

Algunas propiedades bioquímicas y biológicas de la Lectina Tipo C del veneno de la serpiente peruana *Lachesis muta*

Some biochemical and biological properties of C- Type Lectin from Peruvian Lachesis muta snake venom

Fanny Lazo¹, Mercedes Palomino², Dan Vivas³, Ruperto Severino⁴ y Armando Yarlequé⁵ *

Universidad Nacional Mayor de San Marcos

RESUMEN

Se ha realizado una evaluación de algunas propiedades de la lectina tipo C, hemoaglutinina previamente purificada a partir del veneno de la serpiente *Lachesis muta*. Para este estudio, el veneno fue fraccionado en una columna de Sephadex G-100, equilibrada con buffer acetato de amonio 0,05M pH 5,0. Se efectuaron ensayos para medir la estabilidad de la proteína a través de la hemoaglutinación en el rango de pH de 4 a 9 y a temperatura creciente de 30 a 60°C. Asimismo se determinó la antigenicidad mediante ensayos de inmunodifusión doble, la toxicidad en ratones albinos y su participación en el proceso de coagulación sanguínea en plasma humano. Como resultado de esta investigación, se ha determinado que la proteína no enzimática fue purificada 12,7 veces al aplicar lactosa 0,1M al sistema cromatográfico, recuperándose un 5,4% de la proteína activa. La lectina tipo C no pierde su asociación con los eritrocitos ni al cambiar el pH en el rango de 4 a 9, ni al elevar la temperatura de 30 a 60 °C, lo que demuestra su alta estabilidad. Adicionalmente, la proteína mostró su antigenicidad frente al antiveneno lachésico monovalente; sin embargo no presenta toxicidad al inyectarla por vía intraperitoneal en ratones (50 a 200 µg) la lectina en estudio. Por último la adición de la proteína al plasma humano citratado, no modifica su tiempo de recalcificación. Se puede concluir que la lectina tipo C del veneno de *L. muta* participa en el proceso de envenenamiento, generando una rápida asociación con los eritrocitos circulantes independientemente de los valores de pH y temperatura.

PALABRAS CLAVE: Lectina tipo C, veneno, serpiente, *Lachesis muta*, hemoaglutinación.

ABSTRACT

Some properties of a C-type lectin purified from the venom of *L. muta* was carried out. In this way the venom was fractionated into Sephadex G-100 gel filtration chromatography using 0.05 M ammonium acetate buffer pH 5. The effect of temperatura 30-60 °C and pH in the range of 4 to 9 were assayed through hemagglutination activity. In addition antigenic action was preformed lachesic antivenom by double immunodiffusion. Besides toxicity as well as blood coagulation effect on human plasma were determined. As results of this investigation, this lectin was purified 12,7 folds after 0,1 M lactose applied with 5,4% of recovering active protein. This lectin is very stable because of change of temperatura and pH no modified its original activity. In addition C-type lectin show antigenic reaction against lachesic antivenom but has not toxic action due to inyection into peritoneal via on mice (50 to 200 µg) not produce neither mortality nor tissue damages. Finally assays with this protein on human citrated plasma, no affect its recalcification time. Therefore C-type lectin from *L. muta* venom could participate on the envenomation scheme due a strong association with red cells in a wide range of pH and temperature.

KEYWORDS: C-type lectin, Venom, Snake, *Lachesis muta*, Hemagglutination

Recibido: 25/2/15

Aceptado: 4/5/15

* 1) Bióloga, magíster en Biotecnología <flazom@unmsm.edu.pe>. 2) Bióloga <mepa_8815hotmail.com>. 3) Biólogo, magíster en Biología Molecular <devivasr@gmail.com>. 4) Biólogo <rseverinol@unmsm.edu.pe>. 5) Biólogo, doctor en Ciencias Biológicas <ayarleque48@gmail.com>.

Introducción

Las lectinas son proteínas que tienen la capacidad de unirse reversible y específicamente a carbohidratos y que fueron descubiertas por primera vez en plantas (Goldstein y Hayes 1978). Posteriormente se hallaron en diversos organismos: bacterias, caracoles, hongos y vertebrados (Etzler 1986).

Las lectinas encontradas en venenos de serpientes pertenecen a la Superfamilia de lectinas tipo C y se ubican en dos grandes grupos: (1) las lectinas tipo C verdaderas y (2) las proteínas similares a lectinas tipo C (Lu et al. 2005).

Las lectinas tipo C verdaderas son llamadas así porque son capaces de unirse a carbohidratos en presencia de calcio; mientras que las proteínas similares a lectinas tipo C poseen un CRD pero no pueden unirse a carbohidratos (Lu et al. 2005).

