

PÉPTIDOS CON CAPACIDAD DE INHIBIR COMPONENTES TÓXICOS DEL VENENO DE SERPIENTES

Soledad L. SAAVEDRA^{1,2}, Silvana L. GIUDICESSI^{1,2}, Silvia A. CAMPERI^{1,2}, Osvaldo CASCONE^{1,2,3} & María C. MARTÍNEZ CERON^{1,2*}

¹ Universidad de Buenos Aires, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Cátedra de Biotecnología, Junín 956, (1113) Buenos Aires, Argentina

² CONICET-Universidad de Buenos Aires, Instituto de Nanobiotecnología (NANOBIOTEC), Junín 956,(1113) Buenos Aires, Argentina

³ Instituto Nacional de Producción de Biológicos, ANLIS-Malbrán, Av. Vélez Sársfield 563, (1282) Buenos Aires, Argentina

* Autora a quien dirigir la correspondencia. E-mail: mc4camila@gmail.com

RESUMEN	32
SUMMARY: Peptides with the ability to inhibit snake venom toxic components	32
INTRODUCCIÓN	33
PÉPTIDOS COMO POSIBLES INHIBIDORES DE LA ACCIÓN TÓXICA DE LOS COMPUESTOS DEL VENENO DE SERPIENTE	35
PÉPTIDOS QUE INHIBEN LAS SVMP PRESENTES EN EL VENENO DE SERPIENTES	36
PÉPTIDOS QUE INHIBEN LA FOSFOLIPASA A2 PRESENTE EN EL VENENO DE SERPIENTES	37
CONCLUSIONES	39
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	39

RESUMEN

Los accidentes causados por serpientes venenosas constituyen un problema de salud pública, principalmente en los países subdesarrollados. En la mayoría de ellos, hay deficiencias en la producción y distribución de antivenenos. Actualmente el único tratamiento que se utiliza ante el envenenamiento por mordedura de serpientes es la aplicación de antídotos compuestos por inmunoglobulinas obtenidas tras la inmunización de caballos u ovejas con veneno de serpientes. Éstos son de baja estabilidad, lo que dificulta su distribución hacia lugares remotos donde muchas veces son requeridos. Un antídoto basado en péptidos cortos que inhiban componentes específicos de los venenos de serpientes sería de gran utilidad ya que estos últimos son más estables que las proteínas y más fáciles de sintetizar. Además, pueden ser modificados químicamente para mejorar su estabilidad, solubilidad, afinidad y selectividad. En este artículo se resumen las diferentes estrategias elegidas para la identificación de dichos péptidos.

Palabras Clave: antídotos, inhibidores, péptidos, mordedura de víboras, toxinas.

SUMMARY:

PEPTIDES WITH THE ABILITY TO INHIBIT SNAKE VENOM TOXIC COMPONENTS

Accidents caused by poisonous snakes are a public health problem, mainly in underdeveloped countries. In most of them there are deficiencies in the production and distribution of antivenoms. Nowadays, the only treatment for snake bite poisoning is the use of antidotes containing immunoglobulins obtained after immunization of horses or sheep with snake venom, which are rather expensive. The low stability of immunoglobulins difficult its distribution to remote places, where they are often required. An antidote based on short peptides that inhibit specific components of snake venoms would be very useful

since they are more stable than proteins and easier to synthesize, furthermore, they can be chemically modified to improve their stability, solubility, affinity and selectivity. In this article, the different strategies used for the identification of these peptides are reviewed.

Key Words: antivenom, inhibitors, peptides, snake bites, toxins.

INTRODUCCIÓN

Los accidentes causados por animales ponzoñosos constituyen un problema de salud pública principalmente en los países subdesarrollados, la mayoría con deficiencias en la producción y distribución de los antivenenos. En el caso puntual del envenenamiento por mordeduras de serpientes, la Organización Mundial de la Salud declaró la emergencia global de salud pública (World Health Organization, 2007; 2017).

Otro inconveniente para tener en cuenta es que la composición del veneno de serpiente de una misma especie puede presentar gran variabilidad geográfica, interindividuo e intraindividuo a lo largo de la vida. Como consecuencia, el antídoto desarrollado contra el veneno de una población puede ser menos eficiente contra el veneno de otra de la misma especie (Harrison *et al.*, 2003). A su vez, la distribución de las poblaciones de serpientes ha variado en los últimos años producto del Calentamiento Global (Nori *et al.*, 2014, Thomas *et al.*, 2004).

Por un lado, existe escaso relevamiento epidemiológico en muchas partes del mundo ya que el envenenamiento no es considerado una prioridad en temas de salud pública; por otro, en los últimos años se han reducido los recursos para la investigación y la prevención. En muchos países no existe un sistema de notificación obligatoria o es ineficiente, por lo cual se hace difícil la identificación de la serpiente causante de la mordedura, lo que hace dificultosa la determinación del tipo de antiveneno y la dosis a administrar (Chippaux, 2017; Orduna *et al.*, 2014; Scheske *et al.*, 2015). En el año 2008, la Sociedad Internacional de Toxinología (IST por sus siglas en inglés) creó la “*Global Snake Bite Initiative*” (<http://www.snakebiteinitiative.org/>) para, a través del entrenamiento del cuerpo médico y programas de enseñanza, reducir la morbo-mortalidad producto de dichos envenenamientos (Williams *et al.*, 2010).

Se ha estimado que anualmente ocurren unos 5.500.000 casos de mordeduras de serpientes a nivel mundial, con un rango de muertes entre 20.000 y 94.000. Los costos de amputaciones y discapacidad permanente superan 3 veces los de muerte. La mayor parte de los casos de envenenamiento por accidentes con serpientes ocurren en el sur y sudeste asiático, en la región subsahariana de África y en Latinoamérica (Kasturiratne *et al.*, 2008; Mohapatra *et al.*, 2011; World Health Organization, 2007).

Un relevamiento realizado en Argentina, entre el año 2000-2011 (de Roodt *et al.*, 2017) mostró 12.862 accidentes durante ese período, con una mortalidad de 42 casos (0,33%) y una morbilidad de 14,5 cada 100.000 habitantes. A partir del año 2000 se comenzaron a registrar los accidentes causados por serpientes separados de los que eran causados por arañas o escorpiones, permitiendo un mejor análisis estadístico. Sin embargo, de Roodt *et al.* (2017) proponen mejoras para que el registro sea más preciso y de mayor utilidad a la hora de producir antídotos, por ejemplo, dando más precisiones de la especie y género del agente agresor.

El veneno proveniente de serpientes de la familia *Viperidae* produce efectos principalmente a nivel local, lo que puede conducir a secuelas permanentes o efectos sistémicos como coagulopatías, sangrado, alteraciones en la hemodinámica y daño renal agudo. El veneno de serpientes de la familia *Elapidae* y de *Crotalus durissus terrificus* (Cdt, la única serpiente cascabel presente en nuestro país) generan neurotoxicidad incluyendo parálisis de los músculos respiratorios (Malaque & Gutiérrez, 2016).

