

Universidad de Carabobo
Facultad Experimental de Ciencias y Tecnología
Departamento de Biología

**EFFECTO DEL VENENO DE *Scolopendra gigantea* SOBRE FIBRINÓGENO
HUMANO**

Trabajo Especial de Grado presentado por la Br. Anny Marielys Pereira
Sánchez ante la ilustre Universidad de Carabobo para optar por el título
de Licenciado en Biología.

Tutores: Prof. Josmary Brazón (IVIC)

Prof. Eucandis Fuentes (UC)

Naguanagua, Noviembre del 2016.



UNIVERSIDAD DE CARABOBO
FACULTAD EXPERIMENTAL DE CIENCIAS Y TECNOLOGÍA
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA

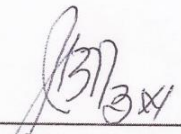


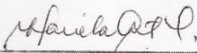
ACTA

Mediante la presente se deja constancia que el (la) **Br. Anny Pereira**, Cédula de Identidad N° 20.030.742, presentó ante el Jurado aprobado por el Consejo de Departamento de Biología de la Facultad Experimental de Ciencias y Tecnología (FACYT) de la Universidad de Carabobo, su Trabajo Especial de Grado (T.E.G.), titulado: "Efecto del veneno de *Scolopendra gigantea* sobre fibrinógeno humano", en concordancia con los artículos 16, 17, 18 y 19 de las Normas de Interés Estudiantil. El jurado evaluador consideró que, luego de haber aprobado dicho trabajo el (la) bachiller cumple con los méritos académicos necesarios para obtener el Título de Licenciado en Biología.

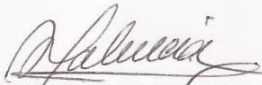
En Valencia, a los 18 días del mes de Noviembre del año 2016.


Prof. Euseandis Fuentes
Tutora


Prof. Josmary Brazón
Tutora


Prof. Lellys M. Contreras
Jurado Principal




Prof. Aura Palencia
Jurado Principal

DEDICATORIA

A mis padres, quienes me dieron las herramientas para llegar hasta donde hoy estoy. Gracias por el apoyo, comprensión e infinito amor que me han dado, a ustedes les debo todo lo que soy y seré. Los amo.

A mi hermano, eres un pilar fundamental en mi vida, siempre has estado para apoyarme, y has creído en mí, por ser quien eres esto también es para ti. Te amo.

AGRADECIMIENTOS

A Dios por darme salud y sabiduría durante este camino.

A la Universidad de Carabobo.

Al Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC).

Al Centro de Estudios Avanzados del IVIC.

A la Doctora Josmary Brazón, del Laboratorio de Neurofarmacología Celular del Centro de Biofísica y Bioquímica del IVIC, por ser una gran tutora y una gran persona, gracias por brindarme su apoyo, por la paciencia al momento de enseñarme y guiarme con sus conocimientos.

A la Licenciada Eucandis Fuentes, por ser una gran tutora, profesora y amiga, gracias por tu apoyo y cariño a lo largo de la carrera.

A la Licenciada Betzabeth Pereira del Laboratorio de Neurofarmacología Celular del Centro de Biofísica y Bioquímica del IVIC, por todo el apoyo en el desarrollo de los experimentos, infinitas gracias por tu disposición y tiempo.

A mis jurados las profesoras Mariela Contreras y Aura Palencia, por sus aportes al trabajo de investigación.

A la Doctora Mercedes López, jefa del Laboratorio de Hemostasia y Genética Vascular y del Centro de Biofísica y Bioquímica del IVIC, infinitas gracias por abrirme las puertas del laboratorio para realizar mis experimentos.

Al Doctor Gustavo Bruges del Laboratorio de Hemostasia y Genética Vascular del Centro de Biofísica y Bioquímica del IVIC, por brindarme sus conocimientos, por las buenas conversaciones y por el cariño durante mi paso por el laboratorio.

Al Licenciado Hiran Hernández y Yoises Carrizales del Laboratorio de Neurofarmacología Celular del Centro de Biofísica y Bioquímica del IVIC, por su ayuda.

A los Licenciados Luis Morán y Whitney Venturini, al Doctor Edgar Quintero, Wilmary Mora del Laboratorio de Hemostasia y Genética Vascular del Centro de Biofísica y Bioquímica del IVIC, gracias por su ayuda, disposición y por el cariño.

A Emil Hurtado y su familia, por abrirnos las puertas de su casa y por la atención durante nuestras estadías. Muchas gracias por recibirnos.

A Franger García del Museo de Zoología, Departamento de Biología, FACYT, de la Universidad de Carabobo por ofrecernos un espacio para el mantenimiento de las escolopendras y por el cariño.

A Yolyver Higuerey y Magaly Ramos de la Unidad de Cultivo de Células y Tejidos del Centro de Biofísica y Bioquímica del IVIC, por recibirme con cariño en su laboratorio para hacer las últimas pruebas de este trabajo de investigación.