Las lectinas tipo C verdaderas son proteínas homodiméricas de aproximadamente 30 kDa que se unen a carbohidratos mediante interacciones electroestáticas dependientes de calcio, poseen una región de reconocimiento de carbohidratos (CRD) constituida por 115-130 aminoácidos dentro de los cuales 32 son invariables, sobresaliendo las posiciones donde se encuentra cisteína, lo que facilita la formación de puentes S-S con la consiguiente estabilización de la conformación tridimensional (Drickamer 1988; Havt et al. 2005). El dominio de reconocimiento de carbohidratos (CRD) es una estructura presente en todas las familias de lectinas pero que varían marcadamente entre ellas. En el caso de las lectinas tipo C, el análisis comparativo de los CRD revelan 18 residuos invariables encontrados con un patrón conservado a través de los 130 aminoácidos del dominio (Drickamer 1988).

La exploración de proteínas no enzimáticas con acciones biológicas específicas, ha permitido en nuestro grupo de investigación efectuar

la detección y aislamiento de la primera lectina tipo C del veneno de una serpiente peruana, como es el caso de *Lachesis muta* (Palomino et al. 2012). Por ello, en la investigación de las propiedades biológicas de la proteína y su relación con el envenenamiento, los objetivos de este estudio fueron analizar la estabilidad térmica y el efecto del pH de la lectina de *L. muta*; determinar su antigenicidad, evaluar su toxicidad en ratones y su participación en el proceso de coagulación *in vitro*.

Materiales y métodos

Veneno

Se obtuvo de especímenes de *L. muta* adultos mantenidos en cautiverio en el Serpentario "Oswaldo Meneses" del Museo de Historia Natural de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos. El veneno fue obtenido por presión manual de las glándulas venenosas y luego fue liofilizado y almacenado a -4 °C hasta su uso.

Suero antilachésico

Se usó suero antilachésico monovalente al estado líquido, producido por el Instituto Nacional de Salud-Lima (INS), correspondiente al lote 007010. El vial de 10 mL de antiveneno neutraliza no menos de 25 mg del veneno de *L. muta*.

Animales de experimentación

Se emplearon ratones albinos cepa Balb C machos (18-22 g) procedentes del bioterio del Instituto Nacional de Salud.

Componentes sanguíneos

Los glóbulos rojos y el plasma fueron obtenidos a partir de sangre venosa humana de

voluntarios sanos que firmaron el respectivo consentimiento informado. La sangre donada corresponde al grupo O Rh positivo.

Cuantificación proteica

Se realizó por el método de absorción ultravioleta a 280 nm y por el método de Lowry et al., modificado por Loayza et al. (1985), usando como proteína estándar albúmina sérica bovina.

Actividad hemoaglutinante

Para la actividad hemoaglutinante se emplearon glóbulos rojos humanos correspondientes al grupo O Rh positivo de donantes sanos, siguiendo el método de Gartner y Ogilvie (1984), modificado por Palomino et al. (2012). Se realizaron diluciones del veneno y las fracciones cromatográficas en una placa de microtitulación con fondo en V y se halla el último pocillo que exhibe una aglutinación completa (sin presencia de botón).

Purificación

Se realizó empleando 40 mg de veneno, los cuales fueron disueltos en 1,5 mL de buffer acetato de amonio 0,05 M pH 5 y fraccionados en una columna de Sephadex G-100 (47 x 1,1 cm). Para eluir las proteínas adheridas a la columna cromatográfica, se empleó el mismo buffer conteniendo lactosa 0,1M.

Termoestabilidad

La prueba de estabilidad a la temperatura se evaluó en el rango de 30 a 80 °C, para lo cual la lectina de *L. muta* fue sometida a un tratamiento de 30 y 60 minutos para cada una de las temperaturas evaluadas.

La lectina fue calentada por 30 y 60 minutos a 30, 40, 50, 60, 70 y 80 °C con ayuda de un baño maría. Luego del tratamiento térmico

respectivo, se enfrió por 20 minutos a temperatura ambiente e inmediatamente, se realizó la prueba de hemoaglutinación por triplicado y se determinó el título en cada caso.

Este trabajo no ha evaluado temperaturas menores a 30°C.

Efecto del pH

El efecto del pH (4-9) sobre la interacción entre la lectina y los carbohidratos presentes en los glóbulos rojos, fue ensayado en un período de 0 a 96 horas. Alícuotas de la proteína fueron tratadas a pH 4, 5 y 6 con buffer acetato de amonio 0,1 M y con buffer Tris-HCl 0,1 M para pH 7, 8 y 9.

La actividad hemoaglutinante se ensayó por triplicado a las 0, 24, 48, 72 y 96 horas de tratamiento. Cada prueba contó con una fila de control negativo que correspondía a la dilución seriada de 50 µL de buffer específico de la prueba (buffer acetato de amonio o Tris-HCl) y 50 µL de GR al 3 % en solución TCS.