En la Argentina prevalecen tres géneros, *Bothrops*, *Crotalus* y *Micrurus* (Fig. 1). El 96% de los casos de envenenamiento son provocados por *Bothrops* o yarará, como se las conoce vulgarmente (Dolab *et al.*, 2014). A Cdt se le atribuye el 3% de los accidentes registrados (Orduna *et al.*, 2014), mientras que los casos ocasionados por *Micrurus* son escasos (de Roodt *et al.*, 2013). Las serpientes venenosas se distribuyen prácticamente en toda la superficie continental de la Argentina y están especialmente expuestos a las mordeduras los niños, los trabajadores y las personas que realizan actividades recreativas en áreas rurales y/o selváticas (Dolab *et al.*, 2014; Orduna *et al.*, 2014).

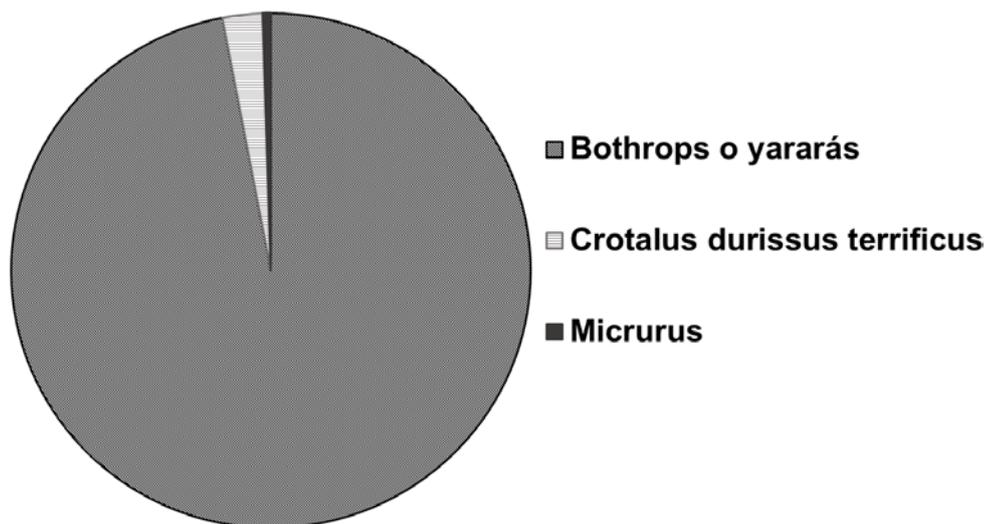


Figura 1. Porcentajes de mordeduras de las diferentes especies de serpientes presentes en la Argentina. Adaptado de Dolab *et al.*, 2014

Los antídotos contienen inmunoglobulinas obtenidas tras la inmunización de caballos u ovejas con veneno de serpientes. (Căpitănescu *et al.*, 2008; Casewell *et al.*, 2014; Scheske *et al.*, 2015). Su producción es costosa y engorrosa. A su vez, su baja estabilidad no permite su almacenamiento por períodos prolongados y no es universal, ya que se inmuniza con venenos propios de una única zona. A estos inconvenientes se suma el hecho de que en los últimos tiempos ha habido una reducción en el número de productores de antivenenos tanto en el ámbito privado como en el público. Según Chippaux (2008), existen 3 posibles explicaciones para este fenómeno: 1) el mercado de los antivenenos es inestable, 2) las farmacéuticas y los centros de salud no encuentran un incentivo comercial ya que la venta de antivenenos genera pocas ganancias, y 3) la falta de información precisa tanto de la cantidad de antídoto necesario para satisfacer las necesidades a nivel mundial como de los lugares donde deben ser distribuidos.

Hay que tomar en cuenta que el veneno de serpiente está compuesto por diferentes tipos de moléculas tóxicas y no tóxicas, tales como enzimas, péptidos, etc. (Kang *et al.*, 2011). Algunos autores proponen dividir los venenos según su principal efecto tóxico: hemotóxicos y neurotóxicos (Goswami *et al.*, 2014; Laustsen *et al.*, 2015b).

Las responsables del síndrome hemorrágico producto del envenenamiento son las Metaloproteinasas (SVMP por sus siglas en inglés). Las víctimas desarrollan efectos locales tales como hinchazón y necrosis (da Costa Neves-Ferreira *et al.*, 2009) y pueden ocurrir efectos sistémicos tales como shock hemorrágico y hemorragia intracraneal (White, 2005). En algunos casos los efectos citotóxicos pueden llevar a la amputación de miembros o discapacidad permanente (Gutiérrez, 2011; Otero-Patiño, 2009).

Las Fosfolipasas A2 (PLA2 por sus siglas en inglés) presentes en las serpientes de la familia *Elapidae* y en algunas especies de *Crotalus* pueden producir síntomas neurotóxicos y falla renal aguda (Jorge *et al.*, 1992; Pinho *et al.*, 2005). Las PLA2s (EC 3.1.1.4) son enzimas Ca^{2+} -dependientes que hidrolizan los enlaces éster entre el segundo acilo y el glicerol presentes en los fosfolípidos. Las PLA2 presentes en el veneno de serpiente pueden ser divididas de acuerdo a su acción sobre receptores neurológicos: las α -neurotoxinas, presentes en el veneno de la familia *Elapidae*, actúan sobre receptores colinérgicos postsinápticos, mientras que las β -neurotoxinas, presentes en el veneno de *Crotalus*, actúan sobre receptores presinápticos (Pinho *et al.*, 2005). Algunas PLA2s son farmacológicamente activas sólo cuando están formando complejos con otros componentes del veneno, tanto covalentemente (β -bungarotoxina) como no covalentemente (crotoxina), mientras otras funcionan siendo una sola molécula (Kini, 2003).

El principal tratamiento ante la mordedura de serpiente (que se utiliza hace más de un siglo sin haber sufrido demasiadas mejoras) es suministrar por vía parenteral anticuerpos policlonales. Más allá de su eficiencia, en algunos casos puede presentar efectos adversos (Morais & Massaldi, 2009) tales como shock y enfermedad del suero (Duan *et al.*, 2016). La morbo-mortalidad producida por el tratamiento muchas veces se confunde con los efectos propios del envenenamiento (Prabhakar *et al.*, 2014).

Para reducir la aparición de efectos adversos se han propuesto alternativas al uso de caballos u oveja para la obtención de anticuerpos policlonales, como camellos (Prado *et al.*, 2016), llamas (Richard *et al.*, 2013), gallinas (Duan *et al.*, 2016; Liu *et al.*, 2017; Zolfagharian *et al.*, 2015), o anticuerpos humanizados (Silva *et al.*, 2018) o anticuerpos recombinantes (Laustsen, 2017; Laustsen *et al.*, 2017).