A Gabriel Díaz del Laboratorio de Neurofisiología del Centro de Biofísica y Bioquímica del IVIC, gracias por tu amistad, cariño y palabras de aliento cuando las necesite.

A Duitsy Cedeño por ser un amigo y compañero en este largo camino trabajando con “las niñas” las escolopendras.

A mis amigos incondicionales Jessika, David, Paola, Nashira y Tomas gracias por haber sido parte de este gran camino, ahora vamos por más años de amistad pero ahora como profesionales, los adoro.

Y finalmente pero no menos importantes a mi novio y su familia, gracias por todo el amor, apoyo y confianza durante estos años, gracias por hacerme parte de su familia.

ÍNDICE DE CONTENIDO

RESUMEN.....	¡Error! Marcador no definido.
CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. Chilopoda.....	1
1.2. Biología de Scolopendra	1
1.3. <i>Scolopendra gigantea</i>	2
1.4. Composición del veneno de Scolopendra y sus manifestaciones clínicas	3
1.5. Enzimas presentes en el veneno de Scolopendra	4
1.6. Hemostasia	6
1.7. Fibrinógeno	9
1.8. Degradación del fibrinógeno por proteasas que intervienen en la coagulación y la fibrinólisis	10
1.9. Degradación del fibrinógeno por compuestos externos	13
1.10. Antecedentes.....	15
1.11. Planteamiento del problema.....	16
1.12. Justificación.....	17
1.13. Objetivos.....	19
1.13.1. Objetivo General	19
1.13.2. Objetivos Específicos.....	19
CAPÍTULO II. MARCO METODOLÓGICO.....	20

2.1.	Zona de colecta de los ejemplares de <i>Scolopendra gigantea</i>	20
2.2.	Protocolo de cría y lugar de mantenimiento de los animales en cautiverio .	20
2.3.	Extracción del veneno y preparación de la muestra	20
2.4.	Determinación de proteínas totales	21
2.5.	Estimación de las masas moleculares de los componentes que conforman el veneno de <i>S. gigantea</i>	21
2.6.	Actividad amidolítica del veneno de <i>S. gigantea</i>	21
2.7.	Determinación de la actividad coagulante	22
2.8.	Actividad fibrinolítica	23
2.9.	Actividad fibrinogenolítica	23
2.10.	Determinación del porcentaje de degradación del fibrinógeno	24
2.11.	Efecto de inhibidores de proteasas.....	24
2.12.	Actividad coagulante remanente del fibrinógeno pretratado con veneno...	25
2.13.	Adhesión de plaquetas a fibrinógeno tratado con veneno de <i>S. gigantea</i> ...	25
2.14.	Fraccionamiento del veneno de <i>Scolopendra gigantea</i>	26
2.15.	Análisis estadístico	27
CAPÍTULO III. RESULTADOS		28
3.1.	Estimación de las masas moleculares de los componentes que conforman el veneno de <i>S. gigantea</i>	28
3.2.	Actividad amidolítica del veneno de <i>S. gigantea</i>	28

3.3.	Determinación de la actividad coagulante	28
3.4.	Actividad fibrinolítica	28
3.5.	Actividad fibrinogenolítica	30
3.6.	Efecto de inhibidores de proteasas	36
3.7.	Actividad coagulante remanente del fibrinógeno pretratado con veneno... 36	
3.8.	Adhesión de plaquetas a fibrinógeno tratado con veneno de <i>S. gigantea</i> ... 36	
3.9.	Fraccionamiento del veneno crudo de <i>Scolopendra gigantea</i> 37	
CAPÍTULO IV. DISCUSIÓN.....		43
CAPÍTULO V. CONCLUSIONES		49
BIBLIOGRAFÍA		50

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Ejemplar de <i>Scolopendra gigantea</i>	3
Figura 2. Modelo celular de la coagulación	8
Figura 3. Sistema fibrinolítico	8
Figura 4. Estructura del fibrinógeno	10
Figura 5. Degradación del fibrinógeno por trombina.	12
Figura 6. Acción de plasmina sobre el fibrinógeno.	13
Figura 7. Perfil proteico del veneno de <i>S. gigantea</i> empleando gel en gradiente al 4-20% bajo condiciones no reductoras	29
Figura 8. Curva de movilidad relativa	29
Figura 9. Actividad fibrinolítica del veneno de <i>S. gigantea</i>	30
Figura 10. Efecto del veneno de <i>S. gigantea</i> sobre el fibrinógeno (Fg) a diferentes relaciones.....	31
Figura 11. Efecto del tiempo de incubación sobre la actividad fibrinogenolítica del veneno de <i>S. gigantea</i>	33
Figura 12. Efecto de la temperatura sobre la actividad fibrinogenolítica del veneno de <i>S. gigantea</i>	34
Figura 13. Efecto del pH sobre la actividad fibrinogenolítica del veneno de <i>S. gigantea</i>	35
Figura 14. Efecto de inhibidores de proteasas sobre la actividad fibrinogenolítica del veneno de <i>S. gigantea</i>	38
Figura 15. Actividad coagulante remanente del fibrinógeno pretratado con veneno a diferentes tiempos de incubación.....	39
Figura 16. Adhesión plaquetaria (determinada por el método de la fosfatasa ácida) a fibrinógeno preincubado con veneno de <i>S. gigantea</i>	40