Antigenicidad

Para evaluar la reactividad de la lectina y el antiveneno lachésico comercial (INS-Perú) se realizó una prueba de inmunodifusión doble según el método de Ouchterlony y Nilsson (1967).

Se prepararon láminas portaobjetos cubiertas con agarosa al 1 % diluida en buffer fosfato 0,15 M pH 7,0 y conteniendo lactosa 0,1 M, con tres pocillos equidistantes. El pocillo central fue llenado con 10 µL de antiveneno lachésico monovalente (INS-Perú). En tanto, los laterales contenían 10 µL de lectina (0,6 mg/mL) y 10 µL de veneno de *L. muta* (5 mg/mL).

Determinación de la toxicidad

Se trabajó con tres grupos conformados por 4 ratones cada uno. Los ratones albinos en-

tre 18 y 20 g fueron inoculados intraperitonealmente con 0,1 mL de lectina (1 mg/mL). El control positivo se realizó con 0,1 mL de veneno de *L. muta* (2 mg/mL) equivalente a cuatro DL₅₀ y el control negativo con 0,1 mL de solución salina. Luego del tratamiento, se observó el efecto sobre los ratones durante 48 horas.

Al cabo de este tiempo, los ratones vivos se sacrificaron por dislocación cervical y se sometieron a disección. Una DL₅₀ para el veneno de *L. muta* corresponde a 47,28 µg/ ratón de 20 g y es la cantidad de veneno en µg que produce la muerte del 50 % de un lote de ratones de 20 g de peso.

Prueba de actividad anticoagulante

En tubos de ensayo conteniendo citrato de sodio al 3,8%, se colectó sangre venosa de voluntarios sanos con previa autorización. Las muestras obtenidas fueron centrifugadas a 3 000 rpm por 15 minutos y el sobrenadante (plasma) se fraccionó en alícuotas de 0,2 mL para su uso.

El plasma (0,2 mL) fue incubado con 0,1 mL de lectina (1 mg/mL) a 37 °C por cinco minutos. A continuación, se añadió 0,1 mL de cloruro de calcio 25 mM, midiéndose el tiempo de coagulación.

Las variaciones en la actividad anticoagulante fueron determinadas por los cambios en los tiempos de coagulación del plasma en presencia de 20, 50 y 100 µg de lectina tipo C.

Resultados

Purificación

La figura 1 muestra el perfil cromatográfico obtenido al fraccionar el veneno de *Lachesis muta* en una columna de filtración molecular sobre Sephadex G-100. Nótese que la fracción que corresponde a la lectina tipo C eluyó en

un único pico después de aplicar lactosa 0,1 M. Esta fracción contenía 2,16 mg de proteína que corresponden al 5,4%.

Termoestabilidad

La lectina fue sometida a tratamientos térmicos de 30 y 60 minutos de incubación, encontrándose un título máximo de 512 cuando la temperatura de incubación fue de 40 °C tanto a 30 como a 60 minutos (Figura 2).

Se encontró actividad hemoaglutinante causada por la lectina desde 30 hasta 60 °C en ambos tiempos de incubación ensayados. Sin embargo, a 70 °C se observó hemoaglutinación luego de 30 minutos, mientras que a los 80 minutos de incubación, esta actividad quedó anulada.

Efecto del pH

En el rango de pH de 5 a 8 se encontró la actividad hemoaglutinante de la lectina tipo C; mientras que a pH 9, se obtuvo la máxima actividad con el título de 64 (Figura 3). Como puede apreciarse, la incubación de la proteína en estudio a diferentes tiempos con los pH seleccionados, no se registró modificación en la velocidad hemoaglutinante entre 0 y 96 horas.

Antigenicidad

En la prueba de inmunodifusión doble, se formaron varias líneas de precipitación entre el veneno de *L. muta* y el suero anti-lachésico. En cambio, se formó una sola línea de precipitación entre la lectina purificada y el suero anti-lachésico (Figura 4).

Carencia de toxicidad de la lectina tipo C

Ratones albinos inyectados vía intraperitoneal con la lectina en estudio fueron observados por 48 horas y no se detectó ningún