Dado el costo que representa la producción de anticuerpos (sean o no recombinantes) y la difícil logística para hacer llegar este tratamiento a zonas remotas donde ocurren la mayoría de los casos de envenenamiento por mordedura de serpientes (Chippaux & Goyffon, 1991), se han investigado otras fuentes de antivenenos tales como compuestos derivados de plantas (Baraldi *et al.*, 2016; Coriolano de Oliveira *et al.*, 2016; Deepa *et al.*, 2016; Lewin *et al.*, 2016; Muthusamy *et al.*, 2017; Villalta-Romero *et al.*, 2017) y proteínas alternativas a los anticuerpos presentes en el suero de animales (Fernandes *et al.*, 2017; Inagaki, 2017). También se han explorado péptidos como posibles candidatos para reemplazar los anticuerpos en un futuro.

Es el objetivo de este artículo recopilar la información que existe hasta la actualidad y analizar la factibilidad del uso de péptidos cortos como posibles antídotos, principalmente anti PLA2 y anti SVMP, por ser los principales y más estudiados agentes neurotóxicos y hemorrágicos respectivamente.

PÉPTIDOS COMO POSIBLES INHIBIDORES DE LA ACCIÓN TÓXICA DE LOS COMPUESTOS DEL VENENO DE SERPIENTE

Las toxinas ejercen su acción a través de la interacción proteína-proteína. Es por ello que muchos investigadores han intentado identificar las secuencias peptídicas involucradas en dicha interacción con el objetivo de evaluar su capacidad para inhibir el efecto tóxico. Los péptidos cortos suelen ser más estables que las proteínas y más fáciles de sintetizar a granel utilizando normas de Buenas Prácticas de Manufactura. Pueden ser químicamente modificados para aumentar su estabilidad, solubilidad, afinidad y selectividad por un blanco dado (Giudicessi *et al.*, 2013; Giudicessi *et al.*, 2017; Martínez-Ceron *et al.*, 2016). Se han usado diferentes estrategias para identificar péptidos con la capacidad de bloquear los compuestos tóxicos del veneno de serpiente.

Como se mencionó previamente, las SVMPs y las PLA2s son las proteínas presentes en veneno de serpiente con actividad tóxica más estudiadas y lo mismo sucede con las moléculas que las inhiben. La Tabla 1 resume los grupos de péptidos que bloquean la acción de una u otra enzima.

TOXINA	INHIBIDORES	REFERENCIAS
SVMP	Tripéptidos piroglutámicos	(Munekiyo & Mackessi, 2005)
	Bibliotecas de fagos	(Laustsen, 2016)
	Hydroxamatos de FLF y de FLR	(Villalta-Romero <i>et al.</i> , 2017)
	IIAMK	(Arpitha <i>et al.</i> , 2017)
PLA2	PGLPPLSLNQNG (P-PB.III)	(Thwin <i>et al.</i> , 2002)
	LGRVDIHVWDGVYIRGR (PNT.II)	(Samy <i>et al.</i> , 2011)
	VDIHVWDGVVDIHVWDGV (PIP18)	(Thwin <i>et al.</i> , 2002)
	CVDIHVWDGVC	(Samy <i>et al.</i> , 2011)
	QFPGLPLSRPNQYY	(Estevao-Costa <i>et al.</i> , 2008)
	FLSYK	(Chandra <i>et al.</i> , 2002a)
	LAIYS	(Chandra <i>et al.</i> , 2002b)
	LKAMDPTPPL (LT-10)	(Chavan & Deobagkar, 2014)

Tabla 1: Ejemplos de péptidos con actividad inhibitoria de SVMP o PLA2. Las abreviaturas de los aminoácidos son las de una letra (A: Ala, C: Cys, D: Asp, E: Glu, F: Phe, G: Gly, H: His, I: Ile, K: Lys, L: Leu, M: Met, N: Asn, P: Pro, Q: Gln, R: Arg, S: Ser, T: Thr, V: Val, W: Trp, Y: Tyr).

PÉPTIDOS QUE INHIBEN LAS SVMP PRESENTES EN EL VENENO DE SERPIENTES

Bastos *et al.* (2016) y Laustsen *et al.* (2015c) proponen utilizar inhibidores de SVMP ya conocidos como punto de partida para el desarrollo racional de inhibidores peptídicos ya que la interacción es específica y conforman complejos fuertemente unidos. Existen, en la actualidad, inhibidores de metalopeptidasas que se han aprobado para el tratamiento de la hipertensión, enfermedad periodontal y osteoartritis (Abbenante *et al.*, 2005; Pennington *et al.*, 2017)

PÉPTIDOS QUE INHIBEN LAS SVMP PRESENTES EN EL VENENO DE SERPIENTES

Bastos *et al.* (2016) y Laustsen *et al.* (2015c) proponen utilizar inhibidores de SVMP ya conocidos como punto de partida para el desarrollo racional de inhibidores peptídicos ya que la interacción es específica y conforman complejos fuertemente unidos. Existen, en la actualidad, inhibidores de metalopeptidasas que se han aprobado para el tratamiento de la hipertensión, enfermedad periodontal y osteoartritis (Abbenante *et al.*, 2005; Pennington *et al.*, 2017)

Una manera de identificar secuencias peptídicas con acción inhibitoria de las SVMP sería obtener la estructura tridimensional de estas enzimas unidas a su receptor blanco. Estas estructuras permitirían observar qué péptido o péptidos derivados del receptor pueden ser potenciales inhibidores, pero es dificultoso determinar dicha estructura, tanto a través de técnicas como resonancia magnética nuclear, cristalografía de rayos X o *in silico* (da Costa Neves-Ferreira *et al.*, 2015).

Se han encontrado tripéptidos piroglutámicos con capacidad inhibitoria de SVMP en el veneno de *Crotalus atrox* y otras serpientes de cascabel. Se ha especulado que estos péptidos no sólo inhiben, sino que además estabilizarían a las SVMP mientras el veneno se encuentra dentro de las glándulas de la serpiente, impidiendo que la dañe. Luego que el veneno es inyectado, la acción inhibitoria se pierde ya que los componentes del veneno se dispersan en los tejidos (Munekiyō & Mackessi, 2005) y las SVMP se liberan para alcanzar su blanco. Es por ello que se ha considerado utilizar estos péptidos para diseñar nuevos inhibidores ya que por sí mismos no pueden serlo al presentar baja afinidad (Sánchez & Rodríguez Acosta, 2008; Yee *et al.*, 2017).

