

Aislamiento y caracterización parcial de una miotoxina del veneno de la serpiente *Bothrops atrox* (Ophidia: Viperidae)

Isolation and partial characterization of a myotoxin from *Bothrops atrox* snake venom (Ophidia: Viperidae)

Sergio Huatucó¹, Enrique Escobar² y Armando Yarlequé¹

Presentado: 08/07/2004

Aceptado: 09/08/2004

Resumen

Se ha purificado una miotoxina del veneno de la serpiente *Bothrops atrox*, empleando una columna de intercambio catiónico de CM-Sephadex C-50 equilibrada con buffer acetato de amonio 0,05M a pH 7. La miotoxina es una proteína básica, y por cromatografía de filtración y PAGE-SDS se ha determinado que tiene un peso molecular de 27 kDa, estando formada por dos cadenas polipeptídicas de 14 kDa cada una.

La inoculación de la miotoxina en el músculo gastrocnemius de ratones albinos produce la liberación de creatina kinasa así como la necrosis del tejido. La miotoxina tiene actividad de fosfolipasa, anticoagulante y edemática, pero no hemolítica.

Palabras claves: miotoxina, *Bothrops atrox*, veneno de serpiente, mionecrosis

Abstract

A myotoxin from *Bothrops atrox* snake venom was purified by cationic exchange on CM-Sephadex C-50 with 0,05M ammonium acetate pH 7. The myotoxin is a basic protein and by gel filtration and PAGE-SDS was demonstrated that protein has a molecular weight of 27 kDa and two polipeptides chain of 14 kDa each one.

The inoculation of myotoxin in gastrocnemius muscle of white mice produce liberation of creatin kinase as well as myonecrosis. The myotoxin has phospholipasic, anticoagulant and edematic activity, but not hemolytic activity.

Keywords: myotoxin, *Bothrops atrox*, snake venom, myonecrosis

Introducción

Las serpientes venenosas están agrupadas en tres familias: Hydrophidae, Elapidae y Viperidae (Mc Dowell, 1987), y se sabe que en particular, los venenos de la familia Viperidae causan necrosis, hemorragia, edema y problemas en la coagulación sanguínea (Ohsaka et al., 1966). La necrosis muscular, es un efecto especialmente importante porque puede producir la disfunción o pérdida completa de la parte afectada y es generada

por unas proteínas de los venenos llamadas miotoxinas.

Microscópicamente el tejido afectado por estos venenos muestra una total degeneración de la fibra muscular formando una masa amorfa, con ausencia del sistema sarcotubular (Stringer et al., 1971), y edema con infiltración de linfocitos, poilimorfos y macrófagos (Harris et al., 1975). En caso de severa intoxicación, la necrosis puede expandirse a otros tejidos (Tadokoro & Kurihara, 1963).

A la fecha, diversas miotoxinas han sido aisladas de venenos de serpientes de la familia Viperidae, especialmente del género *Bothrops*, habiéndose encontrado que todas son de naturaleza básica, y que constituyen un grupo de pro-

¹ Laboratorio de Biología Molecular, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Apartado 11-0058, Lima 11, Perú.

² Laboratorio de Bioquímica y Genética Molecular. Facultad de Ciencias Biológicas, UNMSM.

Email Enrique Escobar: eescobarg@unmsm.edu.pe

teínas estructural y antigénicamente relacionadas con las fosfolipasas, las cuales son enzimas de naturaleza ácida, pero que no producen daño al músculo esquelético. Estas enzimas no solo se encuentran en los venenos de muchas especies de *Bothrops*, sino también en otros géneros como *Trimeresurus* y *Agkistrodon*. Sin embargo, este grupo de toxinas difieren, estructural y funcionalmente, del grupo de miotoxinas de muchas especies de las familias Elapidae e Hydrophidae.

Las miotoxinas fosfolipásicas, han sido divididas a su vez en fosfolipasas D-49 y fosfolipasas K-49. Las D-49 tienen Asp en el residuo 49 y conservan actividad de fosfolipasa, en cambio las K-49 poseen Lys, en la misma posición, y no tienen actividad enzimática (Gutierrez & Lomonte, 1997).