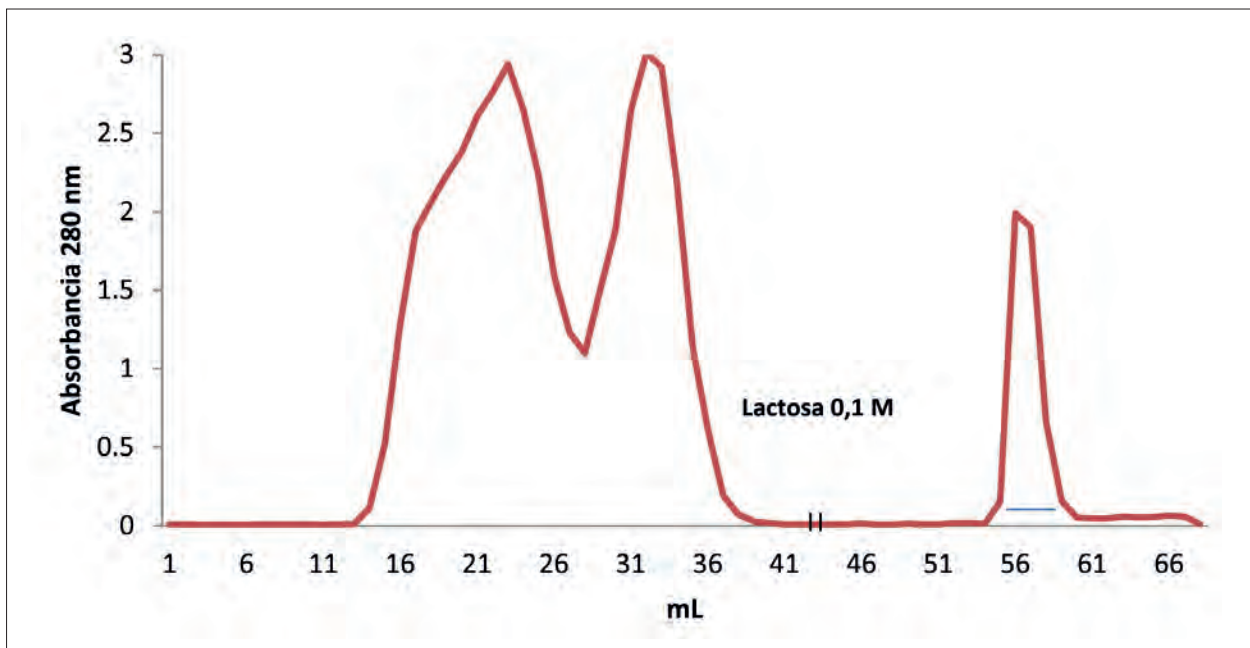


Figura 1. Cromatografía del veneno de *Lachesis muta* en Sephadex G-100 utilizando buffer acetato de amonio 0,05 M pH 5,0 conteniendo lactosa 0,1 M a un flujo de 8 mL/hora. La lectina se encuentra representada por una línea en azul. Se colectaron fracciones de 1 mL.