Laustsen (2016) realizó el *screening* de dos bibliotecas de fagos de péptidos lineales (Laustsen *et al.*, 2015a) contra la α -cobratoxina de *Naja kaouthia*. Esta metodología le permitió observar dos patrones que se repetían en las secuencias seleccionadas, por lo que seis de esos péptidos fueron elegidos para realizar nuevos ensayos. Preliminarmente, pudo mostrar que algunos de esos péptidos eran capaces de inhibir la actividad tóxica del veneno de serpientes pertenecientes a la familia *Elapidae*. La comprobación de su eficacia está en curso.

Villalta-Romero *et al.* (2012) evaluaron la posibilidad de bloquear de manera específica una SVMP de *Bothrops asper* (BaP1). Dicha SVMP posee un sitio de coordinación con iones Zn^{2+} , lo cual es imprescindible para la unión al sustrato (Lingott *et al.*, 2009). Ellos diseñaron dos péptidos con hidroxamatos: Phe-Leu-Phe y Phe-Leu-Arg, capaces de capturar el Zn^{2+} . Tanto *in vitro* como *in silico* mostraron gran eficacia, pero *in vivo* mostraron baja selectividad causando múltiples efectos adversos (Villalta-Romero *et al.*, 2017)

Arpitha *et al.* (2017) analizaron un péptido (Ile-Ile-Ala-Met-Lys) derivado de la β -lactoglobulina presente en el calostro de búfala. Esta β -lactoglobulina fue elegida por presentar propiedades antitóxicas contra SVMP. El péptido así obtenido mostró acción protectora contra el veneno de *Echis carinatus*

PÉPTIDOS QUE INHIBEN LA FOSFOLIPASA A2 PRESENTE EN EL VENENO DE SERPIENTES

Existen numerosos casos de proteínas presentes en el suero de la misma serpiente productora del veneno que son capaces de inhibir los componentes tóxicos propios. Thwin *et al.* (2000), en cambio, aislaron una proteína inhibitoria de la PLA2 pero de una serpiente no venenosa, *Python reticulatus*, y la llamaron Inhibidor de la PLA2 obtenido de Pitón (PIP, por sus siglas en inglés). Con ella fueron capaces de neutralizar la PLA2 de *Daboia russelli siamensis*. Luego se analizó la proteína PIP y se evaluó un péptido seleccionado a

través de la teoría de los “Bracket de Prolina” (Kini, 1998). Se estudiaron tanto péptidos lineales como cíclicos derivados de PIP y hallaron que el péptido Pro-Gly-Leu-Pro-Pro-Leu-Ser-Leu-Gln-Asn-Gly (P-PB.III) era capaz de inhibir PLA2s de diferentes grupos. Otro péptido evaluado fue PNT.II (Leu-Gly-Arg-Val-Asp-Ile-His-Val-Trp-Asp-Gly-Val-Tyr-Ile-Arg-Gly-Arg), pero inhibía selectivamente una PLA2 de humanos (Thwin *et al.*, 2002). A partir de PNT.II surgieron dos análogos: PIP18 (Val-Asp-Ile-His-Val-Trp-Asp-Gly-Val-Val-Asp-Ile-His-Val-Trp-Asp-Gly-Val) y Cyclic-C (Ciclo-(1,11)-Cys-Val-Asp-Ile-His-Val-Trp-Asp-Gly-Val-Cys). PIP18 fue capaz de inhibir eficientemente la PLA2 presente en el veneno de *Crotalus adamanteus* (Samy *et al.*, 2011). De esta manera, se demostró la factibilidad de inhibir la PLA2 con un péptido de al menos 10 aminoácidos (Thwin *et al.*, 2000 y 2002).

Otra proteína con capacidad inhibitoria de la PLA2 y que también se encuentra en el suero de serpientes, en este caso venenosas, es el Factor Neutralizante de *Crotalus* (CNF por sus siglas en inglés). Esta proteína fue estudiada por Estevão-Costa *et al.* (2008) utilizando el software MEME (Bailey *et al.*, 2006) que permite hacer múltiples alineamientos de secuencias proteicas con el objetivo de identificar sitios con potencial actividad biológica. De esta manera identificaron la secuencia Gln-Pro-Phe-Pro-Gly-Leu-Pro-Leu-Ser-Arg-Pro-Asn-Gly-Tyr-Tyr con mayor probabilidad de actuar en la interacción PLA2-CNF.

Existen algunas PLA2s que pueden presentarse como dímeros (Almeida *et al.*, 2016; Brunie *et al.*, 1985; Demaret *et al.*, 1990a y 1990b), es por ello que se han sintetizado péptidos derivados de la secuencia peptídica de la misma proteína para analizar su potencial capacidad inhibitoria (Church *et al.*, 2001). Chandra *et al.* (2002a y 2002b) diseñaron el péptido Leu-Ala-Ile-Tyr-Ser y lo co-cristalizaron junto a la PLA2 de *Daboia russelli pulchella*, la cual está presente en el veneno como un dímero. Cuando se realizaron estudios de inhibición con el péptido a diferentes concentraciones, éste fue capaz de inhibir sólo en un 50% a la PLA2. Al estudiar con más detenimiento el cristal pudieron observar que la unión bloquea el canal hidrofóbico a través de un cambio conformacional, pero sólo actúa sobre una de las moléculas de PLA2 del dímero, permitiendo que la segunda molécula pueda interactuar con el receptor.

Se sintetizó y analizó el péptido LT10 (Leu-Lys-Ala-Met-Asp-Pro-Thr-Pro-Pro-Leu) (Chavan & Deobagkar, 2014), derivado de la proteína LTNF (*Lethal Toxin Neutralizing Factor*) presente en la sangre de las zarigüeyas, animales conocidos por su resistencia a los venenos de diferentes animales (Lipps & Lipps, 2005). El péptido LT10 demostró ser igualmente eficiente a la hora de inhibir la letalidad de venenos de animales, plantas y hasta toxinas bacterianas. También se estudiaron las bases moleculares de dicha capacidad de inhibición mediante técnicas de modelado molecular. Estos estudios permitieron establecer la estructura tridimensional del péptido para hacer un estudio de *docking* utilizando dos cristales de PLA2 que se encuentran en el “*Protein Data Bank*” (Chavan *et al.*, 2015). Komives *et al.* (2017) expresaron en *E. coli* de manera exitosa el LT-11, un análogo del LT, y encontraron que este nuevo péptido era capaz de neutralizar el veneno de diferentes serpientes, incluyendo los venenos con actividad neurotóxica. Se observó que LT-11 era incapaz de neutralizar la neurotoxicidad del veneno de cobras y de *D. russelii*, mientras sí neutralizaba la actividad citotóxica y hemotóxica de *C. atrox*. Algunos de sus colegas comenzaron una colecta de fondos para patrocinar la investigación del LT-10 (<https://experiment.com/projects/low-cost-snake-antivenom-for-asia-africa-and-south-america?s=search>).