El Perú cuenta con una variada fauna ofídica, siendo *B. atrox* la especie de mayor distribución y la responsable de la mayoría de accidentes ofídicos en la selva de nuestro país. Los venenos de estas serpientes están constituidos por diversas proteínas, en su mayor parte con actividad enzimática, entre las que destacan las enzimas proteolítica y fosfolipasa. Ellas han sido aisladas y caracterizadas, estableciéndose una relación con ciertos efectos del envenenamiento tales como la hemorragia y alteraciones de la coagulación sanguínea (Pantigoso et al., 1996). En nuestro país, el único trabajo relacionado a este tipo de toxinas se ha realizado en el veneno de *Bothrops brazili*, de donde se aisló una miotoxina de naturaleza básica y sin actividad enzimática (Pantigoso et al., 2001).

En el presente trabajo se estudia la proteína responsable de la necrosis producida por el veneno de *B. atrox*

Material y métodos

1. Veneno

Se utilizó veneno de especímenes de *B. atrox* procedentes de Pucallpa, que se mantuvieron en el serpentario «Oswaldo Meneses»

del Museo de Historia Natural de nuestra Universidad. El veneno extraído fue liofilizado y conservado a 4°C.

2. Purificación de la miotoxina

Un total de 200 mg de veneno liofilizado de *B. atrox* fueron disueltos en 4 ml de buffer acetato de amonio 0,05 M a pH 7 y centrifugados a 4000 rpm por 20 minutos. El sobrenadante (3,9 ml), fue aplicado a una columna de CM-Sephadex C-50 (1,2 x 21 cm) equilibrada con el mismo buffer y a un flujo de 10 ml/h. Se colectaron fracciones de 2 ml y la elución de las proteínas retenidas en la columna se realizó con el mismo buffer conteniendo NaCl 0,3 M y 0,6 M.

Las fracciones con actividad miotóxica fueron reunidas y desaladas por cromatografía de filtración en Sephadex G-25 (1,8 x 37 cm) equilibrada con acetato de amonio 0,05 M a pH 7 y a un flujo de 10 ml/h.

3. Cuantificación de proteína

Durante la purificación, la proteína fue determinada midiendo la absorbancia de luz ultravioleta a 280 nm (Warburg & Christian, 1941). En la miotoxina purificada el contenido proteico se estimó por el método de Lowry utilizando como proteína estándar albúmina bovina (Lowry et al., 1951).

4. Evaluación de la pureza

La pureza de la miotoxina fue determinada por electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio (PAGE-SDS) (Laemmli, 1970). Las proteínas fueron teñidas con azul de coomassie.

5. Determinación del peso molecular

Se determinó por PAGE-SDS (Laemmli, 1970), empleando como proteínas estándares albúmina bovina (66 kDa), ovoalbúmina (45 kDa) y lisozima (14,3 kDa). El peso molecular también fue determinado por cromatografía de filtración en gel en una columna de Sephadex G-100 (2 x 18 cm) equilibrada con buffer acetato de amonio 0,05M pH 7 a través de la

cual se filtraron separadamente albúmina bovina (66 kDa), anhidrasa carbónica (29 kDa) y citocromo C (12,4 kDa) (Andrews, 1964).

6. Actividad miotóxica

La actividad miotóxica fue evaluada de la siguiente manera:

6.1. Evaluación del daño histológico.-

Ratones albinos de 20 g de peso, fueron inyectados con 0,1 ml de miotoxina (80 µg) en el músculo gastrocnemius y luego de 3 y 24 horas se les sacrificó para extraerles el músculo y fijarlo en glutaraldehído al 3% durante 2 horas. Luego el tejido se deshidrató con concentraciones crecientes de etanol y se realizaron cortes de 2 µm de espesor para ser teñidos con azul de toluidina y observarlos al microscopio de luz.

6.2. Dosaje de creatina kinasa.-

Ratones albinos de 20 g de peso, fueron inyectados con 0,1 ml de miotoxina (40 µg) en el músculo gastrocnemius y luego de 1, 2, 3, 4, 12 y 24 horas se les sacrificó para extraerles del corazón 0,4 ml de sangre. La sangre tratada con 0,04 ml de citrato de sodio 3,8%, se centrifugó a 2000 rpm por 10 minutos para separar el plasma. La actividad de creatina kinasa fue medida con 25 µl del plasma sobre 1 ml del kit para creatina kinasa de Pointe Scientific, midiendo los incrementos en la absorbancia a 340 nm por minuto. La actividad se expresó en UI/L.