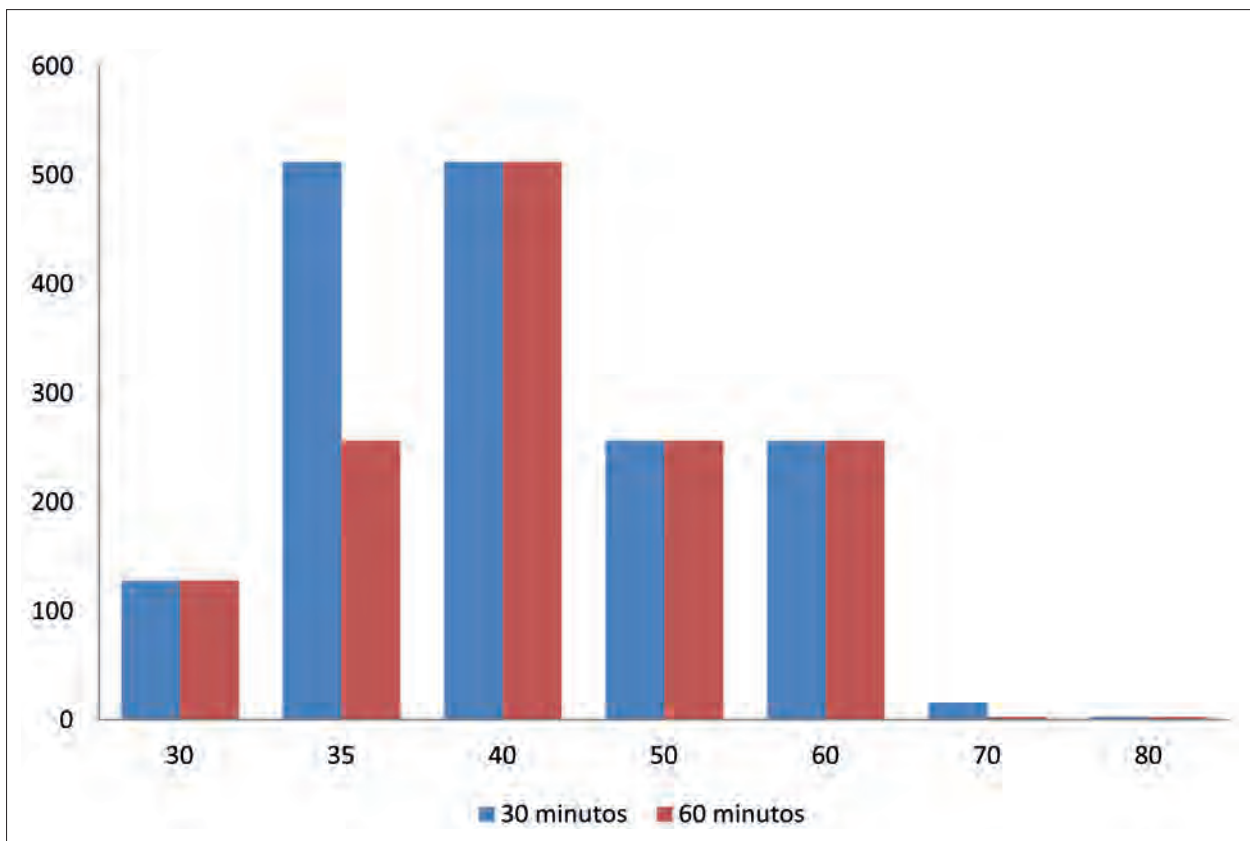


Figura 2. Termoestabilidad de la lectina tipo C de *L. muta*. Las barras representan el título luego de treinta y sesenta minutos de incubación a diferentes temperaturas.

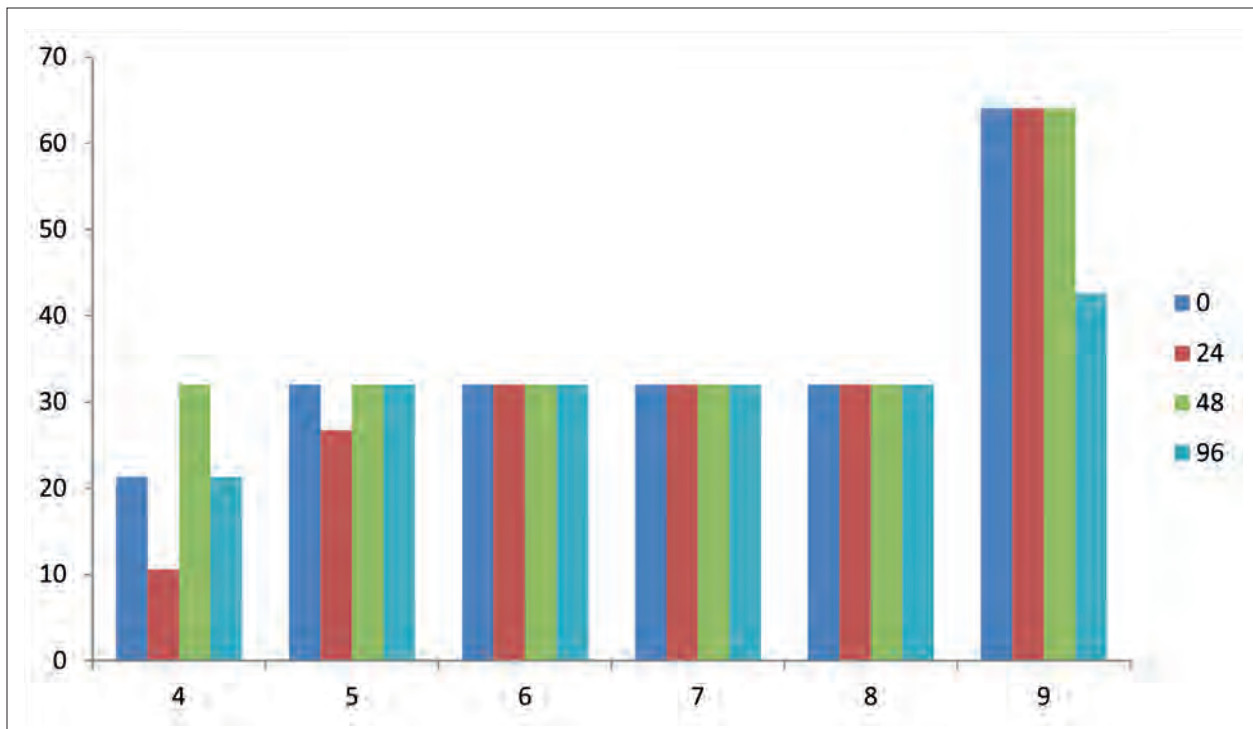


Figura 3. Título a diferentes pH luego de 0, 24, 48 y 96 horas de incubación.

efecto ni signo de toxicidad. Al realizarse la disección de los animales se encontró el mismo resultado que en los controles negativos (inyectados con solución salina) (Figura 5). En cambio, la toxicidad del veneno de *L. muta* se puso de manifiesto en el mismo ensayo, ya que al inyectarse una solución de 2 mg/mL en volúmenes de 0,1 mL no hubo supervivencia a las 48 horas y los daños observados corresponden a la detección de hemorragia y daños tisulares típicos de este veneno.