Figura 17. Cromatograma del veneno de <i>Scolopendra gigantea</i>	41
Figura 18 Actividad fibrinogenolítica de la fracción F4 obtenida a partir de veneno de <i>S. gigantea</i>	42
Figura 19. Electroforesis en gel en gradiente de 4-20% de la fracción F4 obtenida luego del fraccionamiento por cromatografía de exclusión molecular	42

INDICE DE TABLAS

Tabla I. Separación del veneno crudo de <i>Scolopendra gigantea</i> por Sephadex G-100 con los volúmenes y tiempos de retención de cada fracción obtenida.	41
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS

Fg: fibrinógeno (FI=Factor I)
Fb: fibrina (Factor Ia)
FT: factor tisular
FII: protrombina
FIIa: trombina
FV: factor V
FVII: factor VII
FVIII: factor VIII
FIX: factor IX
FX: factor X
FXI: factor XI
FXII: factor XII
FXIII: factor XIII
FvW: factor von Willebrand
t-PA: activador tisular de plasminógeno
u-PA: uroquinasa o activador de plasminógeno tipo uroquinasa
PMSF: Fluoruro de fenilmetilsulfonilo
EDTA: ácido etilendiamino tetraacético
Fenant: 1,10 fenantrolina
AYA: ácido iodoacético
Pept: Peptatina
PRP: plasma rico en plaquetas

RESUMEN

EFFECTO DEL VENENO DE *Scolopendra gigantea* SOBRE FIBRINÓGENO HUMANO

Los reportes de envenenamiento por ciempiés son escasos, sin embargo constituyen un problema de salud pública debido al incremento en el número de casos en los últimos años. El veneno de los ciempiés puede inducir hemorragias, por lo que en este trabajo se evaluó el efecto del veneno de *S. gigantea* sobre el fibrinógeno (Fg), a través de diversas pruebas que incluyen actividad proteolítica a diferentes concentraciones, temperatura y pH, donde se determinó que el veneno degradó la molécula del Fg (48,2%) y las cadenas A α (92,9%), sin efecto aparente sobre las cadenas B β y γ , a la relación 30 μ g veneno/30 μ g Fg. La temperatura, el pH y el tiempo de incubación óptimos fueron 37°C, pH 7 y 12 horas, respectivamente. Además, la actividad fibrinogenolítica del veneno fue evaluada en presencia de diferentes inhibidores de proteasas, determinándose que la(s) proteasa(s) que degrada(n) al Fg es(son) de tipo metaloproteasa(s). Empleando el tiempo trombina-Tris, se evaluó la actividad coagulante remanente del Fg pretratado con veneno, observándose un alargamiento en el tiempo de coagulación de este respecto al Fg sin tratar (control). El veneno incrementa la adhesión plaquetaria utilizando Fg pretratado con este. Se observó que el veneno no degrada fibrina, no tiene actividad semejante a calicreína, trombina, uroquinasa y plasmina, ni es capaz de inhibir la actividad amidolítica de las enzimas antes mencionadas. Al fraccionar por cromatografía de exclusión molecular el veneno de *S. gigantea*, se obtuvieron 4 fracciones de las cuales F3 y F4 mostraron actividad fibrinogenolítica, siendo F4 la más activa. Los componentes de F4 presentan pesos moleculares entre 6,7 y 20,2 kDa. En conclusión, el veneno presenta α -fibrinogenasas, de tipo metaloproteasas, con peso molecular $\leq 20,2$ kDa, que pueden ser utilizadas como posibles agentes terapéuticos en pacientes con enfermedades trombóticas.

Palabras clave: Veneno de *Scolopendra gigantea*, Actividad fibrinogenolítica, actividad coagulante, adhesión plaquetaria

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

1.1. Chilopoda

Son un grupo de artrópodos depredadores, de hábitos nocturnos, en su mayoría de cuerpo blando, y poseen de 15 a 191 pares de patas de acuerdo al orden al cual pertenecen. La clase Chilopoda se divide en cinco órdenes: Scutigermorpha, Lithobiomorpha, Craterostigmomorpha, Scolopendromorpha y Geophilomorpha, los cuales agrupan aproximadamente 3300 especies. El orden Scolopendromorpha contiene las especies con mayor talla y con especialización de su sistema bucal, proveyendo la formación de glándulas venenosas acopladas a sus forcípulas y el género más representativo de este orden es *Scolopendra* (Giribet *et al.*, 1999; Edgecombe & Giribet, 2007; Undheim & King, 2011).