Nuestro grupo de investigación se ha especializado en el desarrollo de Bibliotecas Combinatorias Peptídicas para identificar péptidos con afinidad por proteínas de interés farmacéutico (Camperi *et al.*, 2014 y 2016; Marani *et al.*, 2007 y 2009; Martínez-Ceron *et al.*, 2011, 2012 y 2016). Una vez identificado el o los péptidos, éstos son inmovilizados en matrices cromatográficas para purificar dichas proteínas. Hemos utilizado esta metodología para purificar la PLA2 presente en el veneno de Cdt (Martínez-Ceron *et al.*, 2015).

El *screening*, de la Biblioteca permitió identificar dos péptidos, que además de tener gran homología entre ellos, eran similares al fragmento N-terminal de la proteína chaperona (la crotapotina) que acompaña e impide que la PLA2 actúe antes de llegar a su receptor neurológico. Estos péptidos fueron capaces de recuperar toda la PLA2 presente en una muestra de veneno de Cdt (Martínez-Ceron *et al.*, 2015), pero fallaron en inhibir los efectos tóxicos cuando se realizaron test *in vitro* e *in vivo* (resultados no publicados). Muller *et al.* (2012 y 2014) proponen el uso de esta proteína para el tratamiento del dengue y la fiebre amarilla. Por otro lado, Shimizu *et al.* (2017) estudiaron el efecto de esta misma PLA2 (y otros componentes del veneno) sobre el virus de la hepatitis C.

CONCLUSIONES

A pesar de todo lo que ha avanzado la Ciencia en los últimos años, más aún con la incorporación de los estudios *in silico* al estudio de proteínas y sus interacciones, se hace evidente que en el tema del veneno de serpiente y los mecanismos de acción de sus componentes aún falta mucho por estudiar (da Silva Araújo *et al.*, 2016).

Una posibilidad sería generar un antídoto compuesto por moléculas que sean capaces de bloquear a cada uno de los componentes tóxicos de manera específica. Este nuevo antiveneno podría ser usado solo o como coadyuvante de la terapia con inmunoglobulinas, por ejemplo, a nivel local donde estas últimas fallan en evitar las secuelas. Para ello es necesario tener un mejor conocimiento de la relación que existe entre estructura y función de las SVMs y las PLA2s.

Los péptidos cortos poseen ventajas para ser usados tanto a nivel local como sistémico. Éstos permiten el uso de otras vías de administración además de la intravenosa (oral, inhalatoria, intramuscular, subcutánea). Permitirían una mayor producción a un costo menor con respecto a los anticuerpos. Sin embargo, presentan ciertos inconvenientes como una baja vida media y una baja superficie de contacto por ser de bajo peso molecular, lo que puede ser compensado utilizando diferentes tipos de formulaciones (como nanopartículas o unidos a proteínas de alto peso molecular) o aumentando la dosis, lo que es factible gracias a ser poco inmunogénicos. Finalmente, son sencillos de producir y modificar para mejorar su estabilidad o la fuerza de unión a la proteína blanco. Por tener un tamaño reducido, el modelado molecular y los estudios por técnicas de acoplamiento molecular conllevan menos tiempo de cálculo que el de las estructuras proteicas, lo que permite desarrollar distintas estrategias de investigación en un tiempo más reducido.

Por todo esto, los péptidos son interesantes candidatos para producir nuevos y más eficientes antídotos.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abbenante, G. & D.P. Fairlie (2005) Protease inhibitors in the clinic. *Med Chem.* **1**: 71-104.
- Almeida, J.R., M. Lancellotti, A.M. Soares, L.A. Calderon, D. Ramirez, W. Gonzalez, *et al.* (2016) CoaTx-II, a new dimeric Lys49 phospholipase A2 from *Crotalus oreganus* abyssus snake venom with bactericidal potential: Insights into its structure and biological roles *Toxicon* **120**: 147-58.
- Arpitha, A., M. Sebastin Santhosh, A.C. Rohit, K.S. Girish, D. Vinod & H.S. Aparna (2017) Inhibition of Snake Venom Metalloproteinase by β -Lactoglobulin Peptide from Buffalo (*Bubalus bubalis*) Colostrum. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **182**: 1415-32.
- Bailey, T.L., N. Williams, C. Mischak & W.W. Li (2006) MEME: discovering and analyzing DNA and protein sequence motifs. *Nucleic Acids Res.* **34**: W369-73.

- Baraldi, P.T., A.J. Magro, F.F. Matioli, S. Marcussi, N. Lemke, L.A. Calderon *et al.* (2016) A novel synthetic quinolinone inhibitor presents proteolytic and hemorrhagic inhibitory activities against snake venom metalloproteases. *Biochimie* **121**: 179-88.
- Bastos, V.A., F. Gomes-Neto, J. Perales, A.G.C. Neves-Ferreira & R.H. Valente (2016) Natural Inhibitors of Snake Venom Metalloendopeptidases: History and Current Challenges. *Toxins* **8**: 250.
- Brunie, S., J. Bolin, D. Gewirth & P.B. Sigler (1985) The refined crystal structure of dimeric phospholipase A2 at 2.5 Å. Access to a shielded catalytic center. *J. Biol. Chem.* **260**: 9742-9.
- Camperi, S.A., S.L. Giudicessi, M.C. Martínez-Ceron, J.M. Gurevich-Messina, S. L. Saavedra, G. Acosta *et al.* (2016) Combinatorial Library Screening Coupled to Mass Spectrometry to Identify Valuable Cyclic Peptides. *Curr. Protoc. Chem. Biol.* **8**: 109-30.
- Camperi, S.A., M.C. Martínez-Ceron, S.L. Giudicessi, M.M. Marani, F. Albericio, & O. Cascone (2014) Peptide affinity chromatography based on combinatorial strategies for protein purification. *Methods Mol. Biol.* **1129**: 277-302.
- Căpitănescu, C., C.S. Turculeț, Z. Niculescu, A. Căpitănescu, V. Strâmbu, G. Manole *et al.* Ovine antivenom for *Vipera ammodytes*. (2008) *Proc. Rom. Acad. Series B.* **3**: 155–61
- Casewell, N.R., I. Al-Abdulla, D. Smith, R. Coxon & J. Landon (2014) Immunological Cross-Reactivity and Neutralisation of European Viper Venoms with the Monospecific *Vipera berus* Antivenom ViperaTAb. *Toxins* **6**: 2471-82.
- Chandra, V., J. Jasti, P. Kaur, S. Dey, M. Perbandt, A. Srinivasan *et al.* (2002a) Crystal structure of a complex formed between a snake venom phospholipase A(2) and a potent peptide inhibitor Phe-Leu-Ser-Tyr-Lys at 1.8 Å resolution. *J. Biol. Chem.* **277**: 41079-85.
- Chandra, V., J. Jasti, P. Kaur, S. Dey, A. Srinivasan, C. Betzel *et al.* (2002b) Design of specific peptide inhibitors of phospholipase A2: structure of a complex formed between Russell's viper phospholipase A2 and a designed peptide Leu-Ala-Ile-Tyr-Ser (LAIYS). *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* **58**: 1813-9.
- Chavan, S.G. & D.D. Deobagkar (2015) An *In Silico* Insight into Novel Therapeutic Interaction of LTNF Peptide-LT10 and Design of Structure Based Peptidomimetics for Putative Anti-Diabetic Activity. *PLoS One.* **10**: e0121860.
- Chavan, S.G. & D.D. Deobagkar (2014) *In silico* molecular interaction analysis of LTNF peptide-LT10 with snake venom enzymes. *Protein Pept. Lett.* **21**: 646-56.
- Chippaux, J.P. & M. Goyffon (1991) "Production and Use of Snake Antivenin", in "Reptile Venoms and Toxins" (A.T. Tu, ed.), Marcel Dekker, New York, vol. 5, pp. 529-55.
- Chippaux, J.P. (2008) Estimating the global burden of snakebite can help to improve management. *PLoS Med.* **5**: e221.
- Chippaux, J.P. (2017) Incidence and mortality due to snakebite in the Americas. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **11**: e0005662.
- Church, W.B., A.S. Inglis, A. Tseng, R. Duell, P.W. Lei, K.J. Bryant *et al.* (2001) A novel approach to the design of inhibitors of human secreted phospholipase A2 based on native peptide inhibition. *J. Biol. Chem.* **276**: 33156-64.
- Coriolano de Oliveira, E., R. Alves Soares Cruz, N. de Mello Amorim, M. Guerra Santos, L.C. Simas Pereira Junior, E.O. Flores Sánchez *et al.* (2016) Protective Effect of the Plant Extracts of *Erythroxylum* sp. against Toxic Effects Induced by the Venom of *Lachesis muta* Snake. *Molecules* **21**: pii: E1350.
- da Costa Neves-Ferreira, A.G., R.H. Valente, G.B. Domont & J. Perales (2015) "Natural Inhibitors of Snake Venom Metallopeptidases", in "Toxins and Drug Discovery" (P. Gopalakrishnakone, ed.), Springer, Dordrecht, pp. 1-23.
- da Costa Neves-Ferreira, A.G., R.H. Valente, J. Perales & G.B. Domont (2009) "Enzyme Inhibitors in Reptile Venoms and Innate Immunity to Snake Venoms", in "Handbook of Venoms and Toxins of Reptiles" (S.P. Mackessy, ed.), CRC Press, Boca Raton, pp. 259-84.
- da Silva Araújo, L., A.S. Mendonça Miranda Conceição, D.M. de Souza Cunha, G. Bezerra de Morai, J.A. de Moraes Silveira, F.A. Félix Xavier Júnior *et al.* (2016) *Crotalus durissus* venom: biological effects and relevant applications *Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal.* **10**: 9-21.
- de Roodt, A.R., E. de Titto, J.A. Dolab, & J.P. Chippaux (2013) Envenoming by coral snakes (*Micrurus*) in Argentina, during the period between 1979-2003. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo.* **55**: 13-18.
- de Roodt, A.R., L.C. Lanari, N. Casas, S.I. García, V. Costa de Oliveira, C.F. Damin *et al.* (2017) Accidentes y muertes por animales venenosos en Argentina durante el período 2000- 2011 *Revista científica INSPILIP.* **1**: 1-23.
- Deepa, V., S. Sreekumar & C.K. Biju (2016) Validation of russell's viper venom detoxification activity of *Azadirachta indica* through *in silico* method. *IOSR J. Pharm. Biol. Sci.* **11**: 35-46.
- Demaret, J.P. & S. Brunie (1990a) Molecular dynamics simulations of phospholipases A2. *Protein Eng.* **4**: 163-70.

- Demaret, J.P., S. Chwetzoff & S. Brunie (1990b) Dimeric character of a basic phospholipase A2 from cobra venom: experimental and modelling study. *Protein Eng.* **4**: 171-6.
- Dolab, J.A., A.R. de Roodt, E.H. de Titto, S.I. García, R. Funes, O.D. Salomon *et al.* (2014) Epidemiology of snakebite and use of antivenom in Argentina. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **108**: 269-76.
- Duan, H.I., Q.Y. He, B. Zhou, W.W. Wang, B. Li, Y.Z. Zhang *et al.* (2016) Anti-Trimeresurus albolabris venom IgY antibodies: preparation, purification and neutralization efficacy. *J. Venom Anim. Toxins Incl. Trop. Dis.* **22**: 23-9.
- Estevão -Costa, M.I., B.C. Rocha, M. de Alvarenga Mudado, R. Redondo, G.R. Franco & C.L. Fortes-Dias (2008) Prospection, structural analysis and phylogenetic relationships of endogenous gamma-phospholipase A(2) inhibitors in Brazilian Bothrops snakes (Viperidae, Crotalinae). *Toxicon* **52**: 122-9.
- Fernandes, C.A., W.M. Pazin, T.R. Dreyer, R.N. Bicev, W.L. Cavalcante, C.L. Fortes-Dias *et al.* (2017) Biophysical studies suggest a new structural arrangement of crotoxin and provide insights into its toxic mechanism. *Sci. Rep.* **7**: 43885.
- Giudicessi, S.L., J.M. Gurevich-Messina, M.C. Martínez-Ceron, R. Erra-Balsells, F. Albericio, O. Cascone, *et al.* (2013) Friendly strategy to prepare encoded one bead-one compound cyclic peptide library. *ACS Comb. Sci.* **15**: 525-9.
- Giudicessi, S. L., M.L. Salum, S.L. Saavedra, M.C. Martínez-Ceron, O. Cascone, R. Erra-Balsells, *et al.* (2017) Simple method to assess stability of immobilized peptide ligands against proteases *J. Pept. Sci.* **23**: 685-92.
- Goswami, P.K., M. Samant & R.S. Srivastava (2014) Snake venom, anti-snake venom & potential of snake venom. *J. Pharm. Pharm. Sci.* **6**: 4-7.
- Gutiérrez, J.M. (2011) Envenenamientos por mordeduras de serpientes en América Latina y el Caribe: Una visión integral de carácter regional. *B. Malarial. Salud Amb.* **51**: 1-16.
- Harrison, R.A., W. Wüster & R.D.G. Theakston (2003) The conserved structure of snake venom toxins confers extensive immunological cross-reactivity to toxin-specific antibody. *Toxicon* **41**: 441-9.
- Inagaki, H. (2017) "Snake Venom Protease Inhibitors: Enhanced Identification, Expanding Biological Function, and Promising Future", in "Snake Venoms" (P. Gopalakrishnakone, H. Inagaki, C.W. Vogel, A.K. Mukherjee & T.R. Rahmy, ed.), Springer, Dordrecht, pp. 161-86.
- Jorge, M.T. & L.A. Ribeiro (1992) Epidemiologia e quadro clínico do acidente por cascavel. Sul-Americana (*Crotalus durissus*). *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo.* **34**: 347-54.
- Kang, T.S., D. Georgieva, N. Genov, M.T. Murakami, M. Sinha, R.P. Kumar, *et al.* (2011) Enzymatic toxins from snake venom: structural characterization and mechanism of catalysis *FEBS J.* **278**: 4544-76.
- Kasturiratne, A., A.R. Wickremasinghe, N. de Silva, N.K. Gunawardena, A. Pathmeswaran, R. Premaratna *et al.*, (2008) The global burden of snakebite: a literature analysis and modelling based on regional estimates of envenoming and deaths. *PLoS Med.* **5**: e218.
- Kini, R.M. (1998) Proline brackets and identification of potential functional sites in proteins: toxins to therapeutics. *Toxicon* **36**: 1659-70.
- Kini, R.M. (2003) Excitement ahead: structure, function and mechanism of snake venom phospholipase A2 enzymes. *Toxicon* **42**: 827-40.
- Komives, C.F., E:E Sánchez, A.S. Rathore, B. White, M. Suntravat, M. Balderrama, *et al.* (2017) Opossum peptide that can neutralize rattlesnake venom is expressed in *Escherichia coli*. *Biotechnol. Progr.* **33**: 81-6.
- Laustsen, A., T. Lynagh, J. Kringelum, A. Christiansen, J. Johannesen, M. Engmark, *et al.* (2015a). *Poster session presented at PhD Day 2015, Faculty of Health Sciences, University of Copenhagen*. Copenhagen, Denmark.
- Laustsen, A.H. (2017) Guiding recombinant antivenom development by omics technologies. *N. Biotechnol. pii: S1871-6784(17)30196-6*
- Laustsen, A.H. (2016). Ph. D Thesis: Recombinant antivenoms. University of Copenhagen.
- Laustsen, A.H., K.H. Johansen, M. Engmark & M.R. Andersen (2017) Recombinant snakebite antivenoms: A cost-competitive solution to a neglected tropical disease? *PLoS Negl. Trop. Dis.* **11**: e0005361.
- Laustsen, A.H., B.Lohse, B. Lomonte, M. Engmark & J.M. Gutiérrez (2015b) Selecting key toxins for focused development of elapid snake antivenoms and inhibitors guided by a Toxicity Score. *Toxicon.* **104**: 43-5.
- Laustsen, A.H., B. Lomonte, B. Lohse, J. Fernández & J.M. Gutiérrez (2015c) Unveiling the nature of black mamba (*Dendroaspis polylepis*) venom through venomics and antivenom immunoprofiling: Identification of key toxin targets for antivenom development. *J. Proteomics* **119**: 126-42.

- Lewin, M., S. Samuel, J. Merkel & P. Bickler (2016) Varespladib (LY315920) Appears to Be a Potent, Broad-Spectrum, Inhibitor of Snake Venom Phospholipase A2 and a Possible Pre-Referral Treatment for Envenomation. *Toxins (Basel)*. **8**: E248.
- Lingott, T., C. Schleberger, J.M. Gutiérrez & I. Merfort (2009) High-Resolution Crystal Structure of the Snake Venom Metalloproteinase BaP1 Complexed with a Peptidomimetic: Insight into Inhibitor Binding. *Biochemistry* **48**: 6166-74.
- Lipps, B.V. & F.W. Lipps (2005) Anti-LTNF for in vitro assay of biological toxins. US Patent 6936423.
- Liu, J., Q. He, W. Wang, B. Zhou, B. Li, Y. Zhang, *et al.* (2017) Preparation and neutralization efficacy of IgY antibodies raised against *Deinagkistrodon acutus* venom. *J. Venom. Anim. Toxins Incl. Trop. Dis.* **23**: 22-31.
- Malague, C.M.S. & J.M. Gutiérrez (2016) "Snakebite Envenomation in Central and South America", in "Critical Care Toxicology" (J. Brent, K. Burkhart, P. Dargan, B. Hatten, B. Megarban & R. Palmer, ed.), Springer International, pp. 1-22.
- Marani, M.M., M.C. Martínez Ceron, S.L. Giudicessi, E. de Oliveira, S. Côté, R. Erra-Balsells, *et al.* (2009) Screening of one-bead-one-peptide combinatorial library using red fluorescent dyes. Presence of positive and false positive beads. *J. Comb. Chem.* **11**: 146-50.
- Marani, M.M., E. Oliveira, S. Côté, S.A. Camperi, F. Albericio & O. Cascone (2007) Identification of protein-binding peptides by direct matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry analysis of peptide beads selected from the screening of one bead-one peptide combinatorial libraries. *Anal. Biochem.* **370**: 215-22.
- Martínez-Ceron, M.C., S.L. Giudicessi, S.L. Saavedra, J.M. Gurevich-Messina, R. Erra-Balsells, F. Albericio, *et al.* (2016) Latest advances in OBOC Peptide Libraries. Improvements in screening strategies and enlarging the family from linear to cyclic libraries. *Curr. Pharm. Biotechnol.* **17**: 449-57.
- Martínez-Ceron, M.C., M.M. Marani, M. Taulés, M. Etcheverrigaray, F. Albericio, O. Cascone, *et al.* (2011) Affinity chromatography based on a combinatorial strategy for erythropoietin purification. *ACS Comb. Sci.* **13**: 251-8.
- Martínez-Ceron, M.C., S.L. Saavedra, L. Ávila, S.L. Giudicessi, F. Albericio, S.A. Camperi, *et al.* (2015) *24 th American Peptide Symposium*, edited by V. Srivastava, A. Yudin & M. Lebl, pp. 137-8. Orlando, U.S.A.: American Peptide Society.
- Martínez-Ceron, M.C., A.M. Targovnik, N. Urtasún, O. Cascone, M.V. Miranda & S.A. Camperi (2012) Recombinant protein purification using complementary peptides as affinity tags. *N. Biotechnol.* **29**: 206-10.
- Mohapatra, B., D.A. Warrell, W. Suraweera, P. Bhatia, N. Dhingra, R.M. Jotkar *et al.* (2011) Snakebite mortality in India: a nationally representative mortality survey. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **5**: e1018.
- Morais, V. & H. Massaldi (2009) Snake antivenoms: adverse reactions and production technology. *J. Venom Anim. Toxins incl. Trop. Dis.* **15**: 2-18.
- Muller, V.D., R.R. Russo, A.C. Cintra, M.A. Sartim, M. Alves-Paiva, L.T. Figueiredo *et al.* (2012) Crotoxin and phospholipases A(2) from *Crotalus durissus terrificus* showed antiviral activity against dengue and yellow fever virus. *Toxicon* **59**: 507-15.
- Muller, V.D., R.O. Soares, N.N. dos Santos Jr., A.C. Trabuco, A.C. Cintra, L.T. Figueiredo *et al.* (2014) Phospholipase A2 isolated from the venom of *Crotalus durissus terrificus* inactivates dengue virus and other enveloped viruses by disrupting the viral envelope. *PLoS One*. **9**: e112351.
- Munekiyo, S.M. & S.P. Mackessy (2005) Presence of peptide inhibitors in rattlesnake venoms and their effects on endogenous metalloproteases. *Toxicon* **45**: 255-63.
- Muthusamy, K., S. Chinnasamy, S. Nagarajan, T. Sivaraman & S. Chinnasamy (2017) Isolation and characterization of bioactive compounds of *Clematis gouriana* Roxb. ex DC against snake venom phospholipase A2 (PLA2) computational and *in vitro* insights. *J. Biomol. Struct. Dyn.* **35**: 1936-49.
- Nori, J., P.A. Carrasco & G.C. Leynaud (2014) Venomous snakes and climate change: ophidism as a dynamic problem. *Clim. Change* **122**: 67-80.
- Orduna, T.A., S.C. Lloveras, A.R. de Roodt, V. Costa de Oliveira, S.I. García & A.I. Haas (2014) Guía de prevención, diagnóstico, tratamiento y vigilancia epidemiológica de los envenenamientos ofídicos, edited by Ministerio de Salud Pública de la Nación, Argentina. p. 88. Ciudad Autónoma de Buenos Aires.
- Otero-Patiño, R. (2009) Epidemiological, clinical and therapeutic aspects of *Bothrops asper* bites. *Toxicon* **54**: 998-1011.

