [25]. Este hecho indica que estas proteínas son potentes anticoagulantes, teniendo como mecanismo de acción el consumo de fibrinógeno [25].

Adicional a las toxinas mencionadas, que en la mayoría de los venenos corresponden al porcentaje mayoritario en su composición, existen, además, otros grupos de toxinas que realizan acciones específicas, pero que de la misma manera son importantes en los accidentes ofídicos. Algunas de estas toxinas son las acetilcolinesterasas, que degradan la acetilcolina y potencian la acción de las neurotoxinas [26]. Por su parte, las desintegrinas y lectinas del tipo C intervienen en el proceso de agregación plaquetaria, ya sea favoreciéndolo o inhibiéndolo; sin embargo, en el envenenamiento predomina el efecto inhibitorio [27]. Las hialuronidasas, en cambio, son enzimas que degradan el hialuronano, un glucosaminoglucano de la matriz extracelular. Este hecho hace que las demás proteínas del veneno se distribuyan rápidamente, por lo que estas toxinas se conocen como el factor de distribución de los venenos. Adicionalmente, estas toxinas potencian el efecto hemorrágico de las metaloproteasas al potenciar la desestabilización de la matriz extracelular que provocan dichas proteínas hemorrágicas [26]. Asimismo, en algunos venenos pueden existir toxinas que pertenecen a la familia de tres dedos; estas pequeñas proteínas son muy versátiles ya que pueden provocar diferentes efectos tales como: neurotoxicidad, cardiotoxicidad, miotoxicidad, inhibición de la acetilcolinesterasa, bloqueo de la agregación plaquetaria, entre otros [28].

Si bien la administración temprana de antiveneno disminuye la posibilidad de sufrir secuelas importantes como las amputaciones derivadas de la mionecrosis y el daño tisular local, además de la insuficiencia renal aguda (IRA) derivada de la rhabdomiólisis o provocada por mecanismo de daño directo al riñón, que además ayuda a evitar que esta IRA llegue a ser crónica, este tratamiento generalmente no se inicia rápidamente en la mayoría de los pacientes, menos aún en regiones rurales de países tropicales del mundo donde ocurren la mayoría de envenenamientos. Por tanto, el pronóstico de estos pacientes no es el mejor [1, 2]. Por otra parte, si el tratamiento se proporciona varias horas después de la mordedura por la serpiente, y la miotoxicidad ya está establecida (hecho que se inicia pasados los primeros cinco minutos), el antiveneno no revierte el daño tisular local; por lo mismo la posibilidad de sufrir secuelas es aún mayor [1, 2].

Teniendo en cuenta dicha problemática, investigadores en todo el mundo dirigen sus esfuerzos hacia la búsqueda de inhibidores de toxinas que puedan ser usados como tratamiento auxiliar al antiveneno y que

puedan ser administrados en el mismo momento de la mordedura sin necesidad de estar en un servicio hospitalario, como en el caso del antiveneno.

Entre los posibles proveedores de tratamientos complementarios se encuentran los productos naturales, una de las fuentes más importantes de nuevos fármacos, por lo que algunos investigadores vienen realizando estudios etnofarmacológicos en regiones rurales del mundo, donde varias especies vegetales se usan en la medicina tradicional para el tratamiento del accidente ofídico [29-32]. Sin embargo, la gran mayoría de estas especies solo han sido descritas desde el punto de vista etnobotánico, y una mínima cantidad han sido evaluadas en experimentos controlados para determinar su capacidad neutralizante sobre los efectos inducidos por los venenos de serpientes, contra las cuales se utilizan. Adicionalmente, es menor aún el número de plantas a las cuales se les ha determinado el o los metabolitos responsables de su acción, y su posible mecanismo de acción.

Una estrategia para identificar el o los metabolitos importantes es realizar fraccionamiento biodirigido del extracto completo de la planta, hasta llegar al compuesto puro, que finalmente se caracteriza mediante técnicas instrumentales (infrarrojo, resonancia magnética nuclear, espectrometría de masas, entre otras) [33-36]. Sin embargo, en la mayoría de los casos en los que se han identificado metabolitos, no se plantean hipótesis o descripciones sobre el mecanismo de acción de los inhibidores. Además de la realización de fraccionamientos biodirigidos de extractos de plantas, encaminados a obtener compuestos de origen natural con potencial antiofídico, se investiga acerca de inhibidores naturales de fuentes diferentes a las vegetales. Es así como Pereañez y colaboradores [37] demostraron mediante ensayos bioquímicos que los ácidos biliares inhiben competitivamente la actividad enzimática de una PLA2, así como el edema y la miotoxicidad provocada por esta toxina.

Otra estrategia usada por los investigadores para encontrar potenciales inhibidores es ensayar los componentes mayoritarios de especies vegetales reportadas desde la etnofarmacología. Esta metodología fue usada por Pereañez y colaboradores [38], quienes describieron que diferentes compuestos fenólicos inhibían la actividad enzimática y la miotoxicidad provocadas por PLA2. Así mismo, estos investigadores usaron una metodología basada en estudios de modelamiento molecular para sugerir un mecanismo de acción de los compuestos ensayados [38, 39]. Esta misma técnica,

docking molecular, fue usada por Pereañez y colaboradores [37] para sugerir un posible mecanismo de acción de los ácidos biliares para inhibir la PLA2, al bloquear algunos aminoácidos del sitio activo.