1.2. Biología de *Scolopendra*

Los ciempiés pertenecientes al género *Scolopendra* poseen gran rapidez y están considerados como depredadores tope. Tiene un cuerpo dividido en cabeza y tronco que puede medir entre 10 y 30 cm de longitud, la cabeza consiste de una placa cefálica con dos antenas y cuatro ocelos de cada lado y esconde tres pares de piezas bucales con un par de antenas compuestas con 17 segmentos y un cuerpo segmentado con 21 pares de patas iguales, excepto los dos últimos pares de patas y el par detrás de la cabeza que esta modificado y son llamadas forcípulas. En la parte ventral se encuentran el clipeo, las pleuritas cefálicas, el labro, un par de mandíbulas, un par de primeras maxilas y un par de segundas maxilas (Monzón-Muñoz & Blasco-Gil, 1997; Edgecombe & Giribet, 2007; Undheim *et al.*, 2015; Undheim *et al.*, 2016).

Estos animales tienen hábitos terrestres y típicamente solitarios, excepto cuando están empollando sus huevos o crías. Viven en microhábitats caracterizados por la presencia de escombros, áreas de elevada humedad como la tierra suelta, leños podridos, bajo piedras, entre hojas y recortes de monte. Son carnívoros en su

mayoría, alimentándose de pequeños invertebrados o de pequeños mamíferos. La presa es inmovilizada por el veneno inyectado desde las glándulas venenosas, que se encuentran en el primer par de patas modificadas (Monzón-Muñoz & Blasco-Gil, 1997; Yildiz *et al.*, 2006; Edgecombe & Giribet, 2007). Este género agrupa la especie objeto de estudio en este trabajo *Scolopendra gigantea* y aproximadamente 700 especies más (Jarrar, 2010).

1.3. *Scolopendra gigantea*

El ciempiés *Scolopendra gigantea* es de color marrón-negruzco, marrón-verdoso o marrón-rojizo (Figura 1). Es el de mayor tamaño, con un tronco aplanado alcanzando hasta 30 cm de longitud. Debido a la gran talla que presenta esta especie suele considerarse como un animal potencialmente peligroso (González *et al.*, 2000).

En Venezuela se ha reportado que ejemplares de *S. gigantea* suelen encontrarse en zonas aledañas al piedemonte de la Cordillera de la Costa, por lo cual su distribución es amplia a lo largo de este complejo montañoso (González *et al.*, 2000). También se pueden encontrar en zonas xerófilas del estado Nueva Esparta, Falcón, reportadas en cavernas asociadas a grandes grupos de quirópteros, en el zoológico de Paraguaná y en la bahía de Adícora, ambas locaciones ubicadas en la península de Paraguaná (Molinari *et al.*, 2005; Cazorla *et al.*, 2012; Granado, 2014).

De acuerdo a lo reportado por Molinari *et al.* (2005), en La Cueva del Guano de la Península de Paraguaná en Venezuela, *Scolopendra gigantea* es un gran depredador de tres especies de murciélagos (*Mormoops megalophylla*, *Pteronotos davii* y *Leptonycteria curasoae*), acercándose hasta las zonas donde se encuentran los murciélagos y atacándolos tan rápidamente que no pueden huir de su depredador. Estos artrópodos se mueven rápido, muestran un comportamiento agresivo y pueden parecer aterradores para los humanos (González *et al.*, 2000).



Figura 1. Ejemplar de *Scolopendra gigantea*. Hembra de 25 cm de longitud colectada en Parque Zoológico de Paraguaná Gustavo Rivera, (Foto tomada por la autora)

1.4. Composición del veneno de *Scolopendra* y sus manifestaciones clínicas

El veneno de los individuos del género *Scolopendra* es un líquido, homogéneo, transparente y de pH ácido, constituido básicamente por dos partes, una proteica y una no proteica. Este veneno presenta variación en composición de acuerdo a cada especie, aunque contiene componentes que son comunes para todas las especies tales como histamina, serotonina, acetilcolina, lípidos, polisacáridos, lipoproteínas aminoácidos libres, varias enzimas como hialuronidasas y esterases (Mohamed *et al.*, 1983; Monzón-Muñoz y Blasco-Gil, 1997; Muñoz *et al.*, 2005; Yildiz *et al.*, 2006; Parrilla-Álvarez *et al.*, 2008; Jarrar, 2010). Las masas moleculares de los componentes proteicos se encuentran entre 6 y más de 200 kDa (Parrilla-Álvarez *et al.*, 2008; Granado, 2014)

Los ciempiés del género *Scolopendra* tales como *S. polymorpha* y *S. subspinipes* en cada ordeño producen un promedio de 1,1 y 5 μ L de veneno, respectivamente (Cooper *et al.*, 2014), mientras que *S. gigantea* produce en promedio 15 μ L, siendo mayor la cantidad de veneno producido por este último. Sin embargo, aún se desconoce cuáles son las implicaciones de esta mayor producción de veneno (González *et al.*, 2000).