- Pennington, M.W., A. Czerwinski & R.S. Norton (2017) Peptide therapeutics from venom: Current status and potential. *Bioorgan. Med. Chem., in press*.
- Pinho, F.M.O., D.M.T. Zanetta & E.A. Burdmann (2005) Acute renal failure after *Crotalus durissus* snakebite: A prospective survey on 100 patients. *Kidney Int.* **67**: 659-67.
- Prabhakar, D.R., M.V. Motiram & B.C. Ghanshyam (2014) Antivenoms in Snake Envenoming: Are they Safe?. *J. Clin. Toxicol.* **4**: 184.
- Prado, N.D., S.S. Pereira, M.P. da Silva, M.S. Morais, A.M. Kayano, L.S. Moreira-Dill *et al.* (2016) Inhibition of the Myotoxicity Induced by *Bothrops jararacussu* Venom and Isolated Phospholipases A2 by Specific Camelid Single-Domain Antibody Fragments. *PLoS One.* **11**: e0151363.
- Richard, G., A.J. Meyers, M.D. McLean, M. Arbabi-Ghahroudi, R. MacKenzie & J.C. Hall (2013) *In Vivo* Neutralization of α -Cobratoxin with High-Affinity Llama Single-Domain Antibodies (V(H)Hs) and a V(H)H-Fc Antibody. *PLoS One.* **8**: e69495.
- Samy, R.P., M.M. Thwin, B.G. Stiles, H. Bow, V.T. Chow & P. Gopalakrishnakone (2011) Therapeutic potential of peptides with neutralizing ability towards the venom and toxin (CaTx-I) of *Crotalus adamanteus*. *Curr. Top. Med. Chem.* **11**: 2540-55.
- Sánchez, E.E. & A. Rodríguez-Acosta (2008) Inhibitors of snake venoms and development of new therapeutics. *Immunopharmacol. Immunotoxicol.* **30**: 647-78.
- Scheske, L., J. Ruitenbergh & B. Bissumbar (2015) Needs and Availability of Snake Antivenoms: Relevance and Application of International Guidelines. *IJHPM.* **4**: 447-57.
- Shimizu, J.F., C.M. Pereira, C. Bittar, M.N. Batista, G.R.F. Campos, S. da Silva *et al.* (2017) Multiple effects of toxins isolated from *Crotalus durissus terrificus* on the hepatitis C virus life cycle. *PLoS One.* **12**: e0187857.
- Silva, L.C., M.B. Pucca, G. Pessenda, L.B. Campos, E.Z. Martínez, F.A. Cerni *et al.* (2018) Discovery of human scFvs that cross-neutralize the toxic effects of *B. jararacussu* and *C. d. terrificus* venoms. *Acta Tropica* **177**: 66-73.
- Thomas, C.D., A. Cameron, R.E. Green, M. Bakkenes, L.J. Beaumont, Y.C. Collingham *et al.* (2004) Extinction risk from climate change. *Nature* **427**: 145-48.
- Thwin, M.M., R.L. Satish, S.T.F. Chan & P. Gopalakrishnakone (2002) Functional site of endogenous phospholipase A2 inhibitor from python serum. *Eur. J. Biochem.* **269**: 719-27.
- Thwin, M.M., P. Gopalakrishnakone, R.M. Kini, A. Armugam, & K. Jeyaseelan (2000) Recombinant antitoxic and antiinflammatory factor from the nonvenomous snake *Python reticulatus*: phospholipase A2 inhibition and venom neutralizing potential. *Biochemistry.* **39**: 9604-11.
- Villalta-Romero, F., L. Borro, B. Mandic, T. Escalante, A. Rucavado, J.M. Gutiérrez *et al.* (2017) Discovery of small molecule inhibitors for the snake venom metalloprotease BaP1 using *in silico* and *in vitro* tests. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **27**: 2018-22.
- Villalta-Romero, F., A. Gortat, A.E. Herrera, R. Arguedas, J. Quesada, R.L. de Melo *et al.* (2012) Identification of New Snake Venom Metalloproteinase Inhibitors Using Compound Screening and Rational Peptide Design. *ACS Med. Chem. Lett.* **3**: 540-3.
- White, J. (2005) Snake venoms and coagulopathy. *Toxicon* **45**: 951-67.
- Williams, D., J.M. Gutiérrez, R. Harrison, D.A. Warrell, J. White, K.D. Winkel *et al.* (2010) The Global Snake Bite Initiative: an antidote for snake bite. *Lancet* **375**: 89-91.
- World Health Organization (2007) Rabies and envenomings: a neglected public health issue: report of a consultative meeting, pp. 1-3. Geneva, Switzerland. World
- World Health Organization (2017). "*Mordeduras de serpientes venenosas*". Disponible en:(<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs337/es/>). Consultado en enero, 2018.
- Yee, K.T., M. Pitts, P. Tongyoo, P. Rojnuckarin & M.C. Wilkinson (2017) Snake Venom Metalloproteinases and Their Peptide Inhibitors from Myanmar Russell's Viper Venom. *Toxins.* **9**: 15.
- Zolfagharian, H. & N.M. Dounighi (2015) Study on development of *Vipera lebetina* snake anti-venom in chicken egg yolk for passive immunization. *Hum. Vaccin Immunother.* **11**: 2734-9.