6.3. Dosaje in vitro de creatina kinasa.-

Músculo gastrocnemius de ratones albinos de 20 g de peso, fueron aislados y sumergidos en 1 ml de buffer fisiológico (cloruro de sodio 6,74 µg, cloruro de potasio 0,35 µg, sulfato de manganeso 0,593 µg, cloruro de calcio 0,3708 µg, fosfato ácido de potasio 0,16 µg, bicarbonato de sodio 2,1 µg, glucosa 2 µg, pH 7,2) bajo aireación constante. Se agregó 0,1 ml de miotoxina (80 µg) y luego de 15, 30, 60, y 90 minutos, se extrajeron alícuotas de 25 µl para medir la actividad de creatina kinasa de acuerdo a lo ya señalado.

7. Actividad de fosfolipasa

Un total de 1,5 ml de una emulsión preparada con 4 volúmenes de yema de huevo y 5 volúmenes de buffer Tris HCl 0,05M pH 7,5 CaCl₂ 10 mM, fueron incubados con 50 µl de miotoxina por 15 minutos a 37 °C y luego se midió el tiempo de coagulación de la solución a 100°C. La actividad de fosfolipasa se expresó por el retraso en el tiempo de coagulación de la emulsión con respecto al tiempo de coagulación del control.

8. Actividad hemolítica

Se mezcló 1 ml de citrato de sodio al 3,8% con 9 ml de sangre humana y se centrifugó a 2000 rpm por 10 minutos para separar el plasma del paquete de hematíes. Los hematíes se lavaron 3 veces con NaCl 0,9% a pH 7,3 y se resuspendieron con 10 ml de buffer isotónico (glicina 0,1M, NaCl 0,9%, pH 7,3). Luego se mezcló 0,8 ml de buffer isotónico, 0,1 ml de glóbulos rojos lavados y 0,1 ml de miotoxina (80 µg) incubándose a 37 °C por 2 horas y luego se agregó 2 ml de NaCl al 0,9% pH 7,3 en frío, conteniendo EDTA 200 mM. Después se centrifugó a 2000 rpm por 10 minutos y el sobrenadante se leyó a 540 nm (Condrea et al., 1964).

9. Actividad anticoagulante

Un total de 0,2 ml de plasma humano citratado se incubaron con 0,1 ml de miotoxina conteniendo 0,5, 1,0 y 5,0 µg, a 37 °C por 15 minutos. Al cabo de este tiempo se agregó 0,1 ml de CaCl₂ 50 mM, y el tiempo de recalcificación fue comparado con el tiempo de recalcificación de plasma sin miotoxina.

10. Actividad edemática

Ratones albinos de 20 g de peso, fueron inyectados con 50 µl de miotoxina (9, 18, y 36 µg) en la almohadilla plantar izquierda; las almohadillas plantares derechas se inyectaron con 50 µl de NaCl 0,9%. Luego de tres horas, los ratones se sacrificaron y se les cortó las extremidades para ser pesadas y comparadas. La dosis edemática mínima (DEM) se expre-