El veneno de especies del género *Scolopendra* contiene componentes activos sobre mamíferos (ratones) (González *et al.*, 2000), crustáceos (Gutiérrez *et al.*, 2003), bacterias (Wenhua *et al.*, 2006, Peng *et al.*, 2010; Kong *et al.*, 2013a), hongos (Wenhua *et al.*, 2006) e insectos (Rates *et al.*, 2007; Yang *et al.*, 2012), de ahí el interés que despiertan como posible fuente de nuevos medicamentos o como herramientas para el estudio de los procesos patológicos que desarrollan las personas envenenadas con estos ciempiés.

Entre las manifestaciones clínicas producidas como consecuencia del emponzoñamiento de *Scolopendra* se encuentran: dolor intenso, prurito e hinchazón del tejido local, dolor de cabeza, náuseas, vómitos, ansiedad, palpitaciones, eritema, necrosis, inflamación de los ganglios linfáticos, isquemia, rabdomiólisis, a veces hemorragias y en personas inmunosuprimidas puede causar la muerte (Rodríguez-Acosta *et al.*, 2000a, 2000b; González *et al.*, 2000; Bush *et al.*, 2001; Ozsarac *et al.*, 2001; Serinken *et al.*, 2005; Yildiz *et al.*, 2006; Malta *et al.*, 2008; Mavridis *et al.*, 2016; Kimura *et al.*, 2013).

1.5. Enzimas presentes en el veneno de *Scolopendra*

Estudios sobre el veneno de las escolopendras muestran que estos contienen una variedad de enzimas con diferentes actividades, siendo la más reportada: actividad serinoproteasa lo que sugiere que el veneno podría llevar a cabo catálisis nucleofílicas, y participar en procesos degenerativos (Fuster-Lluch *et al.*, 2004). Del veneno de *S. subspinipes mutilans*, fue aislada una serinoproteasa con peso molecular de 25 kDa que tiene actividad fibrinolítica (You *et al.*, 2004). Luego, en el año 2013, Guo *et al.*, de este mismo veneno identificaron otra serinoproteasa, llamada Ssmase, con masa molecular 28,7 kDa por espectrometría de masas (MS). Mientras que Granado (2014), en su investigación sobre el contenido proteico del veneno de *S. gigantea*, determinó actividad serinoproteasa en componentes con masas moleculares entre 116 y 250 kDa.

También, el veneno de estos ciempiés contiene componentes con actividad metaloproteasa, los cuales han sido reportados por Malta *et al.* (2008) del veneno de *S. viridicornis* y *O. padroi*, cuyas proteasas tienen masas moleculares entre 40 y 66 kDa, las cuales son capaces de degradar proteínas de la matriz extracelular y llevar a cabo diferentes funciones biológicas que incluyen organogénesis, cicatrización, involución uterina, inflamación, enfermedades autoinmunes y carcinogénesis (Coronato *et al.*, 2012). Granado (2014), también reporta actividad metaloproteasa en el veneno de *S. gigantea*, en componentes con masas moleculares entre 22 y 51 kDa.

Además, el veneno de las escolopendras contiene componentes con actividad hialuronidasa, capaces de hidrolizar el mucopolisacárido ácido hialurónico rompiendo la unión glucosaminídica entre el carbono 1 de la fracción glucosamina y el carbono 4 del ácido hialurónico. Esta enzima acelera la diseminación subcutánea de sustancias particuladas y en soluciones, debido a la despolimerización del ácido hialurónico. Este tipo de enzima fue aislada del veneno de *S. viridis*, la cual presenta una masa molecular de 50 kDa (Muñoz *et al.*, 2005). El veneno de *S. viridicornis* mostró una fuerte actividad hialuronidasa, aún se desconoce las características bioquímicas de estos componentes (Malta *et al.*, 2008). En el 2014, González-Morales *et al.* aislaron dos proteínas con masas moleculares alrededor de 37 y 42 kDa, con actividad hialuronidasa.

Otra de las actividades enzimáticas presentes en el veneno de estos animales es la tipo fosfolipasa, observándose que el veneno de *S. gigantea* puede contener fosfolipasa A2, enzima que hidroliza glicerofosfolípidos en la posición sn-2 del esqueleto de glicerol, liberando lisofosfolípidos y ácidos grasos. Estas fosfolipasas son las más estudiadas debido a su papel fundamental en diversas funciones biológicas incluyendo entre esta su acción anti-inflamatoria (Granado, 2014). Malta *et al.* (2008) identificaron en el veneno de *S. viridicornis* y *O. pradoi* la presencia de componentes con actividad fosfolipasa. Del veneno de *S. viridis* se purificó un compuesto de 13,75 kDa, la cual fue denominada Scol/Pla, con actividad fosfolipasa (González-Morales *et al.*, 2009).