Ausencia de actividad anticoagulante

La lectina de *L. muta* no presenta actividad anticoagulante, es decir no retarda el tiempo de recalcificación del plasma humano citratado. Tampoco se observó un incremento de la velocidad de coagulación, por lo que esta proteína no influye directamente en la coagulación del fibrinógeno plasmático.

Discusión

El conocimiento general que se tenía hasta hace una década sobre la composición proteica de los venenos vipéridos, estaba referido a la presencia de diversas enzimas y factores que afectaban tejidos como las hemorraginas o aquellos que inducían cambios en la presión arterial, como el inhibidor de angiotensinasa renal (Yarlequé 2000). Sin embargo estudios recientes sobre venenos de serpientes que habitan en nuestro país han permitido encontrar componentes no enzimáticos con

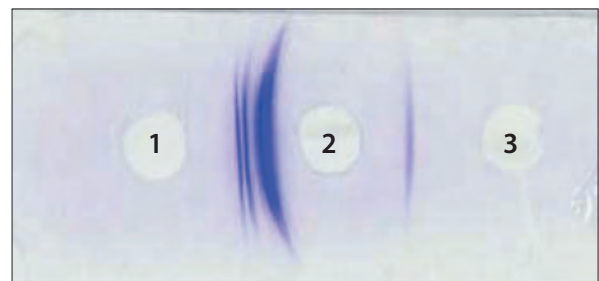


Figura 4. Inmunodifusión doble entre el veneno (1) o la lectina de *L. muta* (3) y el antiveneno lachésico monovalente (2).

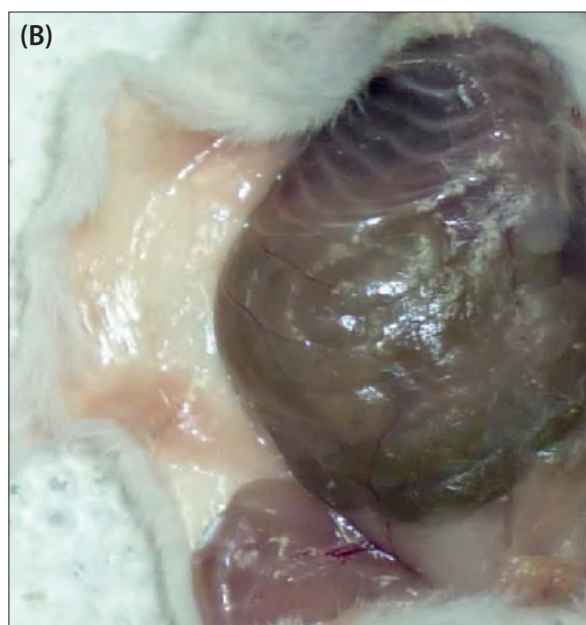
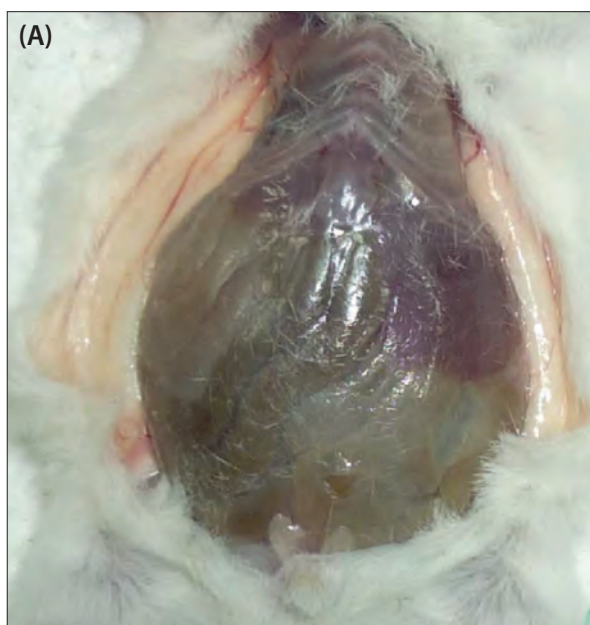


Figura 5. Prueba de toxicidad. (A) Blanco, (B) Lectina, (C) Veneno.



variadas acciones, los cuales se encuentran en plena investigación (Vivas et al. 2012).