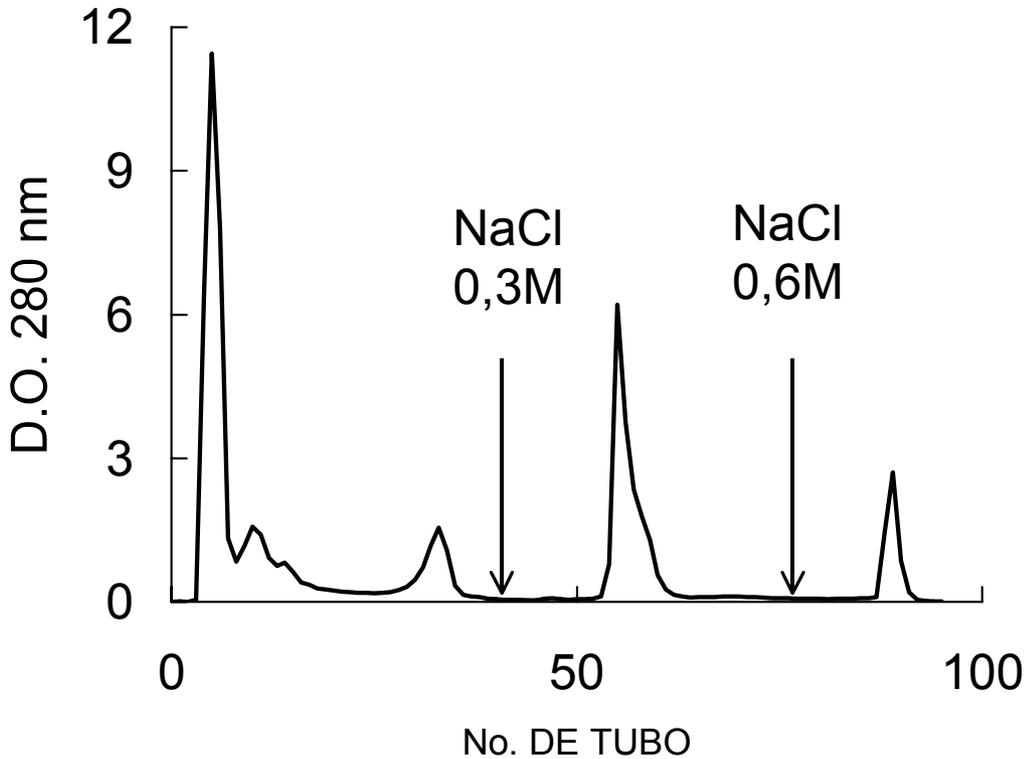


Figura 1. Purificación de la miotoxina. Al pasar el veneno de *B. atrox* por la columna de CM Sephadex C-50 a pH 7, la miotoxina quedó retenida y fue eluida sólo luego de añadir NaCl 0,6 M al eluyente.

só como la cantidad mínima de miotoxina que es capaz de aumentar el peso en un 30% (Yamakawa et al., 1976).

Resultados y discusión

1. Purificación de la miotoxina

Al pasar el veneno crudo de *B. atrox* por la columna de CM Sephadex C-50, se obtuvieron tres picos de proteína que eluyeron directamente con el buffer de corrida. Posteriormente al incorporar NaCl 0,3 M en el buffer de elución, se obtuvo un pico más y finalmente empleando NaCl 0,6 M se obtuvo un último pico, el cual mostró tener actividad miotóxica (Fig. 1); es decir, en este sistema la miotoxina interactuó fuertemente con el gel y solo fue posible separarla con 0,6 M de NaCl, siendo la última proteína del veneno en ser eluida. Esto nos indica que la proteína a pH 7,0 tiene carga positiva, la cual le permite interactuar con los grupos carboximetil del gel y

por lo tanto el pI de la miotoxina es mayor que 7, tratándose de una proteína básica.

Esta naturaleza básica, es una característica común de todas las miotoxinas botrópicas aisladas. Así por ejemplo, podemos mencionar las miotoxinas aisladas de los venenos de *B. asper*, *B. nummifer* y *B. moojeni*, (Gutierrez et al., 1984; Gutierrez et al., 1986; Lomonte et al., 1990; Soares et al., 1998).

Se ha determinado que esta miotoxina constituye el 4,4% de la proteína total del veneno de *B. atrox*, lo cual es un valor similar a lo que representan otras proteínas de venenos de serpientes; sin embargo en comparación a otras miotoxinas, es un valor mucho menor. Así por ejemplo, la bothropstoxina de *B. jararacussu* representa el 15% de la proteína total (Homsí-Branderburgo et al., 1988), mientras que la miotoxina de *B. brazili* constituye el 25% (Pantigoso et al., 2001).

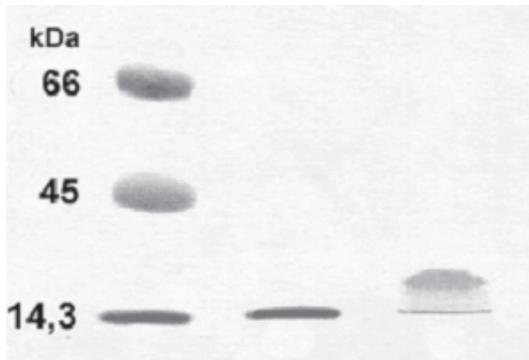


Figura 2. Electroforesis en gel de policrilamida. La PAGE-SDS de la miotoxina aislada mostró la presencia de una banda proteica tanto en condiciones reductoras como no reductoras, pero con diferentes movilidades electroforéticas. En el carril (1) se ven las proteínas albúmina (66 kDa), ovoalbúmina (45 kDa) y lisozima (14,3 kDa); el carril (2) corresponde a la miotoxina reducida (14 kDa) y en el carril (3) se muestra la miotoxina no reducida (25 kDa).

2. Evaluación de la pureza y peso molecular

Al evaluar la miotoxina por PAGE-SDS en condiciones reductoras y no reductoras, se encontró en ambos casos una banda proteica pero con diferentes movilidades electroforéticas. Así, en condiciones reductoras la movilidad fue mayor, determinándose un peso molecular de 14 kDa, mientras que en condiciones no reductoras la movilidad fue menor y el peso

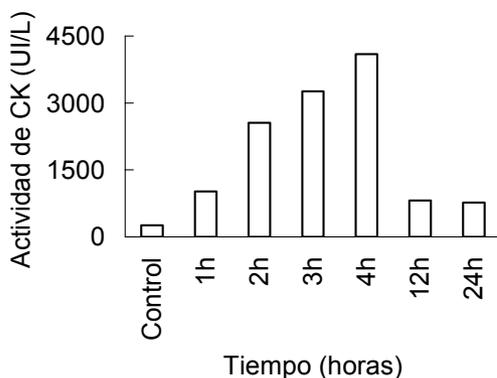


Figura 3. La liberación de creatina quinasa, en el plasma de ratones, se incrementó por efecto de la miotoxina desde la primera hora, alcanzando un valor de 4090 luego de 4 h y disminuyendo a valores casi normales después de 24 h.

molecular correspondió a 25 kDa (Fig. 2). Estos resultados, indican que la miotoxina aislada, tiene un peso molecular de 25 kDa y está formada por dos cadenas polipeptídicas de aproximadamente 14 kDa cada una. Además, el peso molecular calculado por cromatografía de filtración en gel (27 kDa), permite confirmar que en condiciones nativas, esta miotoxina es un dímero.

Cabe señalar que en la PAGE-SDS en condiciones no reductoras, fue posible evidenciar además, una ligera banda de proteína de 14 kDa, la cual es común observar cuando otras miotoxinas diméricas, se analizan en condiciones similares. Esta banda adicional corresponde a formas unicasenarias de la miotoxina.

Ciertas miotoxinas botrópicas, también son diméricas. Así por ejemplo la miotoxina de *B. nummifer* y la miotoxina II de *B. asper* son proteínas con dos cadenas polipeptídicas de 16 kDa cada una (Gutierrez et al., 1986 y Lomonte and Gutierrez, 1989). En cambio, otras miotoxinas son monoméricas, como es el caso de las miotoxinas I y III de *B. asper* las cuales son de 14 y 15 kDa, respectivamente (Gutierrez et al., 1986; Kaiser et al., 1990).

3. Actividad miotóxica

Los cortes histológicos del músculo de ratón inyectados con miotoxina, mostraron que la proteína provoca la necrosis de las fibras

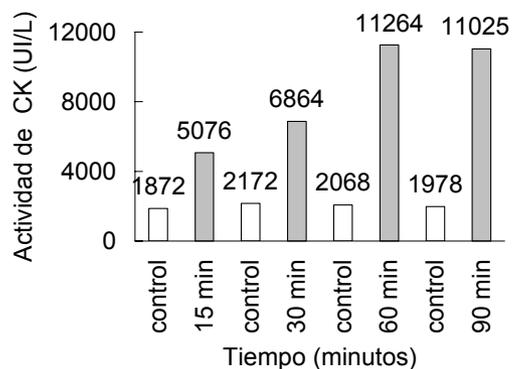


Figura 4. La actividad de la creatina quinasa en músculo aislado con miotoxina, fue dependiente del tiempo de incubación, obteniéndose el valor más alto luego de 1 h.

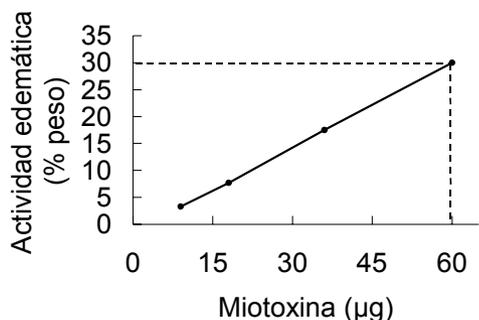


Figura 5. Dosis edemática mínima. El edema producido por la miotoxina fue dependiente de la dosis, encontrándose una DEM de 60 µg.

musculares, y una gran infiltración de glóbulos blancos en el tejido. Asimismo la miotoxina fue capaz de provocar, rápidamente, la fuga de creatina kinasa tanto *in vivo* como *in vitro* (Figs. 3 y 4) lo cual indicaría que la proteína actúa probablemente a nivel del sarcolema provocando su desorganización. La creatina kinasa es una enzima que se encuentra no solo en el músculo esquelético sino también en el músculo cardiaco, y se libera en otras afecciones musculares como por ejemplo en el infarto al miocardio y la distrofia muscular (Pestronk et al., 1982).

Los resultados obtenidos *in vivo* indican que la miotoxina produce una liberación máxima de creatina kinasa luego de 4 horas de acción (Fig. 3), lo cual representa un tiempo similar al encontrado con la miotoxina I de *B. asper* y la miotoxina II de *B. mojeni*, las cuales provocan la liberación máxima de creatina kinasa recién a las tres horas (Gutierrez et al., 1984; Lomonte et al., 1990). Sin embargo, los niveles de creatina kinasa prácticamente se normalizan luego de 24 horas.

En relación a los estudios *in vitro* con músculo aislado, estos muestran en primer lugar, que en los controles la actividad de creatina kinasa liberada es mucho mayor que la de los controles en los ensayos *in vivo*, lo cual podría deberse en parte, a que el proceso de aislamiento del músculo ocasiona de por sí, cierto daño que se traduce en una mayor liberación de creatina kinasa. Sin embargo, el trata-

miento del músculo aislado con miotoxina, provoca de todas maneras una mayor liberación de creatina kinasa la cual se evidencia desde los 30 minutos, hasta alcanzar un máximo a la hora (Fig. 4). Adicionalmente, en los ensayos *in vitro*, se tiene un sistema cerrado, y esto permite comprender porque los valores de creatina kinasa son mayores que en los ensayos *in vivo*.

Los diferentes estudios realizados con otras miotoxinas de venenos de serpientes también sugieren que la acción primaria de estas proteínas sería a nivel del sarcolema. Sin embargo el lugar de unión a la membrana muscular, no es todavía conocido, aunque se supone que deben estar involucrados componentes que permitirían la unión específica al sarcolema y la falta de acción sobre otras membranas celulares como por ejemplo la de eritrocitos. En este trabajo, nosotros hemos verificado también que la miotoxina de *B. atrox* carece de actividad hemolítica.

Por otro lado, en este trabajo hemos hallado que la miotoxina de *B. atrox* tiene actividad de fosfolipasa, y esta actividad podría estar involucrada en la hidrólisis de fosfolípidos de membrana que alterarían su estabilidad (Pestronk et al., 1982). Sin embargo, el daño en el sarcolema no necesariamente debe ser a través de la hidrólisis directa de fosfolípidos de membrana, ya que se sabe que existen miotoxinas sin actividad de fosfolipasa, pero que igual dañan el sarcolema (Gutierrez et al., 1989).

Cabe señalar que con otras miotoxinas botrópicas se ha demostrado que como consecuencia del daño producido a nivel del sarcolema, se produce además la elevación del Ca^{2+} citosólico en la fibra muscular (Gutierrez et al., 1984; Pantigoso et al., 2000) lo cual podría conducir a la activación de fosfolipasas y proteasas endógenas dependientes de calcio, que producirían finalmente la degeneración y mionecrosis observada.

4. Actividad anticoagulante

La miotoxina en estudio demostró tener acción anticoagulante sobre plasma humano

citrato, lo cual sugiere que por su actividad de fosfolipasa es capaz de hidrolizar ciertos fosfolípidos que participan en la cascada de la coagulación sanguínea.

Todas las miotoxinas que ejercen un retardo en la coagulación del plasma tienen actividad de fosfolipasa y se asume que es la capacidad de hidrolizar ciertos fosfolípidos del proceso de coagulación, lo que les confiere un efecto anticoagulante. Tal es el caso de las miotoxinas I y III de *B. asper*, las cuales tienen actividad de fosfolipasa y son a la vez anticoagulantes. En cambio las miotoxinas de *B. nummifer*, *B. asper* (miotoxina II) y *B. mojeni* (miotoxina II), carecen de actividad de fosfolipasa y también de actividad anticoagulante (Prado-Franceschi et al., 1998).

5. Actividad edemática

En cuanto a la actividad formadora de edema, en este trabajo hemos encontrado que la miotoxina de *B. atrox*, al igual que todas las miotoxinas estudiadas, posee esta actividad. Sin embargo, la DEM calculada para la miotoxina de *B. atrox* (60 µg) (Figura 5), es mayor a la reportada para otras miotoxinas como por ejemplo la miotoxina II de *B. asper*, la cual tiene una DEM de 38 µg (Lomonte and Gutiérrez, 1989). Esto significa que el edema producido por la miotoxina de *B. atrox* es menos intenso que el producido por la miotoxina II de *B. asper*. El edema viene a ser el aumento de la permeabilidad microvascular, que genera inflamación del tejido por acumulación de fluido en los espacios intersticiales.

La acción edemática ha sido correlacionada con la capacidad que tienen las fosfolipasas de hidrolizar fosfolípidos, lo cual permitiría explicar la actividad edemática de la miotoxina de *B. atrox* ya que esta toxina tiene actividad de fosfolipasa. Sin embargo, muchas miotoxinas botrópicas (fosfolipasas K-49), no tienen actividad enzimática, lo cual significa que el edema producido no depende de la hidrólisis directa de fosfolípidos y probablemente algún mecanismo alternativo está involucrado.

Agradecimientos

Este trabajo se desarrolló como parte de un proyecto que contó con el apoyo financiero del Consejo Superior de Investigaciones de la UNMSM (Proyecto 001001141).

Literatura citada

- Andrews, P. 1964. The gel filtration behaviour of proteins related to the molecular weights over a wide range. *Biochem. J.* 5 (96): 595.
- Condrea, E.; De Vries, A. and Mager, J. 1964. Hemolysis and splitting of human erythrocyte phospholipids by snake venoms. *Biochem. Biophys. Acta* 84: 60.
- Gutiérrez, J.; Ownby, C. and Odeli, G. 1984. Isolation of a myotoxin from *Bothrops asper* venom: Partial characterization and action on skeletal muscle. *Toxicon* 22 (1): 115-128.
- Gutiérrez, J.; Lomonte, B. and Cerdas, L. 1986. Isolation and partial characterization of a myotoxin from the venom of the snake *Bothrops nummifer*. *Toxicon* 24 (9): 885-894.
- Gutiérrez, J.; Chavez, F.; Gene, J.; Lomonte, B.; Camacho, Z. and Schosinski, K. 1989. Myonecrosis induced in mice by a basic myotoxin isolated from the venom of the snake *Bothrops nummifer* (jumping viper) from Costa Rica. *Toxicon* 27: 735-745.
- Gutiérrez, J. and Lomonte, B. 1997. Phospholipase A2 myotoxins from *Bothrops* snake venoms. In: *Venom Phospholipase A2 Enzymes, Structure, function and mechanism*. Ed. Wiley Singapore. 13: 321-330.
- Harris, J.; Johnson, M. and Karlsson, E. 1975. Pathological responses of rat skeletal muscle to a single subcutaneous injection of a toxin isolated from the venom of the Australian tiger snake, *Notechis scutatus scutatus*. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.*, 2: 383.
- Homsí-Brandeburgo, M.; Queiroz, L.; Santo-Neto, H.; Rodrigues-Simioni, L. and Giglio, J. 1988. Fractionation of *Bothrops jararacussu* snake venom: Partial chemical characterization and biological activity of bothropestoxin. *Toxicon* 26: 615-627.
- Kaiser, I.; Gutiérrez, J.; Plummer, D.; Aird, S. and Odeli, G. 1990. The amino acid sequence of a myotoxic phospholipase from the venom of *Bothrops asper*. *Arch. Biochem. Biophys.* 278: 319-325.
- Laemmli, U. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 227: 680-685.
- Lomonte, B. and Gutiérrez, J. 1989. A new muscle damaging toxin, myotoxin II, from the venom of the snake *Bothrops asper* (terciopelo). *Toxicon* 27: 725-733.

- Lomonte, B.; Gutierrez, J.; Furtado, M.; Otero, R.; Rosso, J.; Vargas, O.; Carmona, E. and Rovira, E. 1990. Isolation of basic myotoxin from *Bothrops moojeni* and *Bothrops atrox* venoms. *Toxicon* 28: 1137-1146.
- Lowry, O.; Rosebrough, N.; Farr, A. and Randall, R. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *Journal of Biology Chemistry*. 193: 265-275.
- Mc Dowell, S. 1987. Snakes. Ecology and evolutionary biology. Systematics. 3-50. In: Sergel, R., Collins, J. and Novak, S.(Eds), Mac Millan Publishing Co., New York.
- Ohsaka, A.; Omori-Satoh, T.; Kondo, S. and Murata, R. 1966. Biochemical and pathological aspects of hemorrhagic principles in snakes venoms with special reference to Habu (*Trimeresurus flavoviridis*) venoms. *Mem. Inst. Butantan Simp. Internac.* 33: 193-205.
- Pantigoso, C.; Escobar, E.; Málaga y Yarlequé, A. 1996. Aislamiento y algunas propiedades de la atroxina, una proteinaza del veneno de la serpiente peruana *Bothrops atrox* «jergón». *Acta Científica Venezolana.* 47: 67-73.
- Pantigoso, C.; Escobar, E. y Yarlequé, A. 2001. Aislamiento y caracterización de una miotoxina del veneno de la serpiente *Bothrops brazili* (Ophidia: Viperidae). *Rev. Peru. de Biol.* 8 (2): 136-148.
- Pestronk, A.; Parhad, I.; Drachman, D. and Price, D. 1982. Membrane myopathy: morphological similarities to Duchenne muscular dystrophy. *Muscle Nerve* 5: 209.
- Prado-Franceschi, J.; Hyslop, S.; Cogo, J.; Andrade, A.; Assakura, M.; Richl, A.; Cruz-Hofling, M. and Rodríguez-Simioni, L. 1998. Characterization of a myotoxin from the Duvenoy's gland secretion of the xenodontine colubrid *Philodryas olfersii* (green snake): Effects on striated muscle and the neuromuscular junction. *Toxicon* 36(10): 1407-1421.
- Soares, A.; Rodrigues, B.; Homsí-Brandeburgo, M.; Toyama, M.; Lombardi, F.; Arni, R. and Giglio, J. 1998. A rapid procedure for the isolation of the Lys-49 myotoxin II from *Bothrops moojeni* (caissaca) venom: Biochemical characterization, crystallization, myotoxin and edematogenic activity. *Toxicon* 36(3): 503-514.
- Stringer, H.; Kainer, R. and Tu, A. 1971. Ultrastructural studies of myonecrosis induced by cobra venom in mice. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 18: 42.
- Tadokoro, S. and Kurihara, N. 1963. Systemic symptoms produced by administration of habu snake (*Trimeresurus flavoviridis*) venom: Especially on acute adrenocortical necrosis. *Gunma J. Med. Sci.* 12: 227.
- Warburg, O. and Christian, W. 1941. Isolierung und Kristallisation der Garungsfermente enolase. *Biochem. Z.* 310: 384-421.
- Yamakawa, M.; Nosaki, M. and Hokama, Z. 1976. Fractionation of sakishima-hyabu (*Trimeresurus elegans*) venom, and lethal, hemorrhagic and edemaforming activities of the fractions. In: *Animal, Plant, and Microbial Toxins, Vol. 1, Biochemistry*, eds., A., Ohsaka, K. Hayashi and Y. Sawai. Plenum Press, New York.