Peng *et al.* en el 2010 del veneno de *S. subspinipes mutilans* aislaron y caracterizaron dos péptidos denominados scolopin 1 y 2, los cuales mostraron actividad hemolítica moderada contra eritrocitos humanos y de conejo. Mientras que, una intensa actividad hemolítica directa sobre los eritrocitos humanos, fue obtenida luego de estudiar el veneno de *S. viridicornis* y *O. pradoi* (Malta *et al.*, 2008). El veneno de *S. gigantea* presenta componentes con actividad hemolítica evaluada sobre sangre humana (Granado, 2014). Los autores de estos trabajos sugieren que esta actividad hemolítica observada en los venenos de *S. subspinipes mutilans*, *S. viridicornis*, *O. pradoi* y *S. gigantea* pueden ser debida a la presencia de enzimas tipo fosfolipasas.

Hasta el presente son pocas las enzimas con actividad sobre el sistema hemostático descritas en el veneno de los ciempiés, entre los venenos estudiados se encuentran los de *Otostigmus pradoi*, *Scolopendra viridicornis*, *S. subspinipes mutilans* y *S. subspinipes dehaani* (Malta *et al.*, 2008; Peng *et al.*, 2010; Liu *et al.*, 2012).

1.6. Hemostasia

La hemostasia es el proceso fisiológico responsable de evitar la pérdida de sangre cuando se produce una lesión en el sistema vascular, además garantiza que el oxígeno y los nutrientes lleguen a los tejidos. Este sistema inicia a los pocos segundos de producirse la lesión vascular y el primer mecanismo para detener la pérdida de sangre es una vasoconstricción local y refleja de la pared vascular, luego ocurre la formación del tapón hemostático plaquetario y en simultaneo se produce la formación del coagulo de fibrina. Este proceso puede ser dividido en las siguientes etapas: 1) Adhesión de la plaqueta al subendotelio vascular dañado, 2) Agregación plaquetaria primaria al activarse el receptor glucoproteico IIb/IIIa y permitir así la unión de las plaquetas, 3) Liberación de compuestos intraplaquetarios que provocan agregación secundaria de nuevas plaquetas al tapón hemostático, 4) Formación del polímero de fibrina o tapón hemostático definitivo (Menéndez *et al.*, 2011; Rondón, 1992; Flores-Rivera *et al.*, 2014; Guerrero & López, 2015).

Una vez que el coágulo formado cumple su función es el sistema fibrinolítico el encargado de su remoción. En situaciones donde se altera el sistema vascular, plaquetas, sistema de la coagulación y/o fibrinolítico, el equilibrio hemostático se compromete, lo que puede desencadenar episodios hemorrágicos o trombóticos (Palomo *et al.*, 2005; Kenneth, 2010; Levy *et al.*, 2012).

La coagulación consiste de tres etapas que conllevaran a la formación de fibrina a partir del fibrinógeno plasmático. En dicho proceso intervienen varias proteínas procoagulantes (factores de coagulación) y proteínas anticoagulantes (las más importantes son antitrombina III, proteína C y proteína S) que regulan y modulan el proceso de coagulación evitando una coagulación generalizada (Menéndez *et al.*, 2011). Las etapas del sistema de la coagulación (Figura 2) son: iniciación, ocurre en la superficie de las células que expresan factor tisular (FT) se forma el complejo factor Xa/factor Va (FXa/FVa) generando pequeñas cantidades de trombina (IIa). En la etapa de amplificación, las plaquetas activadas estimulan la liberación del factor V para que en la etapa de propagación se genere grandes cantidades de trombina que transforman el fibrinógeno en fibrina (Menéndez *et al.*, 2011; Flores-Rivera *et al.*, 2014; Guerrero & López, 2015). Este trabajo se concentrará en el fibrinógeno que es el substrato central del sistema de la coagulación y objeto de estudio en esta investigación.

El coágulo de fibrina tiene un papel esencial en la hemostasia, como producto primario de la cascada de coagulación y como substrato de la fibrinólisis (Flores-Rivera *et al.*, 2014). El sistema fibrinolítico (Figura 3) se activa una vez que la pared vascular se ha reconstituido, y ya no se requiere la presencia del coágulo. Entonces, ocurre la conversión de la proteína plasmática inactiva, plasminógeno, en su forma activa, plasmina, la cual produce finalmente la lisis de la fibrina. La activación de dicha proteína es realizada por los activadores del plasminógeno (Weisel, 2005; Menéndez *et al.*, 2011; Flores-Rivera *et al.*, 2014).