Nuestro grupo publicó en el año 2012 (Palomino et al. 2012) una primera investigación sobre la detección y purificación de la lectina tipo C en el veneno de *L. muta*, la cual

era separada mediante una columna de DAE Sephadex A-50, adicionándole NaCl 0,3 M. En la presente investigación se ensayó la purificación de la lectina tipo C en un sistema cromatográfico de filtración molecular sobre Sephadex G-100, basándonos en el criterio de que la lectina quedaba asociada al gel de filtración más tiempo del que corresponde a su peso molecular, a través de asociaciones no covalentes. En este caso el modo de liberarla de la columna fue empleando lactosa 0,1 M con los resultados ya descritos. Este nuevo procedimiento ha permitido por un lado optimizar el grado de purificación y obtener un mayor porcentaje de proteína activa recuperada.

En cuanto a la termoestabilidad muy pocos autores han evaluado la estabilidad térmica de estos compuestos; sin embargo, es de esperarse que soporten temperaturas altas sin denaturarse debido a la presencia de enlaces disulfuros conservados en la familia de lectinas tipo C. Estos enlaces han sido reportados previamente (Palomino et al. 2012).

Resultados similares a los nuestros fueron los obtenidos de la lectina aislada a partir del veneno de *Bothrops leucurus* la cual mostró una pérdida de actividad total a partir de los

80 °C evaluando un período de incubación de 30 minutos (Nunes et al. 2011). En cambio, la lectina de *Bothrops jararacussu* solo es estable hasta los 50 °C, mientras que a 70-80 °C pierde totalmente la actividad (Elifio-Esposito et al. 2011).

En referencia al efecto del pH sobre la actividad de la lectina tipo C, nuestros resultados no concuerdan a los encontrados en la lectina del veneno de *Bothrops jararacussu*, que tiene un mayor título a pH neutro (Elifio-Esposito et al. 2011) y en la trombolectina que es más activa a pH 6,6 (Gartner et al. 1980). Nunes et al., en el 2011, reportaron que no hubo efecto respecto al pH en un rango de 4 a 7 para la lectina de *Bothrops leucurus*.

Por otro lado la lectina tipo C caracterizada, ha sido reconocida por el antiveneno lachésico monovalente proporcionado por el INS-Perú. Es decir, esta proteína puede desencadenar la respuesta inmunitaria y propiciar la formación de anticuerpos contra epitopes presentes en este compuesto (Figura 4) .

En 1986, Ogilvie et al. produjeron un suero anti-lectina de *L. muta* luego de inyectar 1mg de esta proteína vía intramuscular en conejos. El suero obtenido no solo reconoció a la lectina de *L. muta*, sino también a trombolectina. Sin embargo no se observó línea de precipitación entre el suero anti-lectina de *L. muta* y la lectina de *Dendroaspis jamesonii*. De manera similar, suero anti-*Agkistrodon piscivorus leukostoma* fue producido y enfrentado contra las lectinas de *Bothrops atrox*, *Crotalus atrox*, *Agkistrodon contortrix contortrix* y *Lachesis muta*. El suero fue capaz de reconocer a *Agkistrodon piscivorus leukostoma*, de igual forma que todas las demás lectinas ensayadas.

Como se mencionó anteriormente, la lectina tipo C, purificada de *L. muta* no mostró toxicidad al inyectarla en ratones albinos. Al respecto, Lomonte et al., en 1990, realizaron pruebas tratando de observar el efecto de 200 µg lectina de *Bothrops godmani* sobre ratones albinos para lo cual inyectó este componente

vía intraperitoneal y vía intravenosa. Ninguna alteración ni signo de toxicidad fue observada luego de los tratamientos.

Finalmente la proteína aislada no afecta los tiempos de recalcificación del plasma humano citratado, lo que demuestra que no interfiere en el proceso de coagulación *in vitro*, es decir no actúa como un principio procoagulante o anticoagulante. Hasta el presente trabajo, no se había realizado este tipo de prueba en lectinas verdaderas. A pesar de esto, es importante resaltar que estas proteínas interactúan con componentes sanguíneos como los glóbulos rojos, plaquetas, linfocitos y neutrófilos (Elifio-Esposito et al. 2011; Ogilvie et al. 1989; Mastro et al. 1986), por lo que nuevos estudios permitirán conocer el rol que juega esta proteína en el sistema circulatorio de los mamíferos.

Conclusiones

En el presente trabajo se ha purificado la lectina de *L. muta*, la cual es una proteína estable al pH y a la temperatura, ya que se une a los glóbulos rojos a diferentes valores de pH (4 a 9) y tolera temperatura desde 30 hasta 70 °C.

A pesar de tratarse de un componente no tóxico evidenciado en ratones albinos vía intraperitoneal, esta proteína es capaz de estimular el sistema inmune y conllevar la producción de anticuerpos evidenciado en la prueba de inmunodifusión doble.