Una metodología adicional es sintetizar compuestos con o sin homología estructural con algunos inhibidores reportados. Esta estrategia fue usada por Villar y colaboradores [40] para sintetizar derivados del nitroestireno que poseen una similitud estructural con la quercetina, un flavonoide inhibidor de PLA2, que se une al sitio activo de la enzima [41]. Estos investigadores demostraron que la serie de compuestos sintetizados, aunque inhiben en diferentes proporciones las actividades tóxicas inducidas por la PLA2, lo hacen de forma no competitiva, mientras que su compuesto modelo, la quercetina, lo hace de forma competitiva [40].

Una estrategia que puede ser usada para encontrar potenciales inhibidores de toxinas es aquella conocida como “estrategias para el desarrollo de fármacos asistidas por computador”. En una de estas técnicas se encuentra el *screening* virtual, el cual consiste en realizar una búsqueda virtual de posibles candidatos a fármacos. Para esto son seleccionados ligandos (candidatos) de librerías públicas o privadas. De igual forma, se selecciona el blanco terapéutico de una base de datos de proteínas, y finalmente, mediante métodos computacionales, se provoca un posible acoplamiento entre ligando y proteína. Este proceso tiene como resultado final una lista de ligandos ordenados de acuerdo con su afinidad por la proteína blanco, y, adicionalmente, se puede hacer una inspección visual de las posibles interacciones que tuvieron las dos moléculas *in silico* [42]. Esta metodología se ha utilizado para encontrar candidatos a fármacos para el tratamiento del cáncer de seno [43], antiinflamatorios [44], antimicrobianos [45], entre otros.

En el caso de la búsqueda de inhibidores de toxinas se han realizado, recientemente, varios trabajos basados en el *screening* virtual, en los cuales se han obtenido varios compuestos líderes para el desarrollo de fármacos. Uno de ellos tuvo como blanco farmacológico una PLA2 enzimáticamente inactiva [46]; no obstante, fue un estudio computacional puro y su resultado final fue la descripción de un potencial inhibidor. Otro *screening*, realizado por Nargotra y colaboradores [47] tuvo como punto de partida una gran librería que consideró compuestos sintéticos y naturales, y que finalmente arrojó tres inhibidores potenciales. De todas maneras, con el fin de validar los resultados computacionales, los compuestos con mayor afinidad por una PLA2 enzimáticamente activa se evaluaron en experimentos *in vitro*

e *in vivo*. Más recientemente, Wadood y colaboradores [48] realizaron un *screening* con el fin de identificar el farmacóforo necesario para inhibir las actividades inflamatoria y anticoagulante de una PLA2. Este estudio dejó como resultado 32 compuestos con un alto potencial, que posteriormente deberán ensayarse *in vitro* e *in vivo*, y que posiblemente sean modificados químicamente con el fin de aumentar su actividad inhibitoria.

Por otro lado, Utsintong y colaboradores [49] llevaron a cabo un *screening* virtual contra la α -cobrotoxina, una pequeña proteína de la familia de toxinas de tres dedos, con actividad neurotóxica (bloquea la unión de la acetilcolina al receptor nicotínico de la placa motriz). Este estudio partió de 1990 compuestos de una librería pública, 39 de ellos con excelente afinidad por el receptor nicotínico. Posteriormente, en ensayos *in vitro* se demostró que cuatro de estas moléculas competían eficientemente con la nicotina por el sitio de unión al receptor. No obstante, después de realizar estudios *in vivo* determinaron que sólo dos de ellas prolongaban el tiempo de supervivencia de ratones cuando eran inyectados con el inhibidor inmediatamente después de recibir la inyección de la toxina.

Como se puede ver, la mayoría de los estudios se han realizado contra las PLA2, dada su presencia en la mayoría de los venenos, su versatilidad funcional y su potencia. Sin embargo, es claro que el diseño racional de posibles inhibidores es una metodología que se debe explorar teniendo como blanco las metaloproteasas, serinproteasas, toxinas de tres dedos, acilcolinesteras, entre otras, ya que, como se mencionó, un veneno es una mezcla compleja que contiene todas estas proteínas que provocan diversos efectos tóxicos y que a menudo son pobremente neutralizados por el antiveneno.

Toxinas provenientes de venenos de serpiente como agentes con potencial terapéutico

En 1967, Sergio Ferreira descubrió una molécula antihipertensiva en el veneno de la serpiente brasileña *Bothrops jararacá*. Posteriormente, viajó a Europa y, trabajando en conjunto con varios investigadores encontró el mecanismo de acción, que consistía en bloquear la enzima convertidora de angiotensina y la naturaleza peptídica de la molécula. El compuesto fue llamado Trepotide. Después de realizar varias modificaciones químicas y pasar por un análogo peptídico, obtuvieron la molécula que hoy se conoce como Captopril, un inhibidor de la enzima convertidora de angiotensina (iECA), aún utilizado para el tratamiento

de la hipertensión [50]. Así mismo, esta molécula ha sido usada para el desarrollo de nuevos iECA, con mejor actividad y menor incidencia de reacciones adversas. A partir del descubrimiento del Captopril, se consideraron los venenos de animales como fuentes ricas en compuestos bioactivos, con usos potenciales como fármacos.

En esta parte del trabajo se presentará el mecanismo de acción de algunos fármacos que se desarrollaron a partir de proteínas presentes en venenos de serpientes, y además varias toxinas con un gran potencial terapéutico.