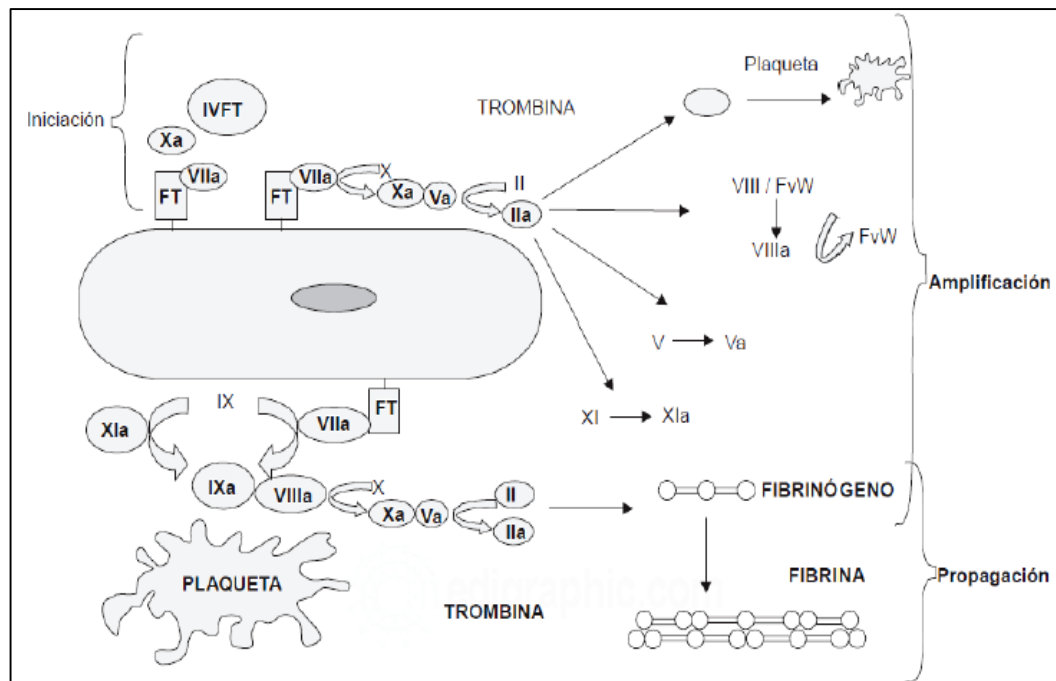


Figura 2. Modelo celular de la coagulación (Menéndez *et al.*, 2011).

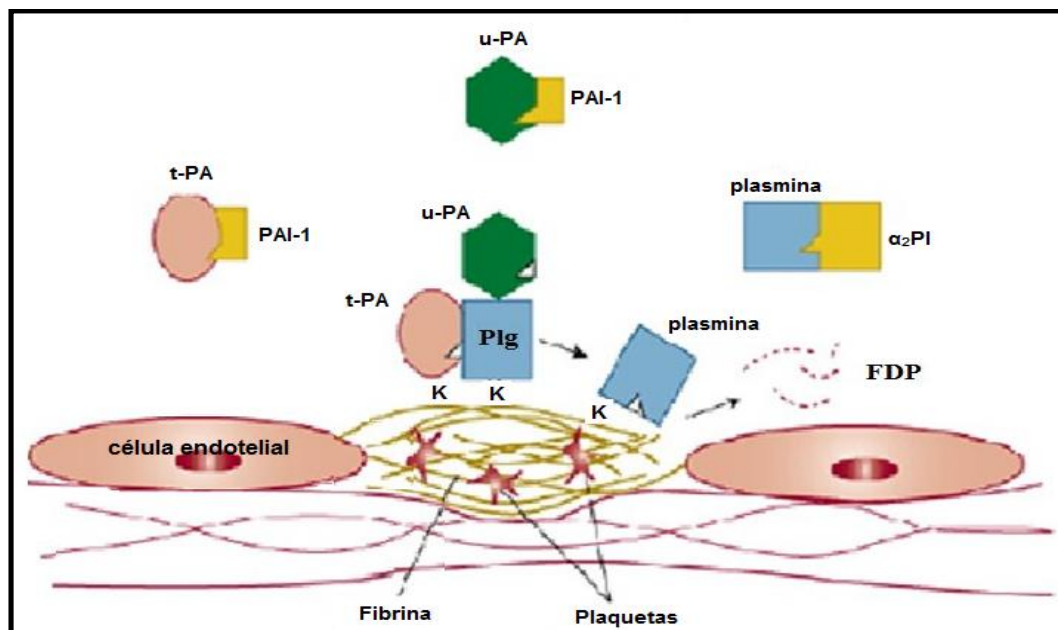


Figura 3. Sistema fibrinolítico (Tomado de Hernández, 2015 modificado por la autora).