Agradecimientos

Los autores agradecen al Consejo Superior de Investigaciones (CSI) del Vicerrectorado de Investigación (VRI) de la UNMSM por el apoyo financiero brindado. Uno de los autores (Palomino, M.) obtuvo su título profesional de bióloga genetista biotecnóloga con parte de este estudio.

Referencias bibliográficas

- DRICKAMER K. (1988). Two distinct classes of Carbohydrate-recognition domains in animal lectins. *J Biol Chem*, 263; pp. 9557-9560.
- ELIFIO-ESPOSITO S, Tomazeli L, Schwartz C, Gimenez AP, Fugii GM, Fernandes LC, Zishler LFM, Stuelp-Campelo PM, Moreno AN (2011). Human neutrophil migration and activation by BjuL, a galactose binding lectin purified from *Bothrops jararacussu* venom. *BMC Immunology*, 12 (10).
- ETZLER M.E. (1986). Distribution and Function of Plant Lectins; in The lectin: properties functions and applications in biology and medicine. En I.E Liener, Goldstein and NSharon editors, New York: Academic Press; pp: 371-435.
- GARTNER TK, STOCKER K, WILLIAMS DC. (1980). Thrombolectin: a lectin isolated from *Bothrops atrox* venom. *FEBS Lett*, 117; pp. 13-16.
- GARTNER T.K. y OGILVIE ML. (1984). Isolation and characterization of three Ca²⁺-dependent beta-galactoside-specific lectins from snake venoms. *Biochem J*, 224; pp. 301-307.
- GOLDSTEIN I.J. y HAYES CE. (1978). The lectins: Carbohydrate-binding proteins of plants and animals. *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem*, 35; pp.127-340.
- HAVT A, Toyama MH, do Nascimento NR, Toyama DO, Nobre AC, Martins AM, Barbosa AC, Carneiro EM, Fonteles MC, Monteiro HS. (2005). A new C-type animal lectin isolated from *Bothrops pirajai* is responsible for the snake venom major effects in the isolated kidney. *Int J Biochem Cell Biol*, 37; pp.130-141.
- LOAYZA S., MORANTE Y., CAMPOS S., YARLEQUÉ A. (1985). Enzimas proteolíticas en el veneno de las serpientes peruanas *Lachesis muta* y *Bothrops atrox*. *Bol Soc Quím Peru*, 52(3); pp. 151-63.
- LOMONTE B., ROJAS G., GUTIERREZ J.M., RAMÍREZ G. (1990). Isolation of a galactose-binding lectin from the venom of the snake *Bothrops godmani* (Godmann's pit viper). *Toxicon*, 28; pp. 75-81.
- LU Q., Navdaev A, Clemetson JM, Clemetson KJ. (2005). Snake venom C-type lectins interacting with platelet receptors. Structure-function relationships and effects on haemostasis. *Toxicon*; 45; pp. 1089-1098.
- MASTRO AM, Hurley DJ, Winning RK, Filipowski R, Ogilvie ML, Gartner TK. (1986). Mitogenic activity of snake venom lectins. *Cell Tissue Kinet*, 19(5); pp.557-66.
- NUNES E.D., de Souza MA, Vaz AF, Santana GM, Gomes FS, Coelho LC, Paiva PM, da Silva RM, Silva-Lucca RA, Oliva ML, Guarnieri MC, Correia MT. (2011). Purification of a lectin with antibacterial activity from *Bothrops leucurus* snake venom. *Comp Biochem Physiol B* 159; pp. 57-63.
- OGILVIE ML, Dockter ME, Wenz L, Gartner TK. (1986). Isolation and characterization of lactose-binding lectins from the venoms of the snakes *Lachesis muta* and *Dendroaspis jamesonii*. *J Biochem*, 100; pp. 1425-1431.
- OGILVIE ML, BYL JW, GARTNER TK. (1989). Platelet-aggregation is stimulated by lactose-inhibitable snake venom lectins. *Thromb Haemost*, 62(2); pp.704-707.
- OUCHTERLONY O. y Nilsson L. (1967). Immunodiffusion and immunoelectrophoresis. *Handbook of Experimental Immunology*, 1 (34); pp. 655-660.
- PALOMINO M, LAZO F, DELGADILLO J, SEVERINO R, YARLEQUÉ A. (2012). Purificación de una lectina tipo C del veneno de la serpiente peruana *Lachesis muta*. *Rev Soc Quím Perú* 78, (3); pp.161-169.
- VIVAS D., INGA R, YARLEQUÉ A. (2012). Uso potencial de componentes del veneno de serpientes en el tratamiento del cáncer. *Rev Peru Med Exp Salud pública* 29(3); 396-401.
- YARLEQUÉ A. (2000). *Las serpientes peruanas y sus venenos*. Lima: Fondo Editorial UNMSM.