Los avances más importantes en fármacos que se han obtenido a partir de toxinas aisladas de venenos de serpientes se han realizado en aquellos que actúan sobre el sistema hemostático. Es así como la fibrolasa aislada de *Agkistrodon contortrix* puede degradar ambas cadenas de la fibrina (α y β), mostrando potencial como agente trombolítico [51]. En el 2001 se produjo la Alfimeprasa® (una forma recombinante de esta fibrolasa) y fue sometida a estudios clínicos [52]. En la actualidad se encuentra en la segunda fase de los estudios clínicos como candidato para el tratamiento de oclusiones arteriales periféricas [53]. Igualmente, las serinproteinasas del tipo trombina tienen un gran potencial, por su capacidad para degradar fibrinógeno y producir fibrinopéptidos que fácilmente son degradados por el sistema fibrinolítico. Dos enzimas de este tipo son la Batroxobina, aislada de *Bothrops atrox* (Reptilase®, Pentapharm, Basilea, Suiza) y Ancrod, aislada de *Callosellasma rhodostoma* (Knoll, Ludwigshagen, Alemania). Esta última ha mostrado ser efectiva en el tratamiento del accidente cerebro-vascular [54].

Por su parte, las desintegrinas son un grupo de toxinas cuyo mecanismo de acción es bloquear las integrinas encargadas de promover las interacciones célula-célula o célula-ambiente extracelular. Se clasifican de acuerdo con su motivo estructural para unir la integrina. El proceso inhibitorio sobre las integrinas es importante en diferentes procesos patológicos, por ejemplo en los desórdenes tromboembólicos, en los cuales se busca bloquear la integrina α IIb β 3 (receptor del fibrinógeno), que se encuentra en la superficie de la plaqueta. Investigadores tomaron la estructura de las desintegrinas como molde para el diseño de moléculas que se unen con alta afinidad al receptor mencionado, dando como resultado la aprobación de dos nuevos medicamentos, el Eptifibatide (Integrilin®) y el Tirofiban (Agrastat®). El primero se modeló a partir del sitio activo de la barbourina (*Sistrurus barbouri*), que de hecho

es una proteína que contiene el motivo KDG [55], mientras que el segundo se diseñó a partir de la echistatina (desintegrina que posee el motivo RDG) [56, 57]. Ambos fármacos han sido aprobados en la terapia de la isquemia coronaria aguda y en la prevención de trombosis en pacientes a los que se les realizó una intervención coronaria tal como angioplastia o inserción de un stent [58, 59]. Para tratar este mismo tipo de patologías se han estudiado algunas lectinas del tipo C, que tienen la capacidad de unirse al factor de Von Willebrand y evitar la activación de las plaquetas, por lo que poseen un efecto antiagregante plaquetario [60, 61].

Muchos venenos de serpientes contienen péptidos potenciadores de bradiquinina (BPP), los cuales se pueden usar como hipotensores al comportarse como iECA. Sin embargo, una alternativa adicional para el tratamiento de la hipertensión es el uso de vasodilatadores periféricos, los cuales pueden ser bloqueadores de los receptores α 1-adrenérgicos, bloqueadores de los canales de calcio tipo L del músculo vascular periférico, entre otros. Teniendo en cuenta este hecho, se encontró que la calciseptina [62] y FS2, toxinas de tres dedos del veneno de *Dendroaspis polylepis polylepis* [63] bloquean el canal de calcio tipo L del músculo liso vascular con una acción más prolongada que el nifedipino. Posteriormente el péptido sintético L-calchin (PTAMWP), derivado de la calciseptina, conservó los mismos efectos que la toxina completa [64]. A pesar de este avance, se debe seguir trabajando en este péptido hasta obtener un molde o líder para el desarrollo de un fármaco hipotensor.

Un uso adicional de las desintegrinas que contienen el motivo RDG es la inhibición de la integrina $\alpha\beta$ 3 como posible blanco farmacológico en el tratamiento del cáncer. Hasta el momento estas proteínas aisladas de venenos de serpiente se han considerado herramientas útiles que han ayudado a descifrar los mecanismos de la angiogénesis dependiente $\alpha\beta$ 3; las desintegrinas como accutina [65], triflavina [66], salmosina [67], rhodostamina [68, 69] y contortostatina [70] inhiben el proceso mencionado al unirse a las células endoteliales vía $\alpha\beta$ 3. En consecuencia, se ha sugerido que la unión de las desintegrinas a tales células inhibe su movilidad y proliferación. El primer efecto se observa porque evitan la interacción entre la matriz extracelular y las células, mientras que el segundo se presenta posiblemente al inducir apoptosis. Cabe señalar que estos mismos efectos han sido observados en líneas celulares tumorales [71].

Otra posible utilidad de los compuestos derivados de venenos de serpientes, y que es objeto de estudio

de muchos investigadores alrededor del mundo, es la búsqueda de analgésicos útiles para el tratamiento del dolor neuropático y del dolor crónico presente en varias patologías. Entre ellos se encuentra la hannalgesina, aislada de la cobra real (*Ophiophagus hannah*), que se une a los receptores de opioides con un poder analgésico 2700 veces más fuerte que la morfina; además, su efecto fue bloqueado por la naloxona (antagonista de dichos receptores), lo que ratifica su acción sobre los mismos [72].

Otro péptido que ejerce su acción sobre estos blancos moleculares fue recientemente aislado de la serpiente cascabel suramericana *Crotalus durissus terrificus*, y recibió el nombre de Crotalfina. Dicha molécula presentó una fuerte actividad analgésica y antinociceptiva en modelos de dolor neuropático; además, fue activa por vía oral, intravenosa e intraplantar en ratones, y se demostró que su acción era mediada por la activación de los receptores opioides tipo κ [73, 74]. Finalmente, se sabe que el dolor neuropático no responde muy bien a los medicamentos analgésicos convencionales, que además están asociados a gran variedad de efectos adversos. Por lo anterior, se requieren avances en la investigación acerca de nuevos agentes que disminuyan el dolor, y que pueden ser llevados a cabo utilizando como modelo este tipo de fármacos.

Según se mencionó, se han obtenido algunos fármacos a partir de toxinas presentes en los venenos de serpiente; sin embargo, es evidente que en la mayoría de los casos se deben realizar más investigaciones para encontrar la toxina molde o el farmacóforo, y para finalmente producir sintéticamente diferentes compuestos que puedan ser ensayados y que en un futuro puedan ser usados como fármacos para el tratamiento de una patología en particular. Adicionalmente, en este campo se debe considerar la participación de diferentes herramientas bioinformáticas como el *screening* virtual a partir de servidores que generan péptidos *in silico*, y que posteriormente pueden ser sintetizados y ensayados *in vitro* e *in vivo*. En otras palabras, el diseño racional de fármacos también puede ser de gran apoyo a los investigadores que buscan el potencial farmacológico de las toxinas aisladas de venenos de animales.

Toxinas de venenos de serpiente como herramientas en investigación biomédica

Las toxinas aisladas de venenos de serpientes se han utilizado en investigaciones biomédicas como herramientas para describir procesos fisiológicos o fisiopatológicos.

Es así como la Batroxobina se usa como herramienta diagnóstica, ya que en química clínica existe el tiempo de Reptilasa, en alternativa al tiempo de trombina en muestras que contienen heparina [75]. Un uso adicional de estas proteínas tiene lugar en el ensayo de anti-trombina III, en el que el plasma debe ser preparado libre de fibrinógeno y sin la adición de trombina, ya que esta última podría reaccionar con la antitrombina III e interferir con el ensayo [76].

La víbora de Russell (*Doboa russelli*) posee proteínas que activan los factores v y x de la cascada de la coagulación. La molécula que tiene preferencia por el factor V es una serinproteasa conocida como rvv-v (Pentapharm, Basilea, Suiza) y puede ser utilizada en ensayos de rutina del factor v, dada su alta selectividad para la activación de tal factor [77]. Igualmente, el activador del factor x conocido como rvv-x, y comercializado por la compañía Pentapharm, estructuralmente posee un dominio de desintegrina y otro de metaloproteasa, el cual es el que activa directamente el factor x. Además esta proteína se ha empleado para la cuantificación de tal factor de la coagulación [78] y tiene gran utilidad en los ensayos para discriminar entre la deficiencia de los factores VII o X [79].

En el veneno de las mambas (*Dendroaspis sp*) existe un grupo de toxinas que bloquean los canales de potasio. Estas moléculas se denominan dendrotoxinas. Estudios con diferentes canales de potasio clonados indican que la α -dendrotoxina de la mamba verde (*D. angusticeps*) bloquea los canales de potasio Kv1.1, Kv1.2 y Kv1.6, mientras que la toxina K de la mamba negra *D. polylepis* bloquea preferencialmente los canales del tipo Kv1.1 [80]. Análogos estructurales de las dendrotoxinas han ayudado a definir características de reconocimiento de diferentes canales de K^+ , mientras que dendrotoxinas marcadas radiactivamente han sido útiles en el descubrimiento de toxinas de otras fuentes que se unen a estos canales [80, 81].

Finalmente, ya que estas moléculas han sido excelentes marcadores de los diferentes subtipos de canales de K^+ , se han convertido en herramientas relevantes para su estudio, y dada la existencia de algunas condiciones fisiopatológicas asociadas a estos poros iónicos, cabe pensar que análogos de dendrotoxinas pueden tener potencial terapéutico.

Otras proteínas aisladas del veneno de la mamba verde (*Dendroaspis angusticeps*) son aquellas toxinas

muscarínicas (MT, *muscarinic toxins*) que bloquean los diferentes subtipos de receptores muscarínicos (M1-M5) [82, 83]. Debido a su potencia y selectividad, estas proteínas se han usado como herramientas para el estudio de los posibles roles fisiopatológicos de estos receptores; por ejemplo, estos son de gran importancia en enfermedades neurodegenerativas, tales como Alzheimer y Parkinson; de hecho, la participación de receptores muscarínicos en la enfermedad de Alzheimer fue descrita usando estas toxinas de mamba, específicas para los diferentes subtipos de receptores [84]. Así mismo, recientemente se demostró el rol de M4 en la inhibición de la actividad de la adenilato ciclasa, así como en la modulación de la neurotransmisión de neuronas del hipocampo. Para tal fin se usó la propiedad antagonista de MT3 sobre los receptores mencionados [85, 86].

Las MT pueden ser utilizadas como sondas moleculares para estudiar la estructura y función de sus receptores. En el caso particular de la interacción entre MT7-M1, la capacidad de esta toxina para interactuar con el receptor y estabilizar su forma dimérica se aprovechó para estudiar la variación en las formas oligoméricas del receptor [87].

En esta revisión se trataron importantes temas sobre el mecanismo de acción de las toxinas provenientes de venenos de serpiente, su potencial como blanco terapéutico y su utilidad en investigaciones biomédicas. No obstante, estos resultados pretenden impulsar a toxicólogos, médicos, biólogos, químicos, microbiólogos, químicos farmacéuticos, entre otros profesionales, a seguir adelante en las investigaciones que nos ayuden a aclarar el mecanismo de acción de las toxinas y su rol en los envenenamientos, además de usarlas como dianas terapéuticas para el posterior desarrollo de moléculas con potencial antiofídico.

Igualmente, esperamos que esta revisión ofrezca la oportunidad a los lectores para que consideren el veneno de las serpientes no sólo como una sustancia tóxica, sino también como una mezcla de la cual se pueden extraer moléculas que tienen un gran potencial terapéutico; es decir, con esta revisión buscamos mostrar las dos caras del veneno de serpiente, lo bueno y lo malo de él. Por otro lado, presentamos disculpas a los autores de investigaciones que no fueron incluidos en esta revisión, a los cuales valoramos su excelente trabajo, pero que por cuestiones de espacio no pudimos analizar en esta revisión.

Referencias

- [1] Williams D, Gutiérrez JM, Harrison R, Warrell DA, White J, Winkel KD, Gopalakrishnakone P. Global Snake Bite Initiative Working Group; International Society on Toxinology. The Global Snake Bite Initiative: an antidote for snake bite. *Lancet*. 2010; 375(9708): 89-91.
- [2] Gutiérrez JM, Williams D, Fan HW, Warrell DA. Snake-bite envenoming from a global perspective: Towards an integrated approach. *Toxicon*. 2010; 56(7): 1223-35.
- [3] Otero R. Envenenamiento ofídico. En: Correa JA, Gómez JF, Posada R, editores. *Fundamentos de Pediatría (Tomo V)*. Medellín: Corporación para Investigaciones Biológicas; 2007.
- [4] Cardoso JLC, França FOS, Wen FH, Málaque CMS, Haddad Jr V. *Animais Peçonhentos no Brasil. Biologia, Clínica e Terapêutica dos Acidentes*. 2ª. ed. São Paulo, Brasil: Ed. Sarvier; 2009.
- [5] Warrell DA. Snakebites in Central and South America: Epidemiology, clinical features, and clinical management. Vol. I. p. 709-761. In: Campbell JA, Lamar WW, editors. *The Venomous Reptiles of the Western Hemisphere*. Ithaca, USA: Cornell University Press; 2004.
- [6] Otero-Patiño R. Epidemiological, clinical and therapeutic aspects of *Bothrops asper* bites. *Toxicon*. 2009; 54(7): 998-1011.
- [7] Azevedo-Marques MM, Hering SE, Cupo P. Acidente crotálico. p. 108-15. Em: Cardoso JLC, França FOS, Wen FH, Málaque CMS, Haddad Jr V editores. *Animais Peçonhentos no Brasil. Biologia, Clínica e Terapêutica dos Acidentes*. 2ª ed. São Paulo, Brasil: Ed. Sarvier; 2009.
- [8] Da Silva NJ e Bucarechi F. Mecanismo de ação do veneno elapídico e aspectos clínicos dos acidentes. pp. 116-124. Em: Cardoso JLC, França FOS, Wen FH, Málaque CMS, Haddad Jr V, editores. *Animais Peçonhentos no Brasil. Biologia, Clínica e Terapêutica dos Acidentes*. 2ª. ed. São Paulo, Brasil: Ed. Sarvier; 2009.
- [9] Markland FS Jr. Snake Venoms. *Drugs*. 1997; 54(3): 1-10.
- [10] Bon C. The serum - therapie was discovered 100 years ago. *Toxicon*. 1996; 34(2): 142-3.
- [11] Gutiérrez JM, León G, Rojas G, Lomonte B, Rucavado A, Chaves F. Neutralization of local tissue damage induced by *Bothrops asper* (terciopelo) snake venom. *Toxicon*. 1998; 36(11): 1529-38.
- [12] Schaloske RH, Dennis EA. The phospholipase A2 superfamily and its group numbering system. *Biochim Biophys Acta*. 2006; 1761(11): 1246-59.
- [13] Kini RM. Excitement ahead: structure, function and mechanism of snake venom phospholipase A2 enzymes. *Toxicon*. 2003; 42(8): 827-40.
- [14] Lomonte B, Angulo Y, Calderón L. An overview of lysine-49 phospholipase A2 myotoxins from crotalid snake venoms and their structural determinants of myotoxic action. *Toxicon*. 2003; 42(8): 885-901.
- [15] Lambeau G, Schmid-Alliana A, Lazdunski M, Barhanin J. Identification and purification of a very high affinity binding protein for toxic phospholipases A2 in skeletal muscle. *J Biol Chem*. 1990; 265(16): 9526-32.
- [16] Gutiérrez JM, Ownby CL. Skeletal muscle degeneration induced by venom phospholipases A2: insights into the mechanisms of local and systemic myotoxicity. *Toxicon*. 2003; 42(8): 915-31.
- [17] Teixeira CF, Landucci EC, Antunes E, Chacur M, Cury Y. Inflammatory effects of snake venom myotoxic phospholipases A2. *Toxicon*. 2003; 42(8): 947-62.
- [18] Lomonte B, Tarkowski A, Bagge U, Hanson LA. Neutralization of the cytolytic and myotoxic activities of phospholipase A2 from *Bothrops asper* snake venom by glycosaminoglycans of the heparin/heparin sulfate family. *Biochem Pharmacol*. 1994; 47(9): 1509-18.
- [19] Lomonte B, Moreno E, Tarkowski A, Hanson LA, Maccarana M. Neutralizing interaction between heparins and myotoxin II a Lys-49 phospholipase A2 from *Bothrops asper* snake venom. Identification of a heparin-binding and cytolytic toxin region by the use of synthetic peptides and molecular modeling. *J Biol Chem*. 1994; 269(47): 29867-73.
- [20] Pungercar J, Krizaj I. Understanding the molecular mechanism underlying the presynaptic toxicity of secreted phospholipases A2. *Toxicon*. 2007; 50(7): 871-92.
- [21] Lambeau G, Barhanin J, Schweitz H, Qar J, Lazdunski M. Identification and properties of very high affinity brain membrane-binding sites for a neurotoxic phospholipase from the taipan venom. *J Biol Chem*. 1989; 264(19): 11503-10.
- [22] Montecucco C, Rossetto O. How do presynaptic PLA2 neurotoxins block nerve terminals? *Trends Biochem Sci*. 2000; 25(6): 266-70.
- [23] Escalante T, Rucavado A, Fox JW, Gutiérrez JM. Key events in microvascular damage induced by snake venom hemorrhagic metalloproteinases. *J Proteomics*. 2011; 74(9): 1781-94.
- [24] Gutiérrez JM, Rucavado A. Snake venom metalloproteinases: their role in the pathogenesis of local tissue damage. *Biochimie*. 2000; 82(9-10): 841-50.
- [25] Swenson S, Markland FS Jr. Snake venom fibrin(ogen)olytic enzymes. *Toxicon*. 2005; 45(8): 1021-39.
- [26] Kang TS, Georgieva D, Genov N, Murakami MT, Sinha M, Kumar RP, et al. Enzymatic toxins from snake venom: structural characterization and mechanism of catalysis. *FEBS J*. 2011; 278(23): 4544-76.

- [27] Kini MJ. Toxins in thrombosis and haemostasis: potential beyond imagination. *J Thromb Haemost.* 2011; 9(1): 193-208.
- [28] Kini RM, Doley R. Structure, function and evolution of three-finger toxins: mini proteins with multiple targets. *Toxicon.* 2010; 56(6): 855-67.
- [29] Coe FG, Anderson GJ. Snakebite ethnopharmacopoeia of eastern Nicaragua. *J Ethnopharmacol.* 2005; 96(1-2): 303-23.
- [30] Otero R, Núñez V, Jiménez SL, Fonnegra R, Osorio RG, García ME, *et al.* Snakebites and ethnobotany in the northwest region of Colombia: Part I: Traditional use of plants. *J Ethnopharmacol.* 2000; 71(3): 493-504.
- [31] Panghal M, Arya V, Yadav S, Kumar S, Yadav JP. Indigenous knowledge of medicinal plants used by Saperas community of Khetawas, Jhajjar District, Haryana, India. *J Ethnobiol Ethnomed.* 2010; 6: 4.
- [32] Samy RP, Thwin MM, Gopalakrishnakone P, Ignacimuthu S. Ethnobotanical survey of folk plants for the treatment of snakebites in Southern part of Tamilnadu, India. *J Ethnopharmacol.* 2008; 115(2): 302-12.
- [33] Batina M de F, Cintra AC, Veronese EL, Lavrador MA, Giglio JR, Pereira OS, *et al.* Inhibition of the lethal and myotoxic activities of *Crotalus durissus terrificus* venom by *Tabernaemontana catharinensis*: identification of one of the active components. *Planta Med.* 2000; 66(5): 424-8.
- [34] Mors WB, Nascimento MC, Parente JP, Da Silva MH, Melo P, Suárez-Kurtz G. Neutralization of letal and myotoxic activities of South American rattlesnake venom by extracts and constituents of the plant *Eclipta prostrata* (Asteraceae). *Toxicon.* 1989; 27(9): 1003-9.
- [35] Núñez V, Castro V, Murillo R, Ponce-Soto LA, Merfort I, Lomonte B. Inhibitory effects of *Piper umbellatum* and *Piper peltatum* extracts towards myotoxic phospholipases A2 from Bothrops snake venoms: isolation of 4-nerolidylcatechol as active principle. *Phytochemistry.* 2005; 66(9): 1017-25.
- [36] Ticli FK, Hage LI, Cambraia RS, Pereira PS, Magro AJ, Fontes MR, *et al.* Rosmarinic acid, a new snake venom phospholipase A2 inhibitor from *Cordia verbenacea* (Boraginaceae): antiserum action potentiation and molecular interaction. *Toxicon.* 2005; 46(3): 318-27.
- [37] Pereañez JA, Núñez V, Patiño AC. Inhibitory effects of bile acids on enzymatic and pharmacological activities of a snake venom phospholipase A(2) from group IIA. *Protein J.* 2011; 30(4): 253-61.
- [38] Pereañez JA, Núñez V, Patiño AC, Londoño M, Quintana JC. Inhibitory effects of plant compounds on enzymatic and activities induced by a snake phospholipase A2. *Vitae.* 2011; 18(3): 295-304.
- [39] Da Silva SL, Calgarotto AK, Maso V, Damico DCS, Balasso P, Veber CL, *et al.* Molecular modeling and inhibition of phospholipase A2 by polyhydroxy phenolic compounds. *Eur J Med Chem.* 2009; 44(1): 312-21.
- [40] Villar JA, Lima FT, Veber CL, Oliveira AR, Calgarotto AK, Marangoni S, da Silva SL. Synthesis and evaluation of nitrostyrene derivative compounds, new snake venom phospholipase A2 inhibitors. *Toxicon.* 2008; 51(8): 1467-78.
- [41] Lättig J, Böhl M, Fischer P, Tischer S, Tietböhl C, Menschikowski M, *et al.* Mechanism of inhibition of human secretory phospholipase A2 by flavonoids: rationale for lead design. *J Comput Aided Mol Des.* 2007; 21(8): 473-83.
- [42] Kapetanovic IM. Computer-Aided drug discovery and development (CADD): *In silico*-chemico-biological approach. *Chem-Biol Interact.* 2008; 171(2): 165-76.
- [43] Song H, Wang R, Wang S, Lin J. A low-molecular-weight compound discovered through virtual database screening inhibits Stat3 function in breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2005; 102(13): 4700-5.
- [44] Waltenberger B, Wiechmann K, Bauer J, Markt P, Noha SM, Wolber G, *et al.* Pharmacophore modeling and virtual screening for novel acidic inhibitors of microsomal prostaglandin E₂ synthase-1 (mPGES-1). *J Med Chem.* 2011; 54(9): 3163-74.
- [45] Huang D. High-throughput virtual screening lead to discovery of non-peptidic inhibitors of West Nile virus NS3 protease. *Methods Mol Biol.* 2012; 819: 615-23.
- [46] Hage-Melim LI, da Silva CH, Semighini EP, Taft CA, Sampaio SV. Computer-aided drug design of novel PLA2 inhibitor candidates for treatment of snakebite. *J Biomol Struct Dyn.* 2009; 27(1): 27-36.
- [47] Nargotra A, Sharma S, Alam MI, Ahmed Z, Bhagat A, Taneja SC, *et al.* *In silico* identification of viper phospholipaseA2 inhibitors: validation by in vitro, in vivo studies. *J Mol Model.* 2011; 17(12): 3063-73.
- [48] Wadood A, Ali SA, Sattar R, Lodhi MA, Ul-Haq Z. A novel pharmacophore model to identify leads for simultaneous inhibition of anti-coagulation and anti-inflammatory activities of snake venom phospholipase A(2). *Chem Biol Drug Des.* 2012; 79(4): 431-41.
- [49] Utsintong M, Talley TT, Taylor PW, Olson AJ, Vajragupta O. Virtual screening against alpha-cobratoxin. *J Biomol Screen.* 2009; 14(9): 1109-18.
- [50] Ondetti M A, Williams NJ, Sabo EF, Pluscec J, Weaver ER, Kocy O. Angiotensin-converting enzyme inhibitors from the venom of *Bothrops jararaca*. Isolation, elucidation of structure, and synthesis. *Biochemistry.* 1971; 10(22): 4033-9.
- [51] Markland FS. Snake venom fibrinogenolytic and fibrinolytic enzymes: a updated inventory. *Thromb. Haemost.* 1998; 79(3): 668-74.

- [52] Toombs CF. Alfimeprase: pharmacology of a novel fibrinolytic metalloproteinase for thrombolysis. *Haemostasis* 2001; 31(3-6): 141-7.
- [53] Swenson S, Toombs CF, Pena L, Johansson J, Markland FS Jr. Alpha-fibrinogenases. *Curr. Drug Targets Cardiovasc. Haematol. Disord.* 2004; 4(4): 417-35.
- [54] Samsa GP, Matchar DB, Williams GR, Levy DE. Cost effectiveness of ancrod treatment of acute ischaemic stroke: results from the Stroke Treatment with Anicrod Trial (STAT). *J. Eval. Clin. Prac.* 2002; 8(1): 61-70.
- [55] Scarborough RM, Naughton MA, Teng W, Rose JW, Philips DR, Nannizzi L. Design of potent and specific integrin antagonists. Peptide antagonists with high specificity for glycoprotein IIb-IIIa. *J. Biol. Chem.* 1991; 268(2): 1066-73.
- [56] Marwick C. Nature's agents help heal humans –some now take steps to reciprocate. *JAMA.* 1998; 279(21): 1679-81.
- [57] Hantgan RR, Stahle MC, Connor JH, Lyles DS, Horita DA, Rocco M, *et al.* The disintegrin echistatin stabilizes integrin alphaIIb beta3's open conformation and promotes its oligomerization. *J. Mol. Biol.* 2004; 342(5): 1625-36.
- [58] Pang JT, Fort S, Della Siega A, Cohen EA. Emergency coronary artery bypasses surgery in the era of glycoprotein IIb/IIIa receptor antagonist use. *J. Card. Surg.* 2002; 17(5): 425-31.
- [59] Gilchrist IC. Platelet glycoprotein IIb/IIIa inhibitors in percutaneous coronary intervention: focus on the pharmacokinetic- pharmacodynamic relationship of eptifibatid. *Clin. Pharmacokinet.* 2003; 42(8): 703-20.
- [60] Fukuda K, Doggett TA, Bankston LA, Cruz MA, Diacovo TG, Liddington RC. Structural basis of von Willebrand factor activation by the snake toxin botrocetin. *Structure (Camb).* 2002; 10(7): 943-50.
- [61] Maita N, Nishio K, Nishimoto E, Matsui T, Shikamoto Y, Morita T, *et al.* Crystal structure of von Willebrand factor A1 domain complexed with snake venom, bitiscetin: insight into glycoprotein Iba binding mechanism induced by snake venom proteins. *J Biol Chem.* 2003; 278(39): 37777-81.
- [62] de Weille JR, Schweitz H, Maes P, Tartar A, Lazdunski M. Calciseptine, a peptide isolated from black mamba venom, is a specific blocker of the L-type calcium channel. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1991; 88(6): 2437-40.
- [63] Yasuda O, Morimoto S, Jiang B, Kuroda H, Kimura T, Sakakibara S, *et al.* FS2, a mamba venom toxin, is a specific blocker of the L-type calcium channels. *Artery.* 1994; 21(5): 287-302.
- [64] Kini RM, Caldwell RA, Wu QY, Baumgarten CM, Feher JJ, Evans HJ. Flanking proline residues identify the L-type Ca²⁺ channel binding site of calciseptine and FS2. *Biochemistry.* 1998; 37(25): 9058-63.
- [65] Yeh CH, Peng HC, Huang TF. Accutin, a new disintegrin inhibits angiogenesis *in vitro* and *in vivo* by acting as integrin alphabeta3 antagonist and inducing apoptosis. *Blood.* 1998; 92(9): 3268-76.
- [66] Sheu JR, Yen MH, Kan YC, Hung WC, Chang PT, Luk HN. Inhibition of angiogenesis *in vitro* and *in vivo*: comparison of the relative activities of triflavin, an Arg-Gly-Asp- containing peptide and anti-alpha(v)beta3 integrin monoclonal antibody. *Biochim. Biophys. Acta.* 1997; 1336(3): 445-54.
- [67] Kim SI, Kim KS, Kim HS, Choi MM, Kim DS, Chung KH. Inhibition of angiogenesis by salmosin expressed *in vitro*. *Oncol. Res.* 2004; 14(4-5): 227-233.
- [68] Yeh CH, Peng HC, Yang RS, Huang TF. Rhodostomin, a snake venom disintegrin, inhibits angiogenesis elicited by basic fibroblast growth factor and suppresses tumor growth by a selective alpha(v)beta(3) blockade of endothelial cells. *Mol. Pharmacol.* 2001; 59(5): 1333-42.
- [69] Huang TF, Yeh C H, Wu WB. Viper venom components affecting angiogenesis. *Haemostasis.* 2001; 31(3-6): 192-206.
- [70] Markland FS, Shieh K, Zhou Q, Golubkov V, Sherwin RP, Richters V. A novel snake venom disintegrin that inhibits human ovarian cancer dissemination and angiogenesis in an orthotopic nude mouse model. *Haemostasis.* 2001; 31(3-6): 183-91.
- [71] Zhou Q, Sherwin RP, Parrish C, Richters V, Groshen SG, Tsao-Wei D. Contortrostatin, a dimeric disintegrin from *Agkistrodon contortrix contortrix*, inhibits breast cancer progression. *Breast Cancer Res. Treat.* 2000; 61(3): 249-60.
- [72] Pu XC, Wong PT, Gopalakrishnakone P. A novel analgesic toxin (hannalgesin) from the venom of king cobra (*Ophiophagus hannah*). *Toxicon.* 1995; 33(11): 1425-31.
- [73] Gutiérrez VP, Konno K, Chacur M, Sampaio SC, Picolo G, Brigatte P, *et al.* Crotalphine induces potent antinociception in neuropathic pain by acting at peripheral opioid receptors. *Eur J Pharmacol.* 2008; 594(1-3): 84-92.
- [74] Konno K, Picolo G, Gutiérrez VP, Brigatte P, Zambelli VO, Camargo AC, *et al.* Crotalphine, a novel potent analgesic peptide from the venom of the South American rattlesnake *Crotalus durissus terrificus*. *Peptides.* 2008; 29(8): 1293-304.
- [75] Funk C, Gmur J, Herold R, Straub PW. Reptilase-R, a new reagent in blood coagulation. *Br. J. Haematol.* 1971; 21(1): 43-52.
- [76] Howie PW, Prentice CRM, McNicol GP. A method of antithrombin estimation using plasma defibrinated with anicrod. *Br. J. Haematol.* 1973; 25(1): 101-10.

- [77] Kisiel W, Canfield WM.. Snake venom proteases that activate blood coagulation factor V. *Methods in Enzymology*. 1981; 80 PtC: 275-85.
- [78] Stocker K. Application of snake venom proteins in the diagnosis of hemostatic disorders. In: Stocker K, editor. *Medical Use of Snake Venom Proteins*. Boca Raton: CRC-Press; 1990. p. 213-252.
- [79] Quick AJ. Thromboplastin generation: effect of the Bell-Alton reagent and Russell's viper venom on prothrombin consumption. *Am. J. Clin. Pathol.* 1971; 55(5): 555-60.
- [80] Harvey AL, Roberston B. Dendrotoxins: Structure-Activity Relationships and Effects on Potassium Ion Channels. *Curr Med Chem*. 2004; 11(23): 3065-72.
- [81] Harvey AL. Twenty years of dendrotoxins. *Toxicon* 2001; 39(1): 15-26.
- [82] Bradley KN. Muscarinic toxins from the green mamba. *Pharmacol. Ther.* 2000; 85(2): 87-109.
- [83] Harvey AL, Kornisiuk E, Bradley KN, Cervenansky C, Duran R, Adrover M, *et al.* Effects of muscarinic toxins MT1 and MT2 from green mamba on different muscarinic cholinergic receptors. *Neurochem. Res.* 2002; 27(11): 1543-1554.
- [84] Mulugeta E, Karlsson E, Islam A, Kalaria R, Mangat H, Winblad B, *et al.* Loss of muscarinic M4 receptors in hippocampus of Alzheimer patients. *Brain Res.* 2003; 960(1-2): 259-62.
- [85] Sánchez G, Alvares L de O, Oberholzer MV, Genro B, Quillfeldt J, da Costa JC, *et al.* M4 muscarinic receptors are involved in modulation of neurotransmission at synapses of Schaffer collaterals on CA1 hippocampal neurons in rats. *J. Neurosci. Res.* 2009; 87(3): 691-700.
- [86] Sánchez G, Colettis N, Vázquez P, Cervenansky C, Aguirre A, Quillfeldt JA, *et al.* Muscarinic inhibition of hippocampal and striatal adenylyl cyclase is mainly due to the M(4) receptor. *Neurochem. Res.* 2009; 34(8): 1363-71.
- [87] Marquer C, Fruchart-Gaillard C, Mourier G, Grandjean O, Girard E, le Maire M, *et al.* Influence of MT7 toxin on the oligomerization state of the M1 muscarinic receptor. *Biol. Cell.* 2010; 102(7): 409-20.