1.7. Fibrinógeno

El fibrinógeno es una glucoproteína con masa molecular de 340 kDa en humano, sintetizada en el hígado, se encuentra en el plasma a una concentración de 250 a 400 mg/dl y tiene un tiempo de vida media de aproximadamente 4 días. La molécula consiste de tres pares de cadenas polipeptídicas llamadas A α (66,5 kDa), B β (52 kDa) y γ (46,5 kDa), compuestas de 610, 461 y 411 aminoácidos respectivamente, que se enrollan para formar una hélice alfa unida por 29 enlaces disulfuros. La estructura terciaria del fibrinógeno está representada por tres dominios: un nódulo central o dominio E, constituido por los extremos N-terminales de las cadenas y dos nódulos laterales o dominios D, formados por los extremos C-terminales (Figura 4) (Palomo *et al.*, 2005; Weisel, 2005; Canseco-Ávila *et al.*, 2006; Guerrero y López, 2015).

El fibrinógeno no solo cumple la función precursora para la formación de fibrina, fisiológicamente participa en la adhesión y agregación plaquetaria enlazándose a receptores glucoprotéicos presentes en las superficies plaquetarias, actuando como una molécula de unión. En la angiogénesis, se une a componentes de la matriz extracelular tales como fibronectina, glucoaminoglucanos, péptidos de factores de crecimiento, entre otros (Kenneth, 2010). También se ha descrito que el fibrinógeno en diversas células epiteliales como células de carcinoma cervical, trofoblastos, granulocitos, es utilizado para reparar el tejido que ha sufrido lesiones y en los estados inflamatorios actúa como mediador de la interacción célula-matriz, aumentando su concentración (Tennent *et al.*, 2007).

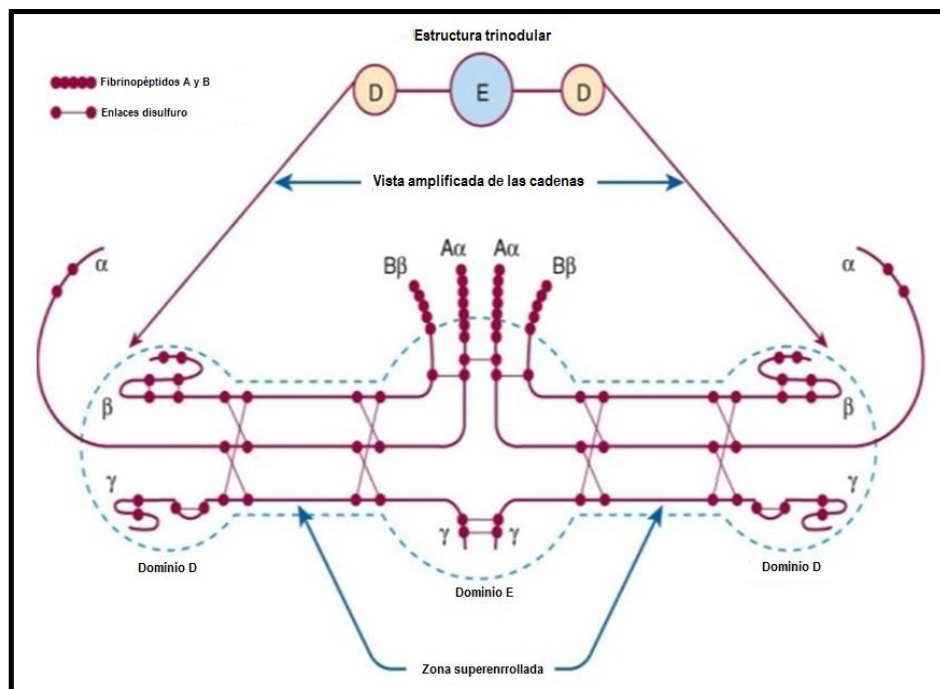


Figura 4. Estructura del fibrinógeno (Tomado de Hernández, 2015 modificado por la autora).

1.8. Degradación del fibrinógeno por proteasas que intervienen en la coagulación y la fibrinólisis

Fisiológicamente el fibrinógeno se coagula para generar fibrina mediante la acción de la enzima proteolítica trombina, una serinoproteasa, de 33,7 kDa, conformada por dos cadenas polipeptídicas A y B de 36 y 259 residuos respectivamente, unidos por un enlace disulfuro. En la cadena B se encuentra el sitio catalítico o funcional de la enzima (residuos His, Asp y Ser), típico de las serinoproteasas. La degradación de fibrinógeno por esta enzima puede ser desglosada en tres etapas (Figura 5). La primera etapa, ocurre cuando la trombina escinde los enlaces Arg16-Gly17 en las cadenas A α y Arg14-Gly15 en las B β , liberando dos fibrinopéptidos, a los cuales se les denomina FpA (16 aminoácidos del extremo aminoterminal de las cadenas A α) y FpB (14 aminoácidos del extremo aminoterminