

PURIFICACIÓN DE UNA ENZIMA PROTEOLÍTICA DEL VENENO DE *Bothrops brazili* Y ESTUDIO DE SU ACTIVIDAD SOBRE FIBRINÓGENO

PURIFICATION OF A PROTEOLYTIC ENZYME FROM THE VENOM OF *Bothrops brazili* SNAKE AND STUDY OF ITS ACTIVITY ON FIBRINOGEN

María Azañero, Enrique Escobar y Armando Yarlequé*

RESUMEN

Se ha aislado una enzima proteolítica del veneno de la serpiente peruana *Bothrops brazili*, por cromatografía en Sephadex G-100 y CM-Sephadex C-50, con buffer acetato de amonio 0,05M pH 7,0. La enzima fue purificada 3,2 veces con un rendimiento de 52,5% y el peso molecular calculado por filtración en gel fue de 18 000, mientras que la PAGE-SDS permitió observar una sola banda proteica de 22 000 daltons en condiciones reductoras y de 20 300 daltons en condiciones no reductoras, determinándose que la enzima es de una sola cadena polipeptídica con al menos un enlace disulfuro.

La enzima hidroliza fibrinógeno, fibrina, caseína y albúmina, pero no hemoglobina ni mioglobina. Por su acción sobre el fibrinógeno, es una $\text{A}\alpha$ -fibrinogenasa ya que hidroliza primero la cadena $\text{A}\alpha$ del fibrinógeno y luego la cadena $\text{B}\beta$. Esta actividad es inhibida por EDTA pero no por PMSF, TLCK, iodoacetato y pepstatin, indicando que se trata de una metaloproteínasa; sin embargo, los iones Ca^{++} , Mg^{++} y Zn^{++} no restablecen la actividad. Finalmente, la enzima es estable hasta los 45 °C y en su acción sobre fibrina, la hidrólisis se da preferencialmente sobre la cadena α .

Palabras clave: Enzima, fibrinogenasa, veneno, *Bothrops brazili*

ABSTRACT

A proteolytic enzyme was purified from *Bothrops brazili* peruvian snake venom using Sephadex G-100 followed by CM-Sephadex C-50, in both two cases with 0.05M ammonium acetate pH 7,0. The enzyme was purified 3,2 fold with 52,5% of yield and by gel filtration the enzyme showed 18 000 of molecular weight, while the PAGE-SDS showed only one protein band of 22 000 in the presence of mercaptoethanol and 20 300 under nonreducing conditions which suggests that the enzyme has a single polypeptide chain with disulfide bond.

The enzyme hydrolyzes fibrinogen, fibrin, casein and albumin, but not hemoglobin and mioglobin. The enzyme is a $\text{A}\alpha$ -fibrinogenase because preferentially hydrolyzes the $\text{A}\alpha$ chain of the fibrinogen molecule. This activity is inhibited by EDTA but not by PMSF, TLCK, iodoacetate and pepstatin, suggests that is a metalloproteinase, however the ions Ca^{++} , Mg^{++} and Zn^{++} cannot reactivate the inhibition by EDTA. Finally the enzyme is stable up to 45 °C and in its effect on fibrin the enzyme is to attack α chain rapidly.

Key words: Enzyme, fibrinogenase, venom, *Bothrops brazili*

INTRODUCCIÓN

La disolución de coágulos de fibrina por la enzima plasmina es un proceso esencial para impedir la formación de trombos y mantener la fluidez de la sangre. Por los años 30 se descubrió que la estreptoquinasa, una enzima liberada por la bacteria *Streptococcus*, genera

plasmina a partir de plasminógeno y por lo tanto disuelve los coágulos de sangre (Tillet & Garner, 1933). Actualmente, esta proteína se usa ampliamente en el tratamiento de ciertas enfermedades tromboticas tales como el infarto agudo del miocardio, embolia pulmonar y trombosis de venas profundas (Goa *et al.*, 1990). Sin embargo, el uso de estreptoquinasa y otros agentes trombolíticos puede ocasionar diversos efectos colaterales, perjudiciales al

* Laboratorio de Biología Molecular. Facultad de Ciencias Biológicas, UNMSM.

paciente, por lo que se hace necesario obtener nuevos productos trombolíticos que sean tan efectivos como inocuos para el paciente. Esto implica la posibilidad de usar enzimas capaces de convertir el plasminógeno en plasmina o que hidrolicen directamente la fibrina y/o el fibrinógeno, previniendo así la formación de coágulos de fibrina.

En este sentido, los venenos de serpientes, particularmente de la familia *Viperidae*, son ricos en enzimas proteolíticas capaces de hidrolizar algunas proteínas plasmáticas como fibrinógeno y fibrina. Desde la perspectiva clínica, estas enzimas tienen una potencial utilidad para disolver coágulos de sangre formados durante una patología trombotica (Markland, 1988).

B. brazili es una serpiente de nuestro país que habita en la región del Alto Maraón y que produce abundante veneno, hasta 4 ml en cada mordedura (Meneses, 1974). En este veneno recientemente se han aislado y caracterizado las enzimas fosfolipasa (Zeballos *et al.*, 1999) y L-aminoácido oxidasa (Solís *et al.*, 1999), pero ya en 1996 se reportó la existencia de una enzima proteolítica con acción sobre caseína y fibrinógeno (Escobar *et al.*, 1996); sin embargo, este último aspecto sólo fue abordado muy tangencialmente, por lo que en este trabajo decidimos estudiar detalladamente la acción sobre fibrinógeno, a fin de esclarecer el rol de la enzima durante el envenenamiento y evaluar sus posibilidades como agente trombolítico.

MATERIAL Y MÉTODOS

Veneno de serpiente. El veneno de *B. brazili* fue proporcionado por el serpentario Oswaldo Meneses del Museo de Historia Natural de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, donde especímenes procedentes del Alto Maraón son mantenidos en cautiverio a 28 °C. El veneno extraído por presión manual de las glándulas fue liofilizado y conservado a - 8 °C.

Cuantificación de proteína. Durante la purificación de la enzima, la proteína se determinó por la absorción de luz ultravioleta a 280 nm (Warburg & Christian, 1941), mientras que en la enzima purificada, la cantidad de proteína se determinó por el método de Lowry *et al.* (1951).

Evaluación de la pureza y determinación del peso molecular. La pureza y el peso molecular de la enzima fueron determinados por electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio (PAGE-SDS), utilizando como colorante azul de coomassie 0,1% (Weber & Osborn, 1969). Adicionalmente el peso molecular también fue calculado por cromatografía de filtración en una columna de Sephadex G-100 (Andrews, 1964).

Purificación de la enzima. 50 mg de veneno fueron disueltos en 1 ml de buffer acetato de amonio 0,05M a pH 7,0 y luego de eliminar los restos insolubles por centrifugación a 1500 xg por 15 minutos, 0,95 ml del sobrenadante se aplicaron a una columna de Sephadex G-100 (1,2x44,3 cm), equilibrada con buffer acetato de amonio 0,05M a pH 7,0. En las fracciones colectadas se midió la cantidad de proteína y la actividad caseinolítica. Las fracciones con mayor actividad fueron reunidas y aplicadas a una columna de CM-Sephadex C-50 (1,2x17,5 cm), equilibrada con el mismo buffer. Las proteínas retenidas en la columna fueron eluidas con el buffer de corrida conteniendo sucesivamente NaCl 0,05 M, 0,3 M y 0,6 M. En cada fracción igualmente se determinó la cantidad de proteína y la actividad caseinolítica. En ambos sistemas el flujo fue de 5 ml/h y se trabajó a temperatura ambiente.

Actividad caseinolítica. Durante la purificación de la enzima, su actividad proteolítica se midió sobre caseína, para lo cual se incubó 1,5 ml de caseína 2% disuelta en buffer Tris HCl 0,2M pH 7,5, con 0,4 ml de agua destilada y 0,1 ml de la enzima, durante 15 minutos a

37 °C. La reacción se detuvo con 1,5 ml de ácido tricloro acético 0,44 M en frío y los productos ácidos solubles obtenidos por centrifugación a 1500 xg durante 15 minutos, fueron leídos a 280 nm. Para calcular la actividad específica los valores de D. O. a 280 nm fueron convertidos a μg de L-tirosina, y expresados como unidades por mg de proteína (una unidad equivale a la liberación de $1\mu\text{g}$ de L-tirosina por minuto) (Takahashi & Ohsaka, 1970).

Para los ensayos que a continuación se describen se empleó la enzima purificada a una concentración de 0,4mg/ml (determinada por el método de Lowry).

Acción proteolítica sobre fibrinógeno. La actividad sobre fibrinógeno se midió incubando a 37 °C, 0,8 ml de fibrinógeno bovino 5 mg/ml, disuelto en buffer Tris-HCl 0,05 pH 7,5, y 40 μl de la enzima purificada. A los 1, 3, 5, 10, 20, 30, 60 y 120 minutos se tomaron 80 μl del incubado para su análisis por PAGE- SDS.

Efecto de algunos inhibidores de proteasas. Se evaluó el efecto del fenil metil sulfonil fluoruro (PMSF) 4 mM, tosyl lisil clorometil cetona (TLCK) 3 mM, pepstatin 3,6 mM, iodoacetato 6 mM, etilen diamino tetra acético (EDTA) 1,5 mM y mercaptoetanol 20 mM. En cada caso se preincubó 15 μl de la enzima con 15 μl del reactivo a 37 °C durante 15 minutos y luego se midió la actividad sobre fibrinógeno con 20 μl del incubado. La reacción se evaluó por PAGE-SDS.

Acción de iones metálicos. También se probó el efecto del calcio, magnesio y zinc bajo la forma de cloruros, sobre la enzima tratada con EDTA. Para esto, 15 μl de la enzima se mezclaron con 15 μl de EDTA 1,5 mM durante 15 minutos a 37 °C y luego se agregó por separado, 10 μl del ión respectivo a concentraciones de 3 y 6 mM, incubándose a 37 °C por 15 minutos más. Finalmente se probó y analizó la actividad fibrinogenolítica por PAGE-SDS.

Termoestabilidad. La termoestabilidad de la enzima se determinó incubando a diferentes temperaturas (37, 45, 55, 65, 75, 85 y 95 °C), alícuotas de 20 μl de la enzima. Luego de 15 minutos se enfrió rápidamente a 4 °C por 3 minutos y se midió la actividad sobre fibrinógeno con 10 μl de cada muestra. El análisis se hizo por PAGE-SDS.

Acción sobre otras proteínas. La actividad fibrinolítica fue determinada sobre coágulos de fibrina, formados a partir de 0,2 ml de fibrinógeno 5 mg/ml y 10 μl de trombina humana 50 U/ml incubados a 37 °C por 30 minutos. A estos coágulos se añadió 10 μl de la enzima y se incubó a 37 °C. A los 5, 10, 20, 30, 60 y 120 minutos se midió la actividad fibrinolítica por PAGE- SDS. Esta actividad también se evaluó por el método de Astrup y Mulertz (1952), observando directamente la disolución de los coágulos, con 10 μl de la enzima, a intervalos de 30 minutos durante 3 horas.

También se evaluó por PAGE-SDS la probable acción proteolítica de la enzima sobre albúmina 4 mg/ml, hemoglobina 2 mg/ml, mioglobina 12 mg/ml y caseína 8 mg/ml, disueltas en buffer Tris-HCl 0,05M a pH 7,5. La actividad se probó con 10 μl de la enzima a 37 °C durante 15 minutos.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Purificación de la enzima. En el primer paso de purificación sobre Sephadex G-100 el veneno crudo fue fraccionado en 3 picos de proteína, y se encontró la mayor actividad caseinolítica en la porción ascendente del segundo pico (Fig. 1). En esta etapa la enzima fue purificada 1,3 veces y con un rendimiento de 65,1%. Durante el segundo paso de purificación en CM-Sephadex C-50 a pH 7, un pequeño pico de proteína, sin actividad proteolítica, fue eluido directamente, mientras que el resto de proteína interactuó con el gel, inclusive después de añadir NaCl 0,05 M al buffer de elución. Al aumentarse la concen-

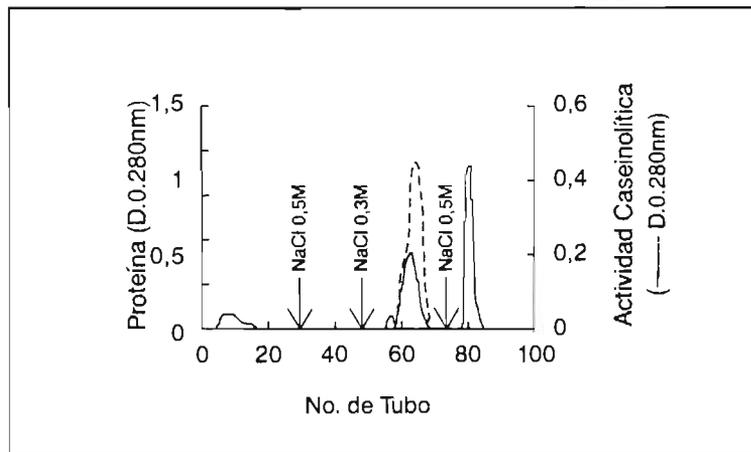


Figura 2. Purificación de la enzima proteolítica en CM-Sephadex C-50 a pH 7. En este intercambiador catiónico, la proteasa quedó ligada al gel y fue eluida luego de incorporar al buffer de corrida NaCl 0,3 M.

Tabla I. RESUMEN DEL PROCESO DE PURIFICACIÓN

ETAPA	Proteína (mg)	Actividad Específica	Unidades Totales de Actividad	Purificación	Rendimiento (%)
Crudo	31,60	0,92	29,072	1,0	100,0
Sephadex G-100	16,16	1,19	18,926	1,3	65,1
CM-Sephadex C-500	4,55	2,94	15,263	3,2	52,5

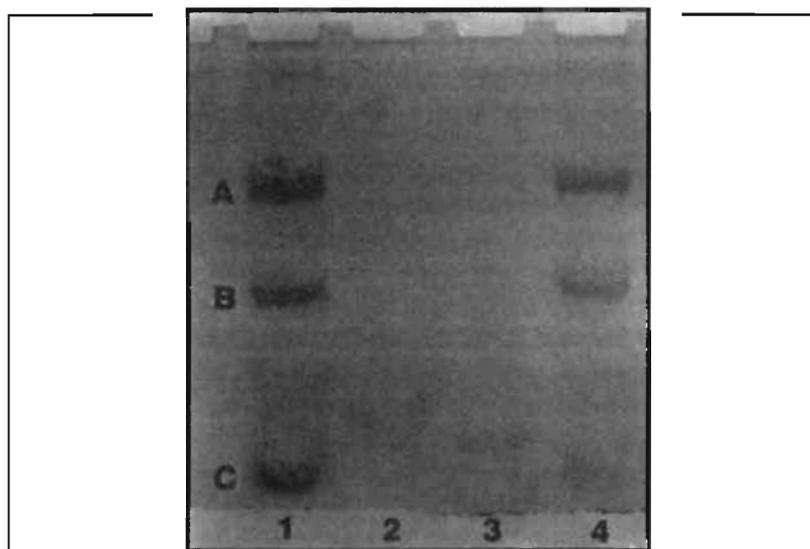


Figura 3. PAGE-SDS de la proteasa aislada del veneno de *B. brazili*. En los carriles 1 y 4 se observan los estándares de peso molecular: albúmina (66KDa), ovoalbúmina (45KDa) y lisozima (14,3KDa). En los carriles 2 y 3 se muestran la enzima reducida (22KDa) y no reducida (20,3KDa) respectivamente.

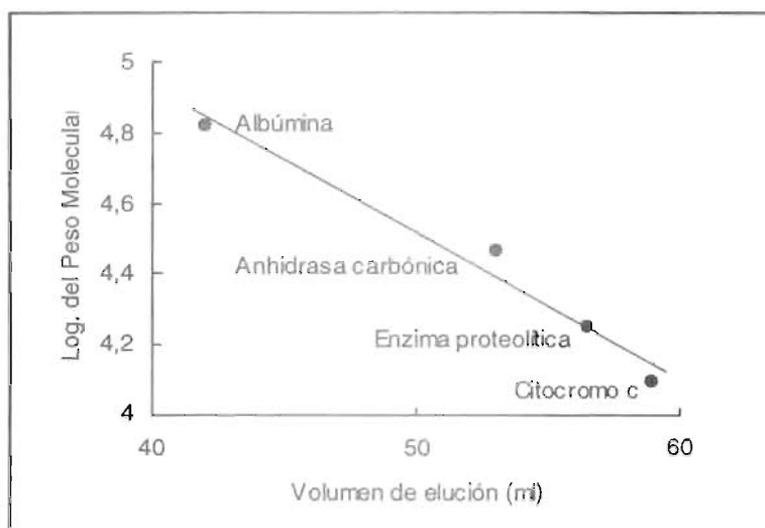


Figura 4. Determinación del peso molecular por cromatografía de filtración en Sephadex G-100. Usando albúmina (66KDa), anhidrasa carbónica (29KDa) y citocromo c (12,4KDa), como estándares, se calculó un peso molecular de 18KDa para la enzima proteolítica

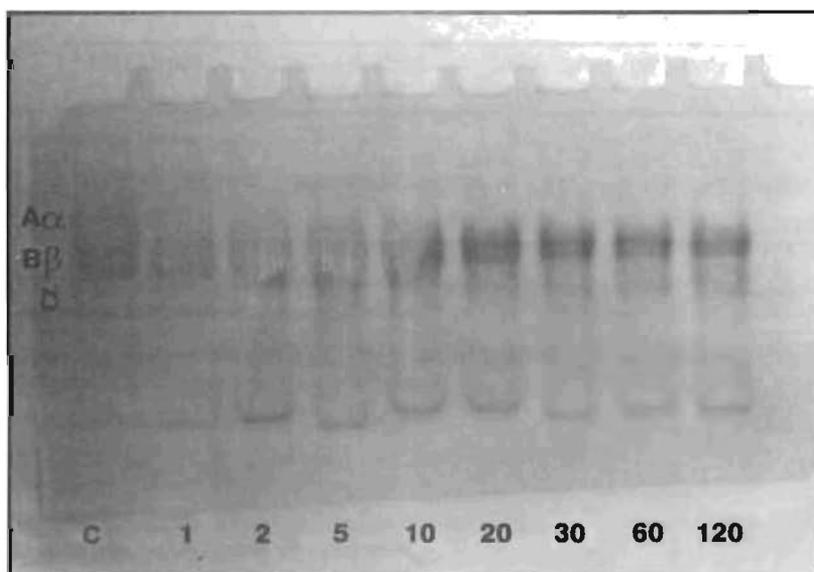


Figura 5. Evaluación por PAGE-SDS de la hidrólisis de fibrinógeno. El patrón de fibrinógeno (C) fue modificado por la enzima desde el primer minuto de incubación.

ran & Geren, 1981) y *Lachesis muta* (Escobar *et al.*, 1992).

La función de estas fibrinogenasas, durante el envenenamiento, es retardar o anular la capacidad de coagulación del fibrinógeno atacando de manera preferencial la cadena A α

y luego la cadena B β . De esta manera estos venenos producen una drástica alteración de la coagulación sanguínea debido a la desfibrinogénesis que producen (Gutiérrez *et al.*, 1982; Gutiérrez & Bolaños, 1980).

Termoestabilidad. Según el patrón de digestión del fibrinógeno mostrado en la Fig. 6, se encontró que la enzima es termoestable hasta los 45 °C, y es inactivada a partir de los 55 °C. Es sabido que mientras menor es el peso molecular de una proteína y mayor la cantidad de enlaces disulfuro, la proteína posee gran termoestabilidad. En el caso de la proteína en estudio, ésta tiene bajo peso molecular, por lo que su gran sensibilidad al calor podría deberse a que tiene pocos enlaces disulfuro.

Una fibrinogenasa del veneno de *Cerastes cerastes* es estable hasta los 55 °C (Daoud *et al.*, 1987), mientras que la fibrinogenasa de *L. muta* tolera temperaturas de hasta 60 °C (Escobar *et al.*, 1992).

Efecto de algunos inhibidores de proteasas. De todos los inhibidores ensayados, sólo el EDTA produjo una completa inhibición de la actividad enzimática, lo cual significa que la proteasa en estudio es una metalo proteinasa. Esto coincide ampliamente con lo reportado para otras A α -fibrinogenasas (Escobar *et al.*, 1992; Markland *et al.*, 1988; Evans, 1984; Tanizaki *et al.*, 1989)

Por otro lado, ya que la actividad no fue afectada por PMSE, ácido iodoacético y TLCK, se puede deducir que la enzima no tiene serina, cisteína e histidina en su centro activo. En relación al pepstatin, éste se comportó como un inhibidor de la actividad; sin embargo, esta inhibición no se consideró concluyente, ya que el disolvente del pepstatin, el metanol, también produjo inhibición (Fig. 7).

También resulta interesante interpretar el hecho de que el mercaptoetanol no haya ejercido ningún efecto en la actividad enzimática, pues de los resultados sobre el peso molecular y la termoestabilidad, se dedujo que la enzima no debía tener muchos enlaces disulfuros pero si por lo menos uno, por lo que se deduce que éstos no deben ser esenciales para mantener su función.

Efecto de algunos iones metálicos. De los resultados obtenidos en esta prueba, se ha determinado que la actividad de la enzima tratada con EDTA, no es restituida por calcio, magnesio o zinc, a concentraciones finales de 0,75 y 1,5 mM (Fig. 8).

El resultado encontrado por nosotros puede tener 2 explicaciones. Por un lado, la es-

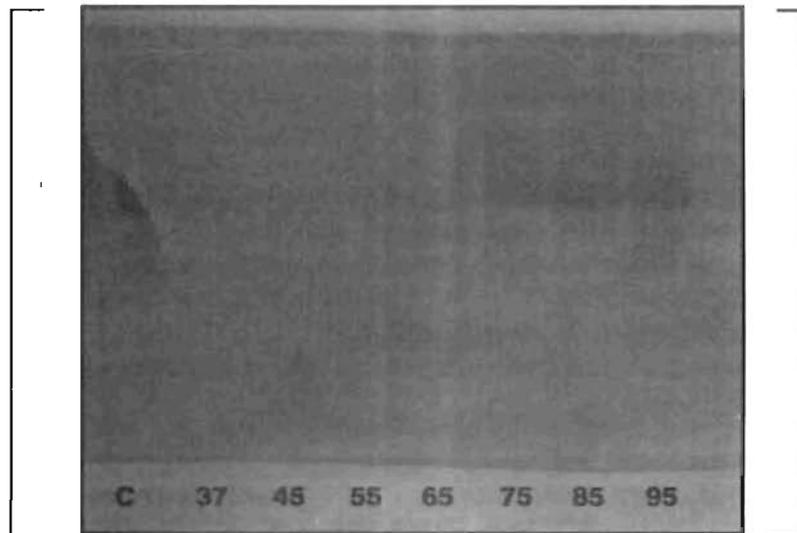


Figura 6. Termoestabilidad de la enzima. La actividad sobre fibrinógeno fue medida luego de preincubar la enzima a las temperaturas indicadas durante 15 minutos.

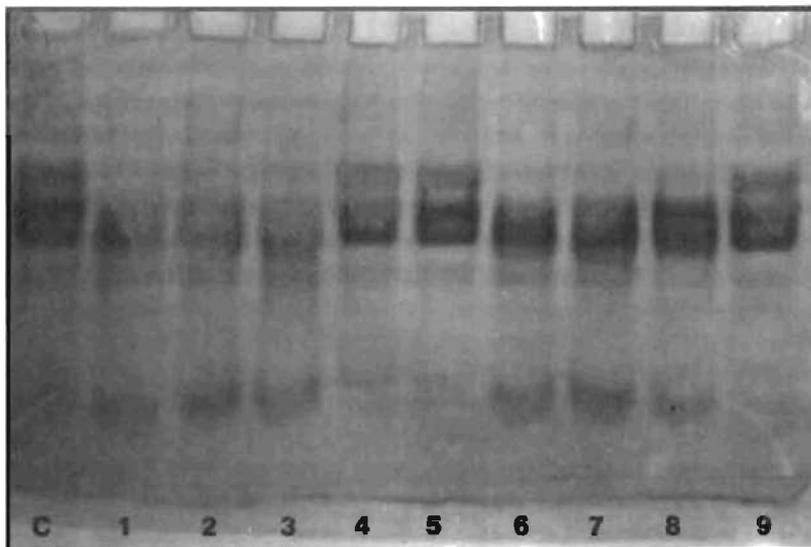


Figura 7. Efecto de algunos inhibidores de proteasas. La actividad sobre el fibrinógeno fue evaluada luego de preincubar la enzima con PMSF (2), iodoacetato (3), EDTA (4), pepstatin (5), TLCK (6), mercaptoetanol (7), etanol (8) y metanol (9). (C) corresponde al control de fibrinógeno y (1) a la actividad de la enzima sin tratamiento.

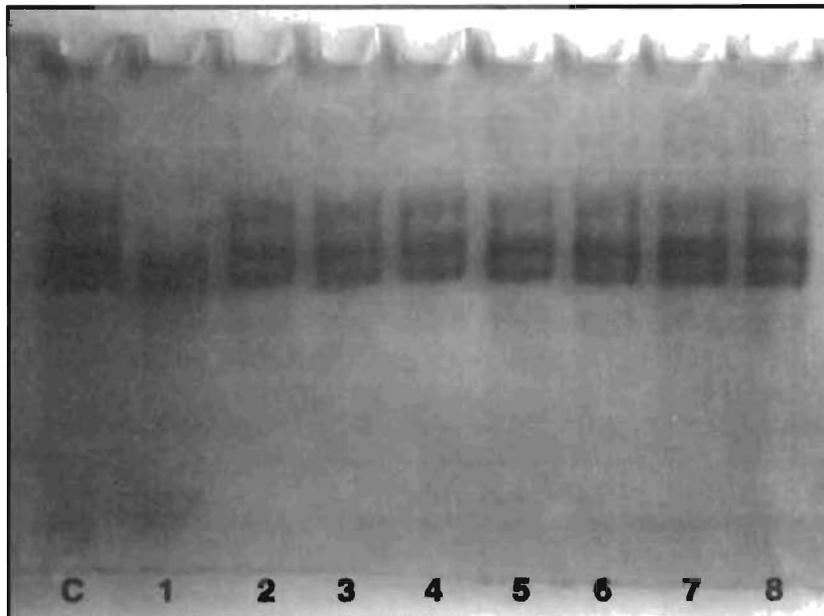


Figura 8. Efecto del calcio, magnesio y zinc sobre la enzima tratada con EDTA. (C) control de fibrinógeno, (1) actividad de la enzima sin tratamiento, (2) actividad de la enzima tratada con EDTA, (3) y (4) efecto del Ca^{++} 0,75 y 1,5 mM, (5) y (6) efecto del Mg^{++} 0,75 y 1,5 mM, (7) y (8) efecto del Zn^{++} 0,75 y 1,5 mM.

estructura de la enzima tratada con EDTA podría haber sido alterada drásticamente de modo que la inhibición resulta irreversible; y por otro lado, podría deberse a que el metal ligado a la enzima sea diferente de los utilizados. Algo similar se ha encontrado con la proteasa J del veneno de *B. jararaca*, la cual es irreversiblemente inactivada por EDTA y o-fenantrolina (Tanizaki *et al.*, 1989). Sin embargo, en otros casos la actividad de la enzima inhibida por EDTA puede ser restablecida por Zn^{++} como en el caso de *L. muta* o por Ca^{++} , como en el caso de *V. lebetina* (Escobar *et al.*, 1992; Gasmi *et al.*, 1991).

Acción sobre otras proteínas. La acción proteolítica sobre coágulos de fibrina, evaluada por PAGE-SDS, se evidenció desde los 5 minutos sobre la cadena α , mientras que a partir de los 20 minutos esta acción se extendió a la cadena β (Fig. 9). Cuando la actividad fibrinolítica se evaluó por el método de Astrup y Møller, fue posible observar una progresiva disolución del coágulo desde los 30 minutos, que se hizo mucho más evidente a partir de las 2 horas (Fig. 10).

Asimismo, la enzima mostró tener una elevada actividad hidrolítica sobre albúmina bovina, evidenciándose una lisis completa de ésta, mediante la formación de diferentes productos de menor peso molecular; asimismo se observó una actividad muy similar sobre caseína. A diferencia de lo anterior, no se evidenció ninguna alteración en los patrones electroforéticos de hemoglobina y mioglobina. En todos los carriles donde se colocó la proteína mas la enzima se observó una tenue banda correspondiente a la enzima, semejante a la presentada en el carril control (Fig. 11).

El hecho de que la enzima también hidrolice fibrina permite denominarla enzima fibrino(geno)lítica, es decir, con capacidad de digerir tanto fibrinógeno como fibrina. De este modo, durante el envenenamiento, la actividad de esta enzima estaría involucrada no solo en la destrucción de fibrinógeno sino también en la hidrólisis de microcoágulos formados pocas horas después de la mordedura y posteriormente a la coagulación intravascular diseminada (Escobar *et al.*, 1992). Por otro lado, la actividad fibrinolítica de la enzima, bajo las

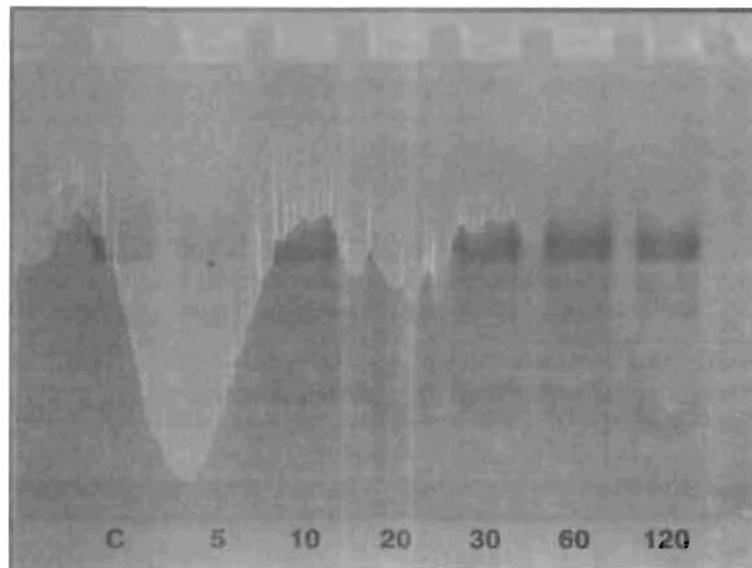


Figura 9. Evaluación por PAGE-SDS de la actividad de la enzima sobre fibrina. El patrón electroforético de la fibrina (c) fue modificado por acción de la proteasa desde los 5 minutos de incubación.

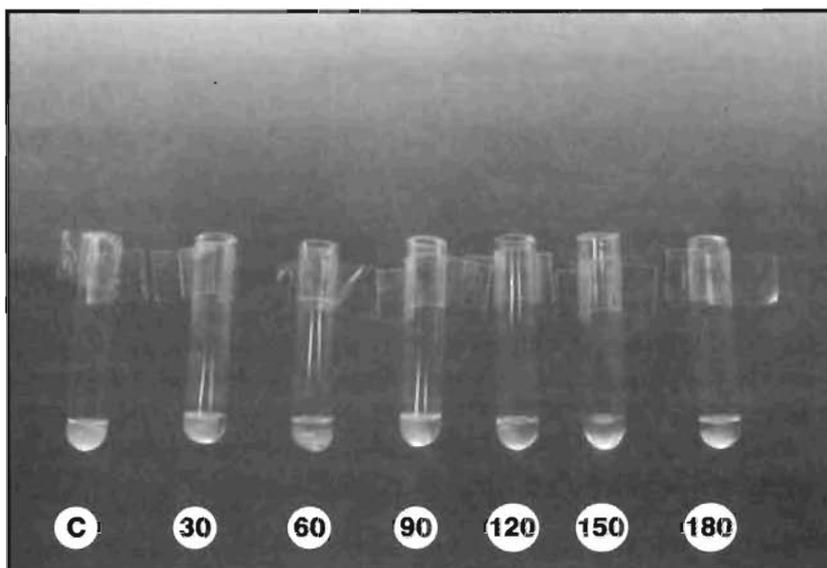


Figura 10. Evaluación de la actividad fibrinolítica por el método de Astrup y Mulertz.

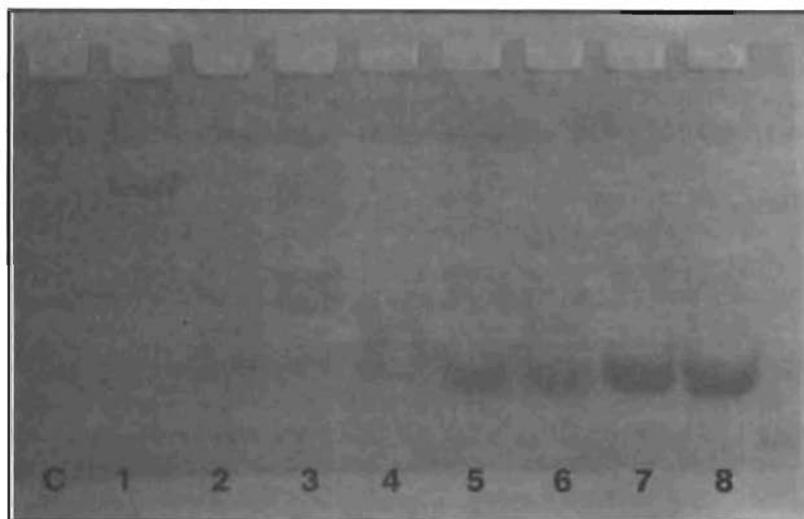


Figura 11. Actividad proteolítica sobre otras proteínas. En los carriles 1, 3, 5 y 7 se muestran los controles de albúmina, caseína, hemoglobina y mioglobina respectivamente. Los carriles 2, 4, 6 y 8 corresponden a la actividad de la enzima sobre caseína, hemoglobina y mioglobina respectivamente, mientras que (c) es el control de la enzima.

condiciones en las que se ha determinado, indica que es de acción directa al igual que otras fibrinogenasas como la *Bitis gabonica* (Forbes *et al.*, 1969) y la de *A. c. contortrix* (Herzig *et al.*, 1970). Otras proteasas que también digieren coágulos de fibrina actúan de un modo indirecto, vía conversión de

plasminógeno en plasmina tal como se ha reportado en los venenos de *Crotalus atrox* y *C. adamanteus* (Budzynsky *et al.*, 1984; Budzynsky *et al.*, 1988). Este modo de acción indirecto, en el caso de la enzima en estudio, no ha sido verificado.

Por otro lado, la fuerte actividad de la enzima sobre albúmina indicarían que esta proteasa no es totalmente específica en su acción sobre fibrinógeno y/o fibrina, por lo que durante el envenenamiento esta proteasa tendría una participación muy activa. Sin embargo, su acción proteolítica sobre albúmina constituiría una desventaja desde el punto de vista de la posibilidad de su aplicación como agente trombolítico.

AGRADECIMIENTO

Los autores agradecen a la IFS de Suecia por su apoyo financiero para esta investigación.

LITERATURA CITADA

- Andrews, P. 1964. The gel filtration behaviour of proteins related to their molecular weights over a wide range. *Biochem. J.* 5 (96): 595.
- Astrup, T. and Mullertz, S. 1952. The fibrin plate method for estimating of fibrinolytic activity. *Archs Biochem. Biophys.* 40: 346.
- Budzynski, A., Pandya, B., Rubin, R., Brizuela, B., Soszka, T. and Steward, G. 1984. Fibrinogenolytic afibrinogenemia after envenomation by Western diamondback rattlesnake (*Crotalus atrox*). *Blood* 63: 1
- Budzynski, A., Kirshbaum, N. and Reczkowski, R. 1988. Secretion of cellular plasminogen activators upon stimulation of Crotalinae snake venoms. In: *Hemostasis and Animal Venoms*. Pirkle and Markland (eds.). Marcell Dekker. New York. p. 191.
- Doolittle, R. 1981. Fibrinogen and fibrin. *Sci. Am.* 245: 126.
- Escobar, E., Rodríguez, E. and Yarlequé, A. 1992. Isolation and partial characterization of a fibrinogenase from the venom of the peruvian bushmaster snake *Lachesis muta*. Recent advances in toxinology research. P. Gopalakrishnakone and C. K. Tan (eds.). Vol. I pp. 421-430.
- Escobar, E., Rodríguez, E. y Yarlequé, A. 1996. Purificación y caracterización parcial de una proteasa del veneno de *Bothrops brazili*. Libro de resúmenes V Reunión Científica ICBAR, UNMSM, p. 56.
- Evans, H. 1984. Purification and properties of a fibrinogenase from of venom of *Naja nigricollis*. *Biochim. Biophys. Acta* 802: 49.
- Forbes, C., Turpie, A., Ferguson, J., McNicol, G. and Douglas, A. 1969. Effect of Gabon viper (*Bitis gabonica*) venom on blood coagulation, platelets and the fibrinolytic enzyme system. *J. Clin. Pathol.* 22: 312.
- Gasmi, A., Karoui, M., Benlasfar, Z., Karoui, H., El Ayeb, M. and Degalli, K. 1991. Purification and characterization of a fibrinogenase from *Vipera lebetina* (desert adder) venom. *Toxicon* 29 (7): 827-836.
- Goa, K., Henwood, J., Stolz, J., Langley, M. and Clissold, S. 1990. Streptokinase: A revaluation of its therapeutic use in acute myocardial infarction. *Drugs* 39 (5): 693.
- Gutiérrez, J. y Bolaños, R. 1980. El problema de los efectos hemorrágico y mionecrótico por mordedura de serpiente en el Continente Americano. *Bol. Of. Sanit. Pan-am.* 89: 149.
- Gutiérrez, J., Cerdas, D., Arroyo, E., Lomonte, B. y Gene, J. 1982. Patogénesis y neutralización de los efectos locales inducidos por veneno de terciopelo (*Bothrops asper*). *Acta med. Costarric.* 25: 255.
- Herzig, R., Ratnoff, O. and Shainoff, J. 1970. Studies on a procoagulant fraction of southern copperhead snakes venom: the preferential release of fibrinopeptide B. *J. Lab. Clin. Med.* 76: 451.

- Lowry, O.; Rosebrough, N.; Farr, A. and Randall, R. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265-275.
- Markland, F. 1988. Fibrin (ogen)olytic enzymes from snake venoms. In: Hemostasis and Animal Venoms. Pirkle and Markland (eds.). Marcell Dekker. New York.
- Meneses, G. 1974. Ofidios y ofidismo en el Perú. II. Aspectos ecológicos de la fauna ofídica ponzoñosa. *Inst. Rev. Zoonosis e Invest. Pecuar.* 2 (3-4): 79-84.
- Moran, J. and Geren, C. 1981. Characterization of a fibrinogenase from northern cooperhead (*Agkistrodon contortrix mokasen*) venom. *Biochim. Biophys Acta* 659: 161.
- Ouyang, C. and Huang, T. 1979. a and b-fibrinogenases from *Trimeresurus gramineus* snake venom. *Biochim. Biophys. Acta* 571: 270.
- Ouyang, C., Teng, C. and Chen, Y. 1977. Physicochemical properties of a- and b-fibrinogenases of *Trimeresurus mucrosquamatus* venom. *Biochim. Biophys. Acta* 481: 622.
- Solís, C., Escobar, E. y Yarlequé, A. 1999. Purificación y caracterización de L-aminoácido oxidasa del veneno de la serpiente *Bothrops brazili* "jergón shushupe". *Revista Peruana de Biología* 6 (1): 75-84.
- Takahashi, T. and Ohsaka, A. 1970. Purification and characterization of proteinase in the venom of *Trimeresurus flavoviridis*. Complete separation of the enzymes from hemorrhagic activity. *Biochim. Biophys. Acta* 198 (2): 293-307.
- Tanizaki, M., Zingali, R., Kawasaki, H., Imajoh, S., Yamazaki, S. and Suzuki, K. 1989. Purification and some characteristics of a Zn-metalloproteinase from the venom of *Bothrops jararaca* (Jararaca). *Toxicon* 27 (7): 747.
- Tillet, W. and Garner, R. 1933. The fibrinolytic activity of hemolytic streptococci. *Journal of Experimental Medicine.* 58: 485.
- Warburg, O. and Christian, W. 1941. Isolierung and Kristallisation des Gärungsferments Enolase. *Biochem.* 2, 310: 384-421.
- Weber, K. and Osborn, M. 1969. The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulphate polyacrilamide gel electrophoresis. *J. Biol. Chem.* 244: 4406.
- Zeballos, J., Escobar, E. y Yarlequé, A. 1999. Aislamiento y algunas propiedades de una fosfolipasa del veneno de la serpiente *Bothrops brazili*. *Boletín de la Sociedad Química del Perú.* Vol. LXV N.º 1: 10-20.