



Universidad Nacional
"Pedro Ruiz Gallo"



FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

TESIS

Determinación de la actividad coagulante tipo
trombina del veneno de la serpiente *Bothrops barnetti*
"macanche" del departamento de Lambayeque - Perú

AUTORES:

JANE LÓPEZ LI

MARLON ENRIQUE SUÁREZ MEJÍA

PATROCINADOR:

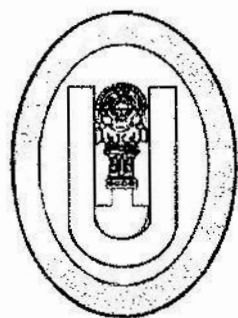
DR. PEDRO CHIMDY EFFIO

CARRERA PROFESIONAL:

ÁREA DE BIOLOGÍA GENERAL

LAMBAYEQUE - PERÚ

2013



**UNIVERSIDAD NACIONAL PEDRO
RUIZ GALLO
FACULTAD DE CIENCIAS
BIOLÓGICAS**



TESIS

TÍTULO:

**Determinación de la actividad coagulante tipo trombina del
veneno de la serpiente *Bothrops barnetti* "macanche" del
departamento de Lambayeque - Perú**

AUTORES:

Jane López Li

Marlon Enrique Suárez Mejía

PATROCINADOR:

Dr. Pedro Chimoy Effio

CARRERA PROFESIONAL:

Área de Biología General

Lambayeque, 26 de setiembre 2013

**Determinación de la actividad coagulante tipo trombina del veneno de la
serpiente *Bothrops barnetti* “macanche” del departamento de**

Lambayeque – Perú.

Tesis

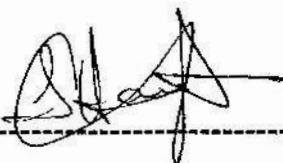
Para optar el título profesional en Biología

Aprobada el 26 de setiembre del 2013 por el jurado:

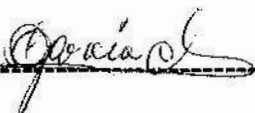
**Blgo. Leoncio Pacherras Mogollón
Presidente**



**Lic. Jorge Chanamé Céspedes
Secretario**



**Lic. Luis García Chiscul
Vocal**



**Dr. Pedro Chimoy Effio
Patrocinador**



**Gracias Dios por permitirnos estar aquí para esta tesis, por ser tu voluntad
antes que la nuestra.**



DEDICATORIA

A nuestras preciosas hijas, Jennifer y Jasmín,
quienes son nuestro motor y motivo para seguir
adelante.

A nuestros padres, quienes con su esfuerzo y
sacrificio, hicieron posible nuestro desarrollo como
personas y profesionales.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo, a la Facultad de Ciencias Biológicas, a los profesores en general por los conocimientos impartidos durante nuestra formación académica.

Al Dr. Pedro Chimoy Effio por su constante apoyo, asesoramiento y por brindarnos la oportunidad de realizar esta tesis.

ÍNDICE

	Pag.
Resumen.....	1
Abstract.....	2
Introducción.....	3
Antecedentes bibliográficos.....	4
II. Materiales y métodos.....	8
3.1 Materiales.....	8
3.1.1 Material Biológico.....	8
3.1.2 Material de Laboratorio.....	8
3.1.3 Reactivos.....	8
3.1.4 Sustrato.....	8
3.2 Métodos.....	9
3.2.1 Cuantificación de proteína.....	9
3.2.2 Actividad coagulante del veneno total.....	9
3.2.2.1 Actividad coagulante del veneno total <i>In Vivo</i>	9
3.2.2.2 Actividad coagulante del veneno total <i>In Vitro</i>	9
3.2.3 Purificación parcial de la proteína similar a trombina.....	10
3.2.4 Actividad coagulante de todas las fracciones del veneno obtenidas.....	10
3.2.4.1 Actividad coagulante <i>In Vivo</i>	10
3.2.4.2 Actividad coagulante <i>In Vitro</i>	10
3.2.5 Electroforesis en gel de poliacrilamida.....	11
III. Resultados.....	12
4.1 Identificación de la especie.....	12
4.2 Cuantificación de la proteína.....	12

4.3 Actividad coagulante del veneno total.....	13
4.3.1 Actividad coagulante del veneno total <i>In Vivo</i>	13
4.3.2 Actividad coagulante del veneno total <i>In Vitro</i>	16
4.4 Purificación parcial de la proteína similar a trombina.....	16
4.5 Actividad coagulante de las fracciones del veneno obtenidas.....	16
4.5.1 Actividad coagulante <i>In Vivo</i>	16
4.5.2 Actividad coagulante <i>In Vitro</i>	18
4.6 Electroforesis en gel de poliacrilamida.....	18
V. Discusión.....	22
VI. Conclusiones.....	25
VII. Recomendaciones.....	25
VIII. Referencias bibliográficas.....	26
Anexos.....	29

RESUMEN

Las serpientes son animales con la capacidad de producir sustancias compuestas por proteínas y/o otras sustancias (venenos) son nocivas para los tejidos orgánicos de ciertos animales incluyendo al hombre. En la actualidad los avances científicos y tecnológicos han ayudado en el estudio de los venenos de estos animales, llegando a descubrir efectos benéficos para la salud del hombre. El interés de este trabajo fue contribuir en el estudio de los venenos de animales, específicamente el estudio de venenos de serpientes. El espécimen elegido para este trabajo fue la serpiente *Bothrops barnetti*, “macanche”, reptil propio del departamento de Lambayeque, cuyo efecto general del veneno es proteolítico, es decir, destruye proteínas del organismo.

El objetivo de este trabajo fue determinar la actividad coagulante tipo trombina del veneno de la serpiente *B. barnetti* “macanche” del departamento de Lambayeque.

El veneno fue extraído a especímenes de *B. barnetti* y se ultrafiltró y guardó en alícuotas de 20 µL, para realizar distintas pruebas. Se cuantificó el contenido proteico del veneno total utilizando el método de Bradford usando como estándar BSA. Se determinó la actividad coagulante *In Vitro* e *In Vivo* del veneno total, así como las fracciones obtenidas mediante precipitación con sulfato de amonio en saturaciones de 10 al 80%. Se determinó además el peso molecular de la enzima tipo trombina por electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio (PAGE-SDS).

Los resultados mostraron una concentración proteica de 56.52 mg/mL en la primera muestra, y de 61.96 mg/mL en la segunda muestra. Así mismo se determinó que la actividad coagulante *In Vivo* del veneno total fue de 17 minutos en promedio e *In Vitro* de 20 minutos. En cambio para la determinación de la actividad coagulante *In Vivo* de las fracciones del veneno se tuvo que sacrificar a los ratones ya que las proteínas separadas no significaban mortalidad. La prueba de actividad coagulante de las fracciones con sulfato de amonio, demostró que las fracciones 10, 20 y 70% presentaron efecto coagulante en un tiempo de 16 minutos. Además se pudo observar una fracción con efecto hemorrágico, dato nuevo en el veneno de esta serpiente. El peso molecular determinado de la proteína tipo trombina por PAGE-SDS fue de 40.209 KD.

ABSTRACT

Snakes are the ability to produce substances composed of proteins and / or other substances (poisons) are harmful to organic tissue of certain animals including humans. At present the scientific and technological advances have helped in the study of poisons of these animals, reaching discover beneficial health effects of man. The interest of this work was to contribute to the study of animal venoms, specifically the study of snake venoms. The specimen chosen for this work was the snake *Bothrops barnetti*, "macanche" reptile itself Lambayeque department, whose overall effect is proteolytic venom , ie , destroys proteins in the body .

The aim of this study was to determine the thrombin-like coagulant activity of the venom of the snake *B. barnetti* "macanche" department of Lambayeque.

The venom was extracted specimens of *B. barnetti* and ultrafiltered and stored in aliquots of 20 uL, to perform different tests. Quantified the total venom protein content using the Bradford method using BSA as standard. Coagulant activity was determined in vitro and in vivo total venom and the fractions obtained by ammonium sulfate precipitation at saturation 10 to 80%. Also determined the molecular weight of the enzyme thrombin- by polyacrylamide gel electrophoresis with sodium dodecyl sulfate (PAGE- SDS).

The results showed a protein concentration of 56.52 mg / mL in the first sample and 61.96 mg / mL in the second sample. It also was determined that the coagulant activity In Vivo whole venom was 17 minutes on average and In Vitro 20 minutes. In contrast to the determination of the clotting activity in vivo venom fractions had to sacrifice mice as separate proteins meant no mortality. Coagulant activity test of the ammonium sulfate fractions, the fractions showed that 10, 20 and 70% coagulant effect presented in a time of 16 minutes. In addition we observed a fraction hemorrhagic effect , new data in the venom of this snake . Molecular weight as determined by the thrombin protein by SDS-PAGE was of 40.209 KD.

I. INTRODUCCIÓN

Uno de los principales problemas de salud que aflige a muchos pobladores de distintas zonas del Perú, es de los accidentes ofídicos u ofidismo.

Para la serpiente la función del veneno es procurar alimento inmovilizando a la presa rápidamente y colaborando en la digestión. La muerte de la presa resulta del efecto sinérgico de todos los componentes que muchas veces actúan potenciándose. Las proteínas son los componentes más importantes funcionalmente, por lo que no es sorprendente que constituyan parte del veneno.

Las serpientes del género *Bothrops* habitan en una extensa región de América que abarca desde México hasta Argentina, habiéndose descrito en nuestro país hasta 17 especies de este género, de las cuales la más abundante en el departamento de Lambayeque es *Bothrops barnetti* conocida como “macanche”.

El veneno del género *Bothrops* es conocido por su actividad coagulante, la cual depende principalmente de una enzima similar a trombina que coagula el fibrinógeno plasmático produciendo los micro coágulos los que a su vez son digeridos por el sistema fibrinolítico del animal o del paciente lo que da lugar a una coagulación intravascular diseminada inicial seguida de una desfibrinación y la consecuente incapacidad de la sangre para coagularse.

En el sistema circulatorio de los mamíferos, la proteína responsable de la conversión del fibrinógeno a fibrina, es la trombina. Esta proteína deriva de su precursor la protombina que se elabora en el hígado en presencia de vitamina K.

La trombina es una serinoproteasa que ataca al fibrinógeno en el enlace Arg-Gly de las cadenas A alfa y B beta del fibrinógeno. Es necesario recordar, que la molécula del fibrinógeno está formada por 6 cadenas polipeptídicas unidas por puentes de disulfuro: 2 A alfa, 2 B beta y 2 gamma.

La participación de la trombina aun cuando es fundamental en el proceso de coagulación, resulta ser sólo una de las varias etapas de un proceso general llamado hemostasis. La injuria de un vaso sanguíneo causa el inicio de este proceso ya que al salir de la sangre, se produce la contracción del vaso y posteriormente la fibrinólisis mediante la cual los coágulos formados son digeridos por acción de la plasmina restableciéndose de esta manera el flujo normal de la sangre.

El nuestro país existen estudios sobre efecto coagulante de venenos realizados en diferentes especies de serpientes, sin embargo, no existe registro de

estudios en el veneno de la serpiente *B. barnetti* “macanche” que es propia del departamento de Lambayeque, siendo este trabajo el primero en registrar datos sobre los efectos de este veneno, en particular efecto coagulante atribuidos a una proteína tipo trombina.

II. ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS

Desde tiempos remotos, a las serpientes se les consideró como los más cautelosos y peligrosos animales, a tal punto que muy pocas personas se sintieron estimuladas para realizar estudios sobre serpientes, más aun si eran venenosas, debido fundamentalmente a los peligros que representan sus mordeduras (Yarleque, 1996).

Sobre las serpientes se han escrito una serie de mitos y supersticiones. Charas por ejemplo sostenía que las mordeduras de estas eran peligrosas sólo cuando el animal estaba irritado (Mesia, 1996).

Posteriormente Redi en 1664 demostró después de múltiples observaciones que no sólo el veneno era efectivo por vía oral, sino que tales venenos eran igual de peligrosos si provenían de serpientes vivas o muertas recientemente.

Recién a partir de 1884 se tuvieron las primeras evidencias de que los venenos de serpientes contenían enzimas proteolíticas, capaces de destruir los tejidos de los mamíferos así como de hidrolizar las proteínas inmersas en sus fluidos biológicos. Varios venenos contienen factores coagulantes y anticoagulantes (Ouyang, 1957; Nahas *et al.*, 1964; Mohamed *et al.*, 1969).

En inicios del presente siglo, aparecieron las primeras publicaciones acerca de las propiedades coagulantes de algunos venenos ofídicos (Mellamby, 1909). Sin embargo, a partir de 1967 se han empezado a obtener proteínas purificadas por su acción semejante a trombina, lo que da lugar a la formación de coágulos de fibrina semejantes a los que forma la trombina plasmática (Denson *et al.*, 1967; Esnouf y Tunnah, 1967).

Las serpientes venenosas en el Perú están agrupadas en dos familias: Crotalidae y Elapidae siendo la primera de gran importancia patológica por ser muy venenosa y peligrosa para el hombre. Dentro de la familia Crotalidae, se encuentra por ejemplo a *Lachesis muta* “shushupe” considerada una de las serpientes venenosas de mayor tamaño en el mundo alcanzando una longitud de 4 metros. Se ha determinado que el veneno de *L. muta* tiene actividad proteolítica, hemorrágica y coagulante (Brazil y Vellar, 1928; Deutsch y Diniz, 1955; Gutierrez y

Chavez, 1980), siendo responsable de esta última una enzima similar a la trombina, es decir, que transforma el fibrinógeno en fibrina.

Otro integrante de esta familia lo constituye el género *Bothrops*, que cuenta con 17 especies distribuidas en diversas regiones naturales del Perú (Schwert y Takenaka, 1955; Meneses, 1974). Dentro de las especies del género *Bothrops* se encuentra por ejemplo *Bothrops pictus* “jergón de la costa”; en su veneno crudo se ha determinado la presencia de enzimas tales como endopeptidasas, fosfolipasas, fosfatasa ácida, fosfatasa alcalina, así como la presencia de la enzima similar a trombina que es responsable de la acción coagulante de este veneno (Olascoaga, 1987). La eliminación de enzimas similares a trombina se hace a través de la orina y del sistema retículo endotelial (Seggers *et al.*, 1979).

Una de la actividades que con mayor frecuencia se encuentra en los venenos crotálicos es la actividad coagulante (Lee, 1979). Como es sabido, la coagulación sanguínea es un proceso complejo en cuya etapa final el fibrinógeno se convierte en fibrina por acción de la trombina. Los venenos de serpientes pueden inducir a la coagulación por una de las siguientes causas: tener actividad semejante a tromboplastina, contener algunos activadores de los factores de la coagulación o poseer actividad semejante a trombina.

A inicios del presente siglo, aparecieron las primeras publicaciones acerca de las propiedades coagulantes de algunos venenos ofídicos (Sordella, 1919). Sin embargo, solamente a partir de 1967 se han empezado a obtener proteínas purificadas a las cuales se les denominan Enzima semejante a trombina por su acción específica sobre el fibrinógeno lo que da lugar a la formación de coágulos de fibrina semejantes a los que forma la trombina plasmática. (Esnouf y Tunnah, 1967).

Campos y Col. (1985) reportaron la purificación parcial de la enzima semejante a trombina del veneno de *Lachesis muta* la cual tenía una potencia coagulante equivalente a 168 unidades (NIH) de trombina y un peso molecular (PM) cercano a 50 KD. Finalmente en 1987, Yarlequé describió el procedimiento de purificación total de esta enzima, determinando que su potencia coagulante es de 885.7 NIH y su peso molecular calculado por electroforesis en gel de poliacrilamida es de 40 KD.

Se han purificado enzimas similares a trombina de diferentes venenos, tales como la del veneno de *Agkistrodon contortrix contortrix* (Herzig *et al.*, 1970), *A. acutus* (Ouyang *et al.*, 1971), *Triremesurus gramineus*, *T. okinavensis* (Anderson, 1972). La crotalasa del veneno de la cascabel norteamericana *Crotalus adamantes* (Markland y Damus, 1971), así como enzimas similares a trombina del veneno del género *Bothrops* que son utilizadas en humanos para contener hemorragias locales por su alta capacidad para coagular la sangre; dentro de estas se encuentra por ejemplo Batroxobin del veneno de *B. asper*, *B. morajoensis*, *B.*

moojeni (Stocker *et al.*, 1974) y Reptilasa de *B. atrox* (Seggers y Ouyang, 1979). Se ha podido determinar también que la enzima similar a trombina remueve el fibrinopéptido A del fibrinógeno para la formación de fibrina, a diferencia de la trombina que remueve los fibrinopéptidos A y B.

En nuestro país, los primeros estudios sobre la acción coagulante del veneno de la especie *Lachesis muta* indicaron una elevada acción sobre el plasma humano citratado aun luego de ser calentado el veneno a 100° C. Luego de la identificación realizada por Loayza y col., 1985, se reportó la purificación parcial de esta proteína y posteriormente su aislamiento y caracterización total (Yarleque, 1987).

Los venenos crotálicos y vipéridos se caracterizan por producir desórdenes en la coagulación sanguínea; inicialmente se creía que algunos eran coagulantes y otros anticoagulantes, pero la investigación moderna ha demostrado que un mismo veneno puede ser anticoagulante en altas concentraciones y coagulantes a bajas concentraciones (Labid y col., 1979). Esto se debe a que en concentraciones bajas, la acción semejante a trombina y las otras proteínas coagulantes del veneno dan lugar a la formación de fibrina a partir del fibrinógeno y por tanto a la visualización del coágulo, en cambio, al elevarse la concentración del veneno, se incrementa también la fibrinólisis debido al aumento de las proteinasas que específica o inespecíficamente pueden digerir la fibrina. A esto se debe la observación clínica de que cuando un animal de experimentación recibe inyección de veneno ofídico, sufren inicialmente coagulación masiva a dosis bajas. Sin embargo, en el sistema circulatorio, el veneno inyectado produce coágulos de fibrina cuya estructura es diferente de aquella formada por la trombina, debido a que la mayoría de los venenos producen ataque enzimático solo a nivel de las cadenas A α , mientras que la trombina libera fibrinopéptidos de las cadenas A α y B β y dado que la malla de fibrina se va a estructurar a partir de los monómeros resultantes luego de esta acción enzimática, esta tendrá evidentemente una conformación distinta. En realidad lo que se forman son microcoágulos que son rápidamente digeridos por la plasmina, enzima proteolítica presente en el plasma bajo la forma de plasminógeno.

Esta información preliminar nos sirvió para detectar la actividad coagulante del tipo trombina del veneno de *Bothrops barnetti* "macanche" del departamento de Lambayeque.

HEMOSTASIA Y COAGULACIÓN

La hemostasia es la detención de la hemorragia por las propiedades fisiológicas de vasoconstricción y coagulación, así como también de métodos quirúrgicos.

Para que la hemostasia se mantenga normal y regulada, debe haber buena integridad vascular, lo cual se logra por 4 factores biológicos:

- Endotelio Vascular
- Macromoléculas sub-endoteliales que forman el vaso sanguíneo
- Plaquetas
- Factores de coagulación plasmática

La alteración del equilibrio normal entre factores pro-coagulantes y anticoagulantes puede llegar a producir alteraciones hemorrágicas y trombocíticas.

La hemostasia previene la pérdida de sangre, lo cual se realiza mediante los siguientes mecanismos:

- Espasmo Vascular
- Formación del tapón plaquetario (Hemostasia Primaria)
- Cascada de Coagulación (Hemostasia secundaria)

El Espasmo Vascular

Vasoconstricción neurogénica transitoria, reduciendo así la salida de sangre duración aprox. 20 min.

Formación del tapón plaquetario (hemostasia primaria)

Es el intento de las plaquetas de cerrar el vaso, las plaquetas son discos redondos de 2 micras, fragmentos de los megacariocitos y su concentración en sangre es de 200,000- 400,000 /mm³.

Cuando las plaquetas entran en contacto con las fibras colágenas del vaso roto, se hinchan de inmediato y se vuelven adherentes, secretando grandes cantidades de ADP, el cual activa a otras plaquetas, adhiriéndose más a la matriz sub-endotelial, endotelio vascular y entre ellas, en esta reacción se necesita el factor de Von Willebrand (Fact. VIII). A medida que las plaquetas se van adhiriendo cada vez más se activan y liberan tromboxano A₂, que es el inductor de la agregación plaquetaria y un constrictor de músculo liso arterial, produciendo mayor vasoconstricción.

Cascada de Coagulación (hemostasia secundaria)

Es una secuencia compleja de reacciones proteolíticas que terminan con la formación del coágulo de fibrina, el coágulo se empieza a desarrollar en 15-20 seg. El proceso de coagulación se inicia por sustancias activadoras secretadas por el vaso, las plaquetas y proteínas sanguíneas adheridas a la pared del vaso. La cascada de coagulación esta formada por dos vías: Extrínseca e Intrínseca, que al unirse, ambas vías forman la Vía Común, dándonos como resultado final fibrina entrecruzada que es la formadora del coágulo. (Martínez-Murillo, 2009), (Páramo y Col., 2009), (Gayton, 1992), (Marco y Col., 2009).

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Materiales

3.1.1 Material Biológico:

Se utilizó el veneno de ejemplares adultos de *Bothrops barnetti* cazados en los bosques secos del departamento de Lambayeque (Olmos, Las Pampas) (Fig. 8), identificados por el experto en herpetofauna de la zona el médico veterinario Pablo Venegas.

El veneno fue extraído manualmente presionando la glándula venenosa de las serpientes (Fig. 9). Luego el veneno fue ultrafiltrado y se hicieron alícuotas de 20 µL de veneno por tubo.

3.1.2 Material de Laboratorio

- Espectrofotómetro UNICO UV/VIS
- Balanza analítica
- Ultrafiltro
- Centrífuga
- Micropipetas
- Tubos de ensayo
- Jeringas de tuberculina

3.1.3 Reactivos

- Bradford
- Sulfato de amonio
- Tris-HCl 3M pH 8.9
- Tris-HCl 1M pH 6.8
- Tris HCl 0.05 M pH 7.4
- Citrato de sodio 3.8%
- Agua destilada
- Acrilamida
- Bisacrilamida
- TEMED
- Mercaptoetanol
- Coomassie blue R-250

3.1.4 Sustrato

- Ratones albinos
- Plasma citratado
- Fibrinógeno bovino

3.2 Métodos

3.2.1 Cuantificación de la proteína

Se utilizó el método de Bradford (1976) usando como estándar BSA. Se tomó una batería de 9 tubos de ensayo, donde Tb es el tubo blanco que contiene 100 μ L de agua destilada y 1 mL del reactivo de Bradford. Los tubos, T1 al T4, son los que nos ayudarán a realizar nuestra curva de calibración y los tubos, TX1 y TX2, con sus respectivas repeticiones (TX1' y TX2'), son los que contienen el veneno de la serpiente (Tab. 1).

Tab. 1 Batería de tubos de ensayo para el método de Bradford utilizando como estándar BSA.

	T1	T2	T3	T4	TX1	TX1'	TX2	TX2'	Tb
Agua destilada (μ L)	90	80	70	60	90	90	90	90	100
Estándar (albúmina) (μ L)	10	20	30	40	-	-	-	-	-
Veneno (μ L)	-	-	-	-	10	10	10	10	-
Bradford (mL)	1	1	1	1	1	1	1	1	1

Luego cada tubo de ensayo se llevó al espectrofotómetro para determinar su absorbancia, usando un filtro de longitud de onda de 595 nm.

3.2.2 Actividad coagulante del veneno total

En esta prueba se observó la presencia de coágulo y se midió el tiempo de formación de este originado por la acción de la enzima similar a la trombina del veneno sobre el fibrinógeno tanto *In Vivo* como *In Vitro*.

3.2.2.1 Actividad coagulante del veneno total *In Vivo*

Para la determinación de la actividad coagulante *In Vivo*, se inyectó a 6 ratones albinos de 14-16 gramos de peso, 20 μ L de veneno crudo en la zona intracutánea.

3.2.2.2 Actividad coagulante del veneno total *In Vitro*

Para la determinación de la actividad coagulante *In Vitro* se utilizó como sustratos plasma citratado y fibrinógeno bovino. El primero se obtuvo por extracción de 9 mL de sangre venosa en 1 mL de citrato de sodio (3.8%), dejándose en reposo por 10 minutos a 4°C y luego se centrifuga a 2500 rpm. Posteriormente se mezcló 200 μ L de plasma citratado, 100 μ L de solución fisiológica y 100 μ L de veneno. El fibrinógeno bovino estuvo a una concentración de 5 mL/mg en buffer Tris HCl 0.05 M pH 7.4; la mezcla de la reacción contenía 200 μ L del sustrato y 100 μ L de cloruro de

sodio 0.9% tamponado a pH 7.4; preincubándose por 10 minutos a 37° C para luego agregar 100 µL del veneno crudo.

3.2.3 Purificación parcial de la proteína similar a la trombina (precipitación con sulfato de amonio)

Para la purificación parcial de la proteína similar a la trombina se disolvió 300 µL de veneno crudo en 2.7 mL de solución salina. Posteriormente el veneno diluido fue ultrafiltrado para evitar la presencia de células epiteliales y agentes contaminantes. Una vez ultrafiltrado el veneno diluido, se le agrega sulfato de amonio a porcentajes entre 10 al 80% de saturación. Se conoce que las proteínas contienen diferente número de iones de hidrógeno, los que son sustraídos por el sulfato. Dependiendo de la naturaleza de la proteína y su número de iones de hidrógeno; las proteínas pueden precipitar a un determinado porcentaje de saturación.

Después de añadir el precipitante, se centrifuga a 5000 rpm por 20 minutos y a 4° C. Por cada 20 minutos que pasan se recoge el sobrenadante en otro tubo de ensayo y se vuelve a centrifugar, quedando en el primer tubo el precipitado, es decir, la primera fracción de proteínas al 10%, repitiéndose este procedimiento hasta llegar al 80% (Chimoy *et al.* , 1989)

3.2.4 Actividad coagulante de todas las fracciones del veneno obtenidas.

3.2.4.1 Actividad coagulante *In Vivo* de las fracciones del veneno obtenidas.

Se Inyectó 50 µL de cada fracción precipitada en 10 ratones albinos en la zona intracutánea. Se utilizó un ratón como grupo control inyectándolo 50 µL de solución salina.

3.2.4.2 Actividad coagulante *In Vitro* de las fracciones del veneno obtenidas.

En tubos de ensayo se colocó 50 µL de plasma citratado, luego se le agregó 25 µL de solución salina y 25 µL de cada fracción, controlando el tiempo de coagulación usando otros tubos de ensayo con cada fracción y solución salina como control. El fibrinógeno bovino estuvo a una concentración de 5 mL/mg en buffer Tris HCl 0.05 M pH 7.4; la mezcla de la reacción contenía 50 µL del sustrato y 25 µL de solución salina tamponado a pH 7.4; preincubándose por 10 minutos a 37° C para luego agregar 25 µL del veneno crudo.

3.2.5 Electroforesis en gel de Poliacrilamida con SDS

Con la finalidad de observar las proteínas de cada fracción del veneno, se empleó PAGE – SDS de acuerdo a Chimoy *et al.* (1989). Para la preparación del gel de resolución se mezcló 4.4 mL de agua destilada, 4.2 mL de solución stock de acrilamida (30 % de acrilamida y 0.8 % de bisacrilamida), 0.1 mL de SDS, 1.25 mL de Tris-HCl 3M pH 8.9, 10 µL de TEMED y 100 µL de PERSA 10%. Inmediatamente se mezcló y se vertió en la cámara electroforética, cubriéndose con una delgada capa de SDS 0.1 % y después de gelificar se agregó el gel de Stacking, el cual se preparó con 0.025 mL de solución stock de acrilamida, 3.55 mL de agua destilada, 0.05 mL de SDS 10 %, 0.63 mL de Tris-HCl 1M pH 6.8, 7.5 µL de TEMED, 75 µL de PERSA al 10 %. Cada fracción del veneno se colocó en una respectiva celda de la cámara de electroforesis. La corrida electroforética se realizó a voltaje constante, (80 voltios) durante 90 minutos. Concluida la corrida el gel de Stacking fue eliminado y el gel de resolución se tiñó con azul brillante de Comassie 0.1 % por 5 minutos. Luego se procedió a la decoloración en una solución decolorante (metanol, ácido acético y agua) hasta visualizar las bandas de proteínas. Finalmente el resultado fue escaneado para su registro respectivo.

IV. RESULTADOS

4.1 Identificación de la especie

La especie escogida para esta tesis fue *Bothrops barnetti* " conocida también como "macanche", sin embargo este último nombre se le atribuye mayormente a la *Boa constrictor ortonii* perteneciente a la familia Boidae , la cual no posee veneno.

Bothrops barnetti (Fig. 8) pertenece a la sub familia Crotalinae, familia Viperidae super familia Caenophidia, a esta última pertenecen también las familias Elapidae y Colubridae Esta es la única serpiente venenosa que se ha registrado en las tres regiones del Perú, en los departamentos de La Libertad, Lambayeque, Cajamarca Piura y Tumbes. Este ofidio posee una longitud entre 57 - 85 cm, la parte dorsal de la cabeza y el cuerpo varía de un color marrón medio a un gris pálido o un color paja llegando a ser pálido lateralmente. La parte superior posee una marca característica de color marrón oscuro en forma de "V", con manchas marrones longitudinales que van desde los ojos hasta el cuello (Fig.10). La coloración marrón está presente como puntos discretos en la parte ventral. Las partes de los costados de la cabeza son color crema. El iris del ojo es café, casi como el dorsal del cuerpo. Las escamas que están arriba de los ojos pueden ser más oscuras que el dorso de la cabeza. El cuerpo presenta de 17 a 24 pares de manchas triangulares o trapezoides café oscuro bordeadas por color claro que están alternadas a cada lado. Las bases de estas manchas están invadidas por el pigmento claro de los costados del cuerpo produciendo pares de puntos café, algunas veces con un punto pequeño entre ellos. Las manchas dorsales parecen estar más concentradas hacia la cola dando la apariencia de bandas alternadas o anillos cafés, generalmente se aprecian entre 7 y 10 bandas en la cola.

4.2 Cuantificación de la proteína

La tabla 2 muestra la absorbancia obtenida del patrón estándar (T1 al T4), las cuales nos sirvieron para realizar la curva de calibración (Fig. 1). Se observa también la absorbancia de las muestras con veneno (TX1 y TX2) con sus respectivas repeticiones (TX1' y TX2'), de donde se calculó el contenido proteico.

Tab. 2 Absorbancia con filtro de 595 nm

TUBOS	ABSORBANCIA
T1	0.34
T2	0.60
T3	0.76
T4	0.90
TX1	0.71
TX1'	0.71
TX2	0.76
TX2'	0.76

Estos valores se sometieron a una curva estándar de regresión, y de acuerdo al grado de confiabilidad obtenido, se eliminó el primer dato.

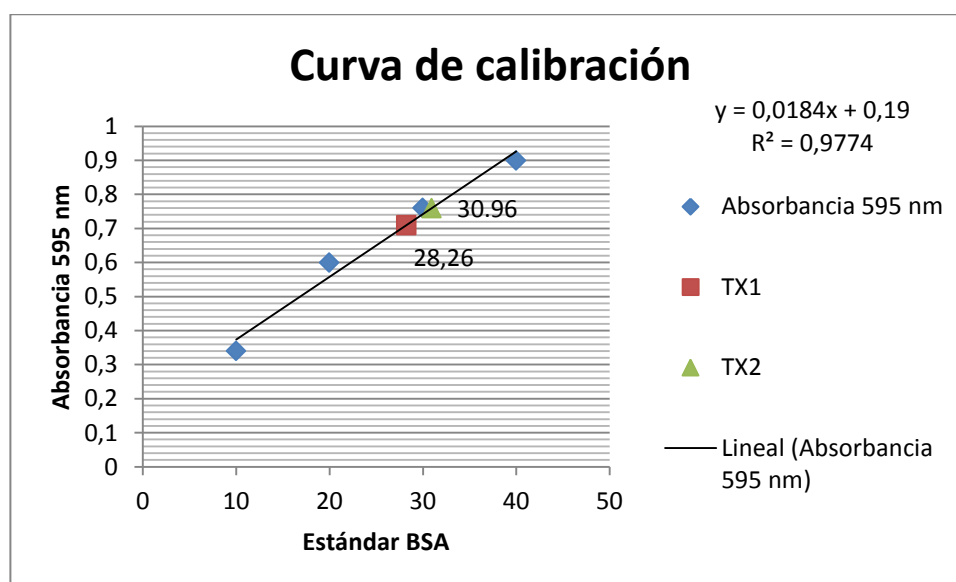


Fig.1 Curva de calibración para la obtención de la cantidad proteica del veneno de *Bothrops barnetti* "macanche"

De esta curva estándar obtenemos la fórmula: $y = 0.0184x + 0.19$, donde "y" será reemplazado por los valores de absorbancia de los TX1 y TX2. Despejamos "x" para obtener la cantidad total de proteína por mililitro de veneno.

$$\text{➤ TX1} = \frac{0.71 - 0.19}{0.0184} = \frac{28.26 \times 2000}{1000} = 56.52 \text{ mg/ml}$$

$$\text{➤ TX2} = \frac{0.76 - 0.19}{0.0184} = \frac{30.98 \times 2000}{1000} = 61.96 \text{ mg/ml}$$

4.3 Actividad coagulante del veneno total

4.3.1 Actividad coagulante del veneno total *In Vivo*

Después de inyectado el veneno crudo en los ratones se tomó el tiempo de muerte, donde obtuvimos los siguientes resultados:

Tab. 3 Tiempo de muerte en ratones albinos inyectados con el veneno crudo total.

Ratón #	Tiempo (minutos)
1	20
2	17
3	15
4	16
5	16
6	18
PROMEDIO	17

El tiempo promedio de muerte es de 17 minutos. Para la observación de coágulo sanguíneo se procedió a diseccionar a los ratones (Figs. 2 y 3).

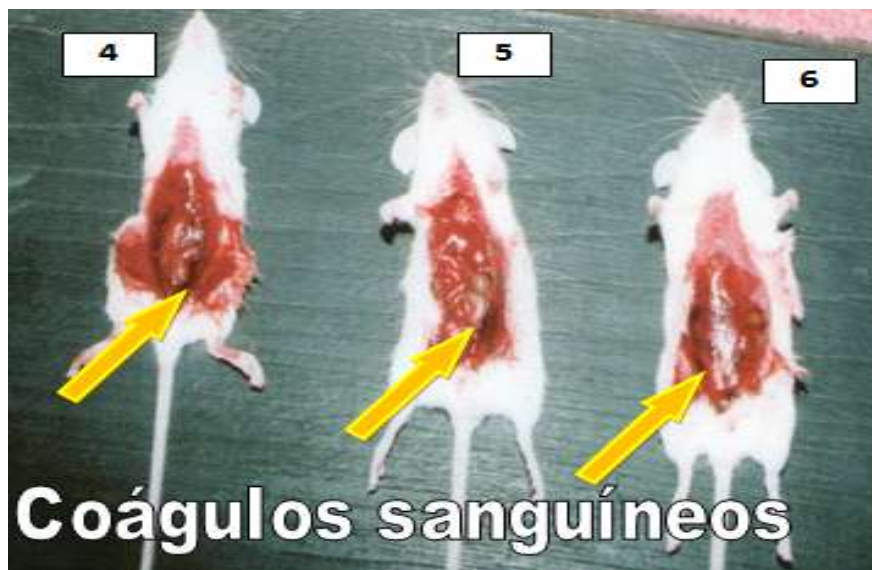
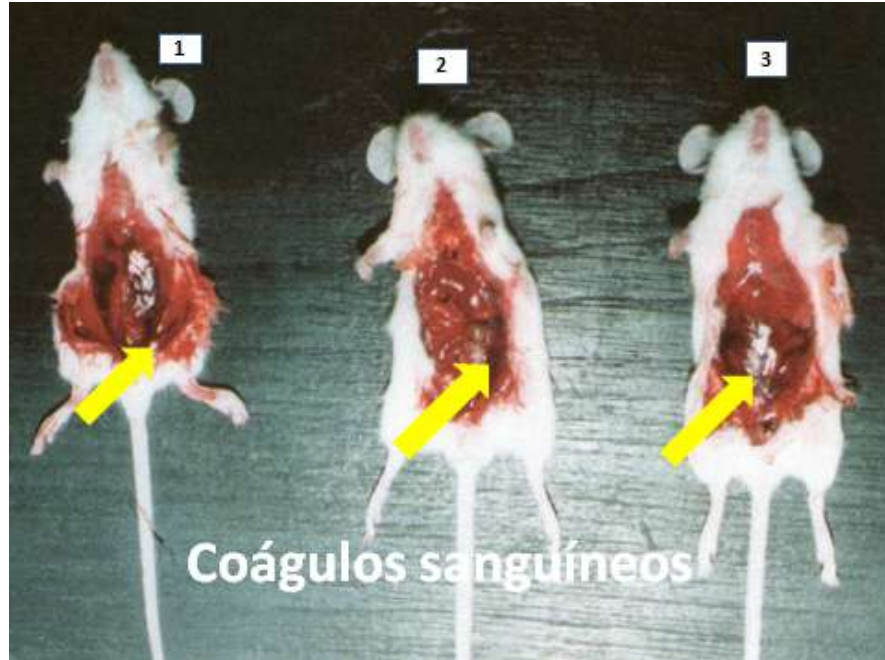


Fig. 2 y Fig. Fig. 2 y Fig. 3 Observación de coágulos sanguíneos en ratones sometidos al veneno crudo de la serpiente *Bothrops banetti* "macanche".

4.3.2 Actividad coagulante del veneno total *In Vitro*

Se observó que tanto el plasma citratado y el fibrinógeno bovino fueron totalmente coagulados en un tiempo de 20 minutos. Tal como se indicó en secciones anteriores, la enzima tipo trombina es capaz de atacar el fibrinógeno del plasma citratado y del fibrinógeno bovino hasta una coagulación total.

4.4 Purificación parcial de la proteína similar a trombina (precipitación con sulfato de amonio).

La precipitación salina es uno de los métodos de separación de proteínas en estado natural (actividad biológica). El sulfato de amonio es una de las sales más utilizadas para la precipitación salina de proteínas. El sulfato de amonio es muy soluble y el ión sulfato divalente permite alcanzar altas fuerzas iónicas. Las proteínas en solución son menos solubles cuando se aumenta la fuerza iónica y esto se puede lograr adicionando sales solubles como el sulfato de amonio. Sin embargo la concentración para precipitar proteínas es variable.

Con esta técnica se obtuvo los precipitados del veneno desde 10 % a 80% de saturación del sulfato de amonio. Se observa en los sobrenadantes una coloración transparente en las fracciones 10, 20, 30, 40, 60, 70 y 80%, diferenciándose solo la fracción de 50% que tuvo una coloración amarillenta.

4.5 Actividad coagulante de las fracciones del veneno obtenidas

4.5.1 Actividad coagulante de las fracciones precipitadas del veneno *In Vivo*

Lo que se pudo observar en la mayoría de ratones inyectados con las fracciones del veneno fue, que las proteínas separadas unas de otras no son mortales, ya que pasado un tiempo determinado se tuvo que sacrificar a los ratones para observar la presencia de coágulos sanguíneos. Sin embargo, el ratón inyectado con la fracción 50% si murió a los 15 minutos después de ser inyectado, a causa de una hemorragia severa (Fig. 4). De los ratones sacrificados presentaron coágulos sanguíneos los ratones inyectados con las fracciones 10%, 20% y 70% (Fig. 4). Los demás ratones no presentaron ni coágulo ni hemorragia.

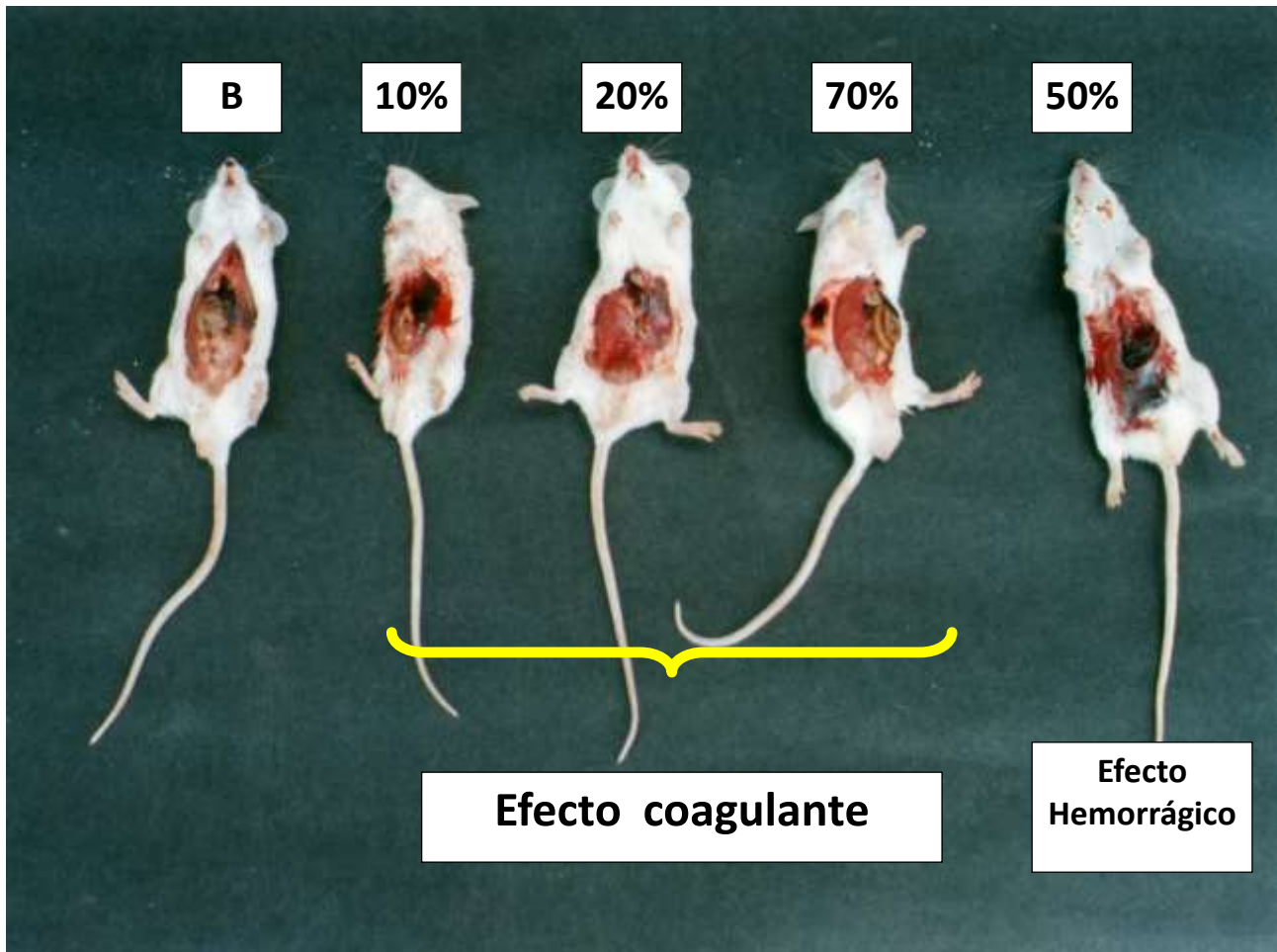


Fig. 4 Efecto de las fracciones del veneno de *Bothrops barnetti* “macanche” inyectadas en la zona intracutánea de ratones albinos. B es el ratón control. En las fracciones 10%, 20% y 70% se puede observar la presencia de coágulo sanguíneo. En la fracción 50% se observa una hemorragia severa, la cual ocasionó la muerte del ratón en un tiempo de 15 minutos.

4.5.2 Actividad coagulante de las fracciones precipitadas del veneno *In Vitro*.

Esta prueba corroboró los resultados obtenidos en el procedimiento de actividad coagulante de las fracciones precipitadas *In Vivo* (Fig. 4), es decir, el plasma citratado y el fibrinógeno bovino fueron coagulados en un tiempo promedio de 16 minutos por las fracciones de 10%, 20% y 70% (Fig.12). Las demás fracciones no presentaron signos de coagulación.

4.6 Electroforesis en gel de Poliacrilamida con SDS

La corrida electroforética se realizó con el objetivo de observar la distribución de las proteínas en cada fracción, y así poder diferenciarlas de acuerdo a los resultados obtenidos en las pruebas anteriores, y afirmar que las proteínas diferenciales son las que ocasionan tales efectos anteriormente observados en las distintas pruebas.

En la corrida electroforética se puede apreciar una banda de proteína semejante en las fracciones 10%, 20% y 70% (Fig. 5), fracciones que presentaron actividad coagulante, además las corridas de las otras fracciones no presentan esta banda, lo que nos permite suponer que esta enzima es la responsable de la coagulación sanguínea tipo trombina. Por otro lado en las fracciones 40% y 50% se observa una banda proteica bien pronunciada y la cual no presentan las otras fracciones, por tal motivo se afirma que se trata de la enzima responsable de hemorragia.

Las demás bandas proteicas no son consideradas por el momento ya que se presentan semejantes en todas las fracciones del veneno.

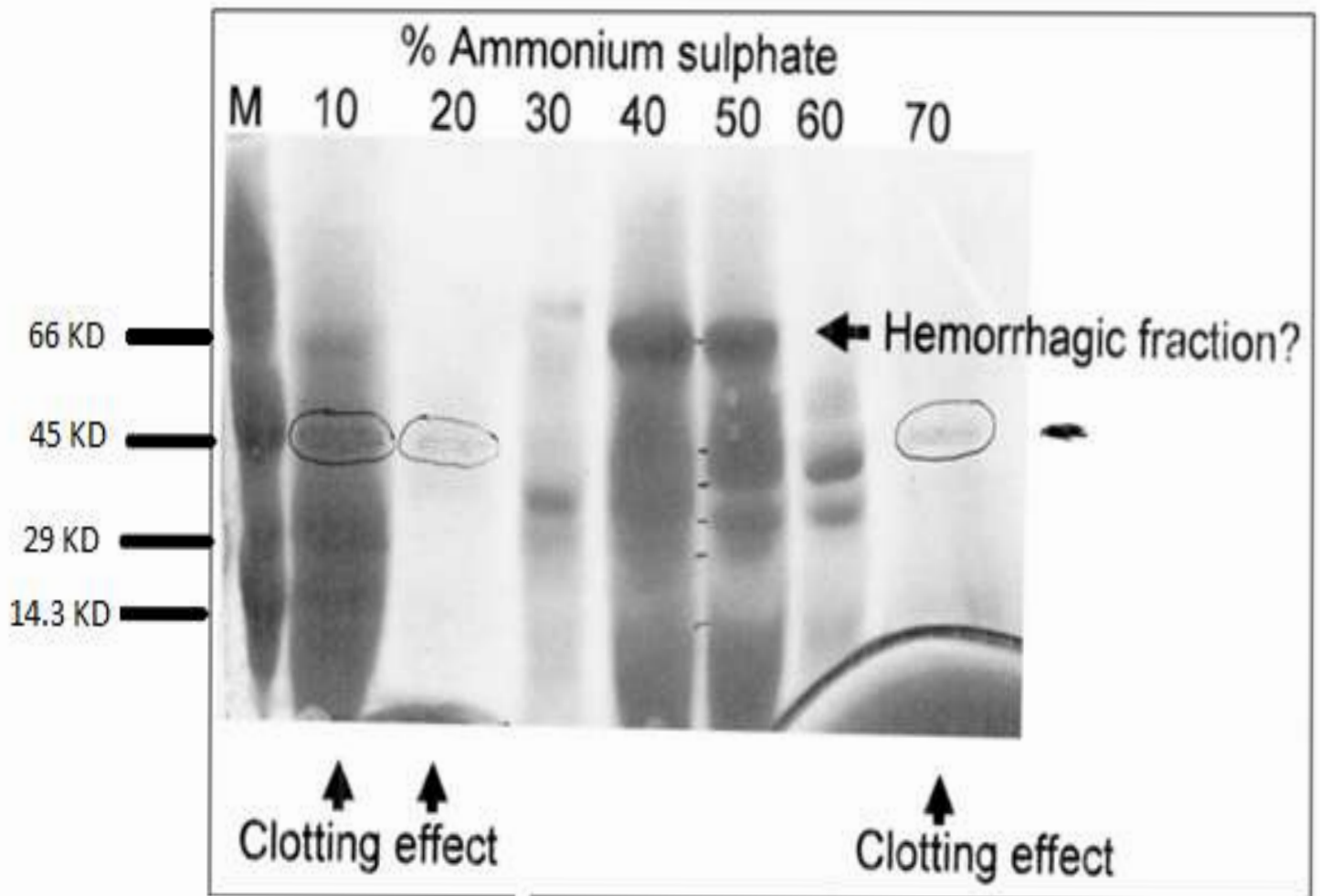


Fig. 5 En las fracciones de 10%, 20% y 70% se puede apreciar una banda proteica semejante (banda proteica señalada con círculo). En las fracciones 40% y 50% se aprecia una banda proteica pronunciada (banda proteica señalada con flecha).

El desplazamiento de las cadenas polipeptídicas es proporcional al logaritmo de la masa, esto nos permitió estimar el peso molecular (PM) de la proteína tipo trombina comparándola con la distancia de migración de un patrón de proteínas de peso molecular conocido (Markers) (Tab. 4). Entonces, con los valores del marcador de peso molecular, se construyó primero una curva de calibración donde se graficó los logaritmos PM vs el movilidad relativa (Rf). El Rf es la relación entre la distancia de migración de la banda proteica y la longitud de corrida total del gel, es decir, la distancia desde el borde superior del gel hasta el frente de corrida. Con estos valores se obtuvo la ecuación lineal: Luego se calculó el Rf de la proteína tipo trombina y se interpola en la curva el log (PM) (Fig. 6), y aplicando el antilogaritmo se obtuvo el PM de la proteína tipo trombina (45.027 KDa) (Tab. 4).

Tab. 4 Determinación del peso molecular de la proteína tipo trombina del veneno de *Bothrops barnetti* "macanche" mediante PAGE-SDS.

Markers	Peso Molecular (KDa)	Distancia (mm)	Rf (65 mm)
Albúmina de bovino	66.000	19	0.292
Ovoalbúmina	45.000	32	0.492
Anhidrasa carbónica	29.000	44	0.676
Lysosima	14.300	55	0.846
Proteína Tipo Trombina	40.209	33	0.507

Con estos valores se obtuvo la ecuación lineal:

$$Y = -1.1751X + 5.2001$$

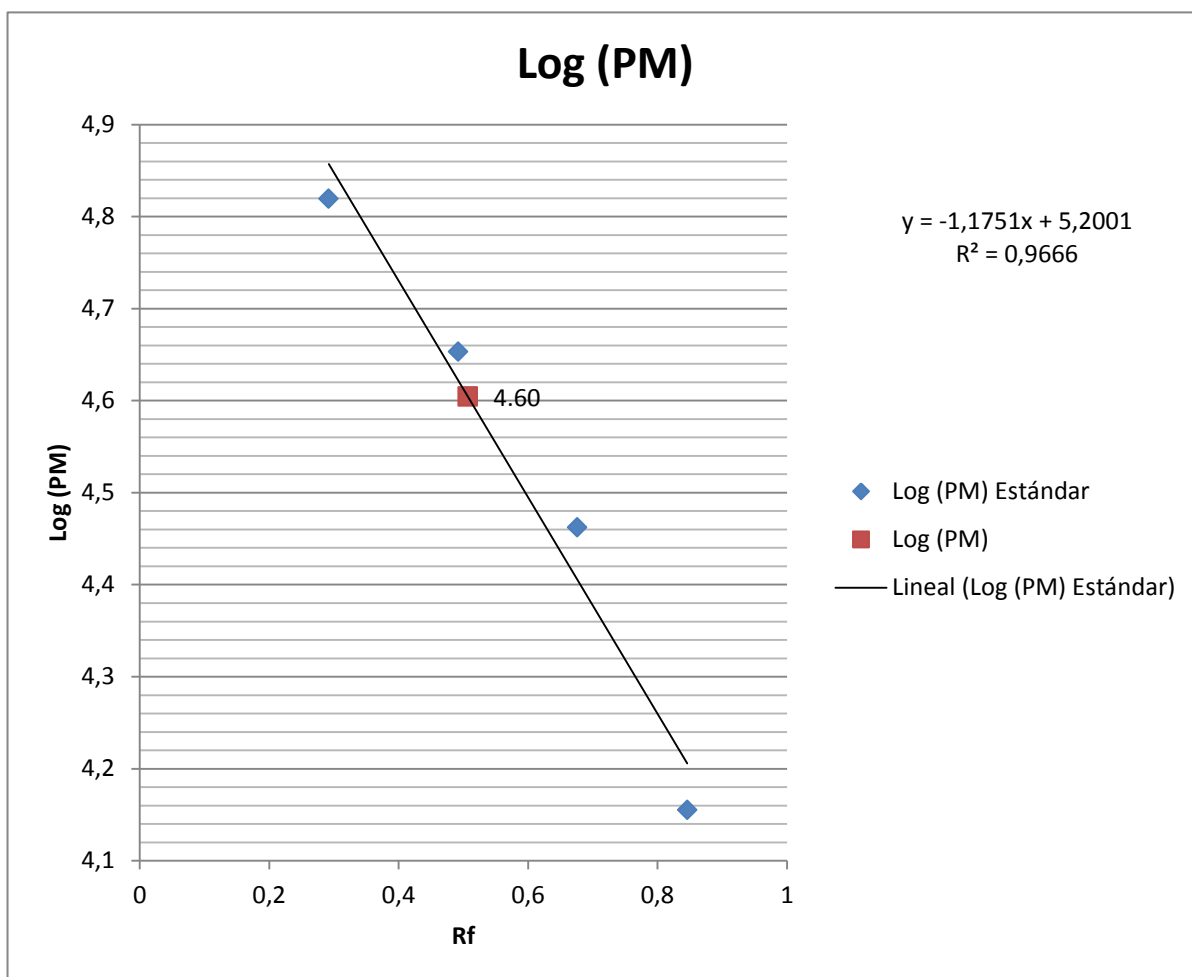


Fig. 6 Curva de calibración con los pesos moleculares de los marcadores. Peso molecular de la proteína tipo trombina.

V. DISCUSIÓN

Contenido proteico

El veneno ofídico es una mixtura de componentes y quizás, sin temor a equivocaciones, sea uno de los fluidos secretados de más alta concentración proteica que un vertebrado pueda producir. Cerca del 90% de los componentes sólidos del veneno de una serpiente son proteínas y péptidos causantes de la mayoría de efectos tóxicos o biológicos producidos por la mordedura de este animal. La fracción no proteica, consiste en cationes y aniones inorgánicos, sustancias de bajo peso molecular tales como aminoácidos, péptidos pequeños, lípidos, nucleótidos, nucleósidos, carbohidratos y aminas (Stocker, 1990).

La Cuantificación proteica de los venenos de serpiente se puede realizar por varios métodos. En este trabajo se utilizó el método de Bradford útil para la determinación proteica del veneno de *Bothrops barnetti* (Tab.1), ya que su alta concentración permite conferir un rango confiable de lectura, por otro lado, en muchos trabajos, son utilizados los métodos de Lowry, de absorbancia a 280 nm. El contenido de proteínas del veneno de *B. barnetti* fue de 56.52 mg/mL - 61.96 mg/mL. Este resultado es aproximado al encontrado en otras serpientes peruanas de la subfamilia Crotalidae como *Bothrops pictus* (63.800 mg/mL) y *B. atrox* (69.200 mg/mL) (Cardenas, 1995). Sin embargo posee una menor cantidad con respecto a *Crotalus durissus terrificus* de Argentina (81.400 mg/mL) y de Brasil (79.900 mg/mL) (Yarlequé, 1987). Es inmediato, entonces, manifestar que el contenido proteico varía de acuerdo a los géneros y especies pero, sin desmerecer lo dicho anteriormente, estas variaciones están mayormente atribuidas a factores propios de un mismo espécimen, es decir, la variación individual tales como: edad, dieta alimentaria, distribución geográfica y estación de año donde se recolecta el veneno (Chippaux, *et al.* 1991).

Actividad coagulante

Muchos venenos de serpiente afectan el sistema de coagulación sanguínea ya sea acelerándolo o retardándolo. De ello se deduce que los venenos pueden ser procoagulantes o coagulantes simplemente y anticoagulantes. Este último caso ocurre si la actividad fibrinolítica del veneno es más potente que la actividad coagulante, la fibrina se destruye tan pronto como es formada y si la acción coagulante es mayor el coágulo se desintegra lentamente (Tu *et. al.* 1966), por tanto la inyección de un veneno con estas propiedades como el de *Naja nigricollis* coagula el plasma humano en diferentes tiempos dependiendo de su concentración (Moaume, *et. al.* 1966).

Las enzimas coagulantes son llamadas generalmente enzimas semejantes o similares a Trombina ya que estas actúan sobre el fibrinógeno de la sangre para convertirlo en fibrina de la misma forma que lo haría la trombina plasmática. En cambio, las enzimas procoagulantes actúan como activadores de los factores de la coagulación o en la agregación de plaquetas para que se realice el proceso de la coagulación sanguínea, sin embargo, estas no son capaces de coagular el fibrinógeno purificado ni el plasma humano citratado (Seegers y Ouyang, 1974). Por otra parte, las enzimas anticoagulantes podrían destruir fosfolípidos de las plaquetas (Boffa, M. y col., 1972), inducir fibrinólisis por tener actividad de fibrinolisininas o proteasas que actúan sobre la fibrina, por inactivación de la trombina y destrucción de algún factor de la coagulación (Brinks, S. y col., 1974).

Se demostró con los resultados que el veneno de *Bothrops barnetti* presenta actividad coagulante tipo trombina, ya que tanto, el veneno total y las fracciones del veneno con sulfato de amonio coagularon totalmente el plasma citratado humano, corroborando los resultados de Yeni Castañón y col. (1993) en su investigación sobre el efecto letal, hemorrágico, coagulante, fosfolipásico y hemolítico de los venenos de las serpientes peruanas *Lachesis muta* y *Bothrops barnetti*. Además se pudo observar en ambas investigaciones que la proteína coagulante tipo trombina de *B. barnetti* no es mortal, a comparación de otros venenos, ya que, en la prueba de actividad coagulante *In Vivo* con las fracciones precipitadas con sulfato de amonio, se sacrificó a los ratones 17 minutos después de inyectado las fracciones del veneno, teniendo como referencia el tiempo de muerte con el veneno total (17 minutos). Es de consideración mencionar en este trabajo el efecto hemorrágico observado en la fracción del veneno al 50% de saturación con sulfato de amonio, la cual presentaba una coloración distinta a las demás fracciones (amarillo), el cual si causó la muerte del ratón a los 15 minutos. Estos resultados fueron observados también por Yeni Castañón y col. (1993) en su investigación.

Purificación parcial de la enzima similar a trombina

Es inherente en la caracterización bioquímica y/o molecular de una enzima la purificación de esta; en el caso de las proteínas presentes en los venenos de serpientes el aislamiento y purificación se hace mediante procedimientos cromatográficos. Un principio común en la purificación es el uso combinado de técnicas cromatográficas que permiten la separación de las proteínas aprovechando las características bioquímicas de cada una de ellas. No obstante, la purificación de proteínas con la técnica de precipitación con sulfato de amonio es un método muy usado para la separación de proteínas en estado natural. El sulfato de amonio es un ión divalente que alcanza altas fuerzas iónicas. La adición gradual de esta sal

permite el fraccionamiento de una mezcla de proteínas, las cuales son precipitadas pero no desnaturalizadas. El veneno de *B. barnetti* se fraccionó de acuerdo a la concentración de saturación de sulfato de amonio (10% al 80%), en donde se pudo observar fracciones con actividad coagulante tipo trombina (10%, 20% y 70%), además una fracción con efecto fuertemente hemorrágico (50%). Sin embargo, con esta técnica no se logró una purificación total, sino una purificación parcial de la enzima coagulante tipo trombina (Fig. 5).

Determinación del peso molecular

Actualmente, la electroforesis es la principal técnica utilizada para evaluar tanto la pureza como el peso molecular de una proteína. Los pesos moleculares de las enzimas similares a trombina de *B. pictus*, *B. alternatus*, *B. jararacussu*, *B. jararacá*, *B. insularis*, *Agkistrodon caliginosus*, *A. saxatilis*, *Trimeresurus stejnegeri*, *T. elegans* y *T. jerdonii*, han sido obtenidos solamente por medio de esta técnica mostrando el mismo comportamiento en diferencia de peso cuando son tratadas con un agente reductor (Mesia, 1996); no obstante, las técnicas de cromatografía de filtración, de HPLC entre otras también han sido empleadas en el cálculo del peso molecular como son los casos de *B. jararacussu*, *B. brazili*, *B. bilineatus*, *L. muta* y *Lachesis muta rhombeata* (Yarlequé 1989). Es conveniente aclarar que la técnica de cromatografía en filtración molecular sólo se puede utilizar para proteínas nativas y no para aquellas tratadas con agentes reductores por lo que su uso es cada vez más limitado. En comparación en la electroforesis con SDS se puede establecer con gran precisión los pesos moleculares y sus variaciones si es que las cadenas contiene puentes disulfuro que son afectados por el 2-mercaptoetanol, agente que no afecta la condiciones de corrida electroforética.

El análisis electroforético con SDS (Fig. 5) demostró que la enzima parcialmente purificada, encontrada en tres fracciones del veneno total, tiene un peso molecular de 40.209 KD (Tab.4), diferenciándose notablemente del peso molecular de la enzima similar a trombina purificada del veneno de la serpiente *Bothrops pictus* (54.400 KD) (Mesia, 1996). Así tenemos que la reptilasa, enzima coagulante de *Bothrops atrox* tiene un peso molecular de 42.000 KD (Stocker, *et. al.*, 1982), la arvina de la víbora de malasia *Agkinistrodon rhodostoma*, tiene un peso molecular de 35.000 KD (Esnouf y Tunnah, 1967), encontrándose la mayoría de las enzimas similares o semejantes a trombina en un rango de peso molecular de 30.000 a 45.000 KD

VI. CONCLUSIONES

De acuerdo a los resultados obtenidos se puede establecer las siguientes conclusiones:

- El veneno total de la serpiente lambayecana *Bothrops barnetti* "macanche" posee actividad coagulante tipo trombina tanto *In Vivo* como *In Vitro*.
- El veneno contiene una enzima tipo trombina, la cual puede ser purificada parcialmente con sulfato de amonio a distintos porcentajes de saturación.
- Las fracciones del veneno total obtenidas presentan actividad coagulante tipo trombina tanto *In Vivo* como *In Vitro*.
- La cantidad de proteínas del veneno total se encuentra en el rango de 56.52 mg/mL y 61.96 mg/mL, según el método utilizado de Bradford, usando BSA.
- El análisis electroforético con SDS indica que la enzima tipo trombina posee un peso molecular de 40.209 KD.
- La enzima tipo trombina presente en el veneno de la serpiente *Bothrops barnetti* "macanche", al ser parcialmente purificada tiene efecto coagulante, sin embargo no causa la muerte del individuo.
- El veneno de la serpiente *Bothrops barnetti* "macanche" posee una proteína extremadamente hemorrágica, la cual es causante de la muerte del individuo.

VII. RECOMENDACIONES

- Purificar la enzima tipo trombina obtenida en este trabajo por cromatografía de intercambio iónico para cristalizarla y obtener su estructura 3D por difracción de rayos X.
- Sería prioritario aislar las otras proteínas del veneno, que pueden ser letales al hombre: proteína hemorrágica.
- Se podría iniciar el estudio integrado del veneno con una biblioteca cDNA de la glándula productora del veneno.

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDERSON, L.** 1972. Isolation of thrombin-like activity from the venom of *Trimeresurus okinavensis*. Haemostasis. 1 : 31.
- BRADFORD, M.** 1976. A rapid and sensitive methode for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the príncipe of protein-dye biding. Anal Biochem. 72: 248-254.
- BRAZIL, and VELLARD, J.** 1928. Action coagulante et anticoagulante des vinis. Annis. Inst. Pasteur. Paris. 42 : 403.
- DENSON.** 1967. Coagulant and anticoagulant actino of snake venoms. Toxicon (7), 6-11.
- DEUTSCH, H. and DINIZ, C.** 1955. Some proteolytic activities of snake venom. J. Biol. Chem. 216 : 17-25.
- ESNOUF, M. and TUNNAH, G.** The isolation and properties of the thrombin-like activity from *Agkistrodom rhodostoma* venom. Br. J. Haemat. 13: 581-590.
- GAYTON, A.** 1992. Hemostasia y coagulación sanguínea. En Gayton, tratado de fisiología médica. 8 edición. Mc. Grau-Hill Latinoamericana 405-415.
- GUTIERREZ, J. y CHAVEZ, F.** 1980. Efectos proteolítico, hemorrágico y mionecrótico de los venenos de serpientes costarricenses de los géneros *Bothrops*, *Crotalus* y *Lachesis*. Toxicon 18 : 315-321.
- HERZIG, R. RATNOFF, O. and SHAINOFF, J.** 1970. Studies on a procoagulant fraction of southern copperhead snake venom : The preferential release of fibrinopeptide B.J. Lab : Clin. Med. 76 : 451.
- INCIO, R. and INCIO, L.** 1986. Efectos letal y hemorrágico de los venenos de serpientes de los géneros *Lachesis* y *Bothrops*. Tesis para optar el Título de Licenciado en Biología: Microbiología – Parasitología UNPRG. Lambayeque.
- LABID Y COL.** 1979. Studies on proteases abd arginine esterases and the effects of Cerastes snake venom on blood coagulation. Toxicon Vol.17, Suupl N° 1 pp. 96.
- LEE, CH. Y.** 1979. Handbook of experimental Pharmacology. Vol 52. Spring-Verlag. Berlin, Heilderberg, New York, 130.
- MARCO, P., REVERTE, J. C.** 2009. Nuevos aspectos clínicos y biológicos de la fibrinólisis. Hamematología/edición Española. 94: 411-432.
- MARKLAND, F.** 1998. Fibrin (Ogen) olytic enzymes from snakes venoms. In: Hemostasis and Animal venoms. New York.

- MARKLAND, F. and DAMUS, P.** 1971. Purification and properties of a thrombin-like enzyme from the venom of *Crotalus adamanteus* (Eastern diamondback rattlesnake) J. Biol. Chem. 246:6460.
- MARTINEZ-MURILLO, C.** Mecanismos de activación de la coagulación. Rev. Met. Inst. Mex. Seguro Soc. 2006. 44:51-58
- MELLAMBY, J.** 1909. The coagulation of blood. Part. II. The action of snake venom, peptone and leech extract. J. Physiol. (Lond) 38:441-503.
- MENESES, O.** 1974. Los animales venenosos y sus peligros. Instituto de salud pública. Lima-Perú. Publicación (2: 3-14)
- MESIA, M.** 1996. Purificación y caracterización bioquímica de la enzima similar a trombina del veneno de la serpiente *Bothrops pictus* "jergón de la costa". Tesis para optar el título de Biólogo. Facultad de ciencias biológicas. Univ. Nac. Mayor de San Marcos. Lima.
- MOHAMED, A. H. EL-SEROUGI, M. and KHALID, L. Z.** 1969. Effects of *Cerastes cerastes* venom on blood coagulation mechanisms. Toxicon 7: 181.
- NAHAS, L., DENSON, K.W.E. and KHALID, L.Z.** 1964. A study of the coagulant action of eight snakes venoms. Thromb. Diath. Haemorrh. 12:355.
- OLASCOAGA, E.** 1987. Estudio del veneno de *Bothrops pictus*: Bioquímica, toxicidad, neutralización y efectos biológicos. Tesis para optar el título de biólogo. Facultad de ciencias. Departamento de Biología. Universidad agraria.
- OUYANG, C.** 1957. The effects of Formosan snakes venoms on blood coagulation *In Vitro*. Formosan. Med. Ass. 56:435.
- OUYANG, C.; HONG, J. and THENG, C.** 1971. Purification and properties of the thrombin-like principle of *Agkistrodon acutus* venom and its comparison with bovine thrombin. Thromb. Diath. Haemorrh. (26: 224).
- PÁRAMO, J. A., PANZO, E.** 2009. Coagulación. Una visión moderna de la Hemostasia. Rev. Med. Univ. Navarra. 83: 19-23.
- SCHWERT, G and TAKENAKA, Y.** 1955. A spectrophotometric determination the trypsin and chymotrypsin. Biochem. Biophys. Acta 16: 570.
- SEGGER, W. and OUYANG, C.** 1979. Snakes venoms and blood coagulation. In Lee, C.Y.; Ed. Snakes venoms (Handbook of experimental pharmacology: new series). Berlin, Springer-Verlag. 52:684-750.
- STOCKER, K.; CHRIST, W. and LELOUP, P.** 1974. Characterization of the venoms of various *Bothrops* species by immunoelectrophoresis and reaction with fibrinogen agarose. Toxicon 12: 415-417.

TU, A. 1977. Venoms: Chemistry and molecular biology. Jhon Wiley & Sons, Inc. USA, 560.

YARLEQUE, A. 1987. Enzima similar a trombina del veneno de la serpiente *Lachesis muta*. Aislamiento caracterización bioquímica. Tesis doctoral. Fac. Biología. UNMSM.

IX. ANEXOS

Esquema de la cascada de la coagulación

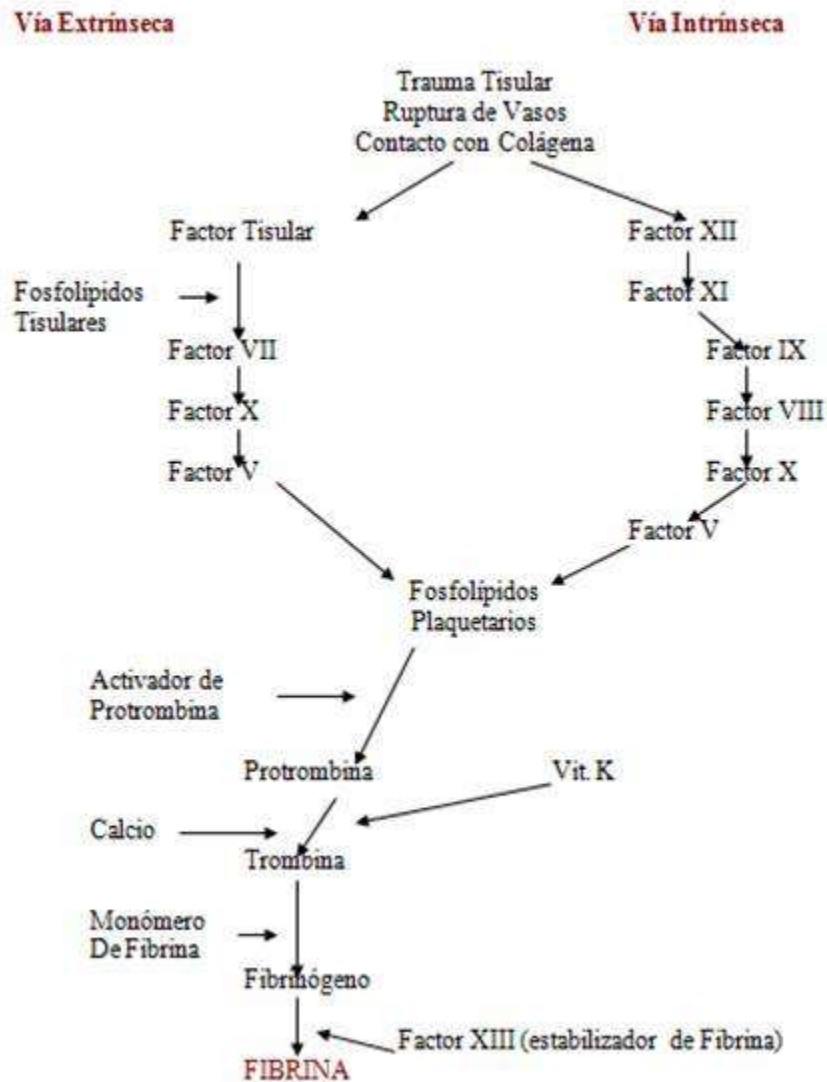


Fig. 7 Cascada de coagulación



Fig. 8 Serpiente lambayecana *Bothrops barnetti* "macanche"

Tab. 5 Factores de la coagulación sanguínea.

Factor	Denominación habitual
I	Fibrinógeno
II	Protrombina
III	Tromboplastina. Factor tisular
IV	Calcio
V	Proacelerina
VI	Acelerina (FVa)
VII	Proconvertina
VIII	Factor antihemofílico A
IX	Factor Christmas o antihemofílico B
X	Factor Stuart-Prower
XI	Antecedente plasmático de la tromboplastina
XII	Factor Ageman
XIII	Factor estabilizador de la fibrina (FSF)



Fig. 9 Extracción de veneno de la serpiente *Bothrops barnetti* "macanche"



Fig. 10 Características de *Bothrops barnetti*



Fig. 11 Fibrinógeno bovino coagulado por la acción de la enzima similar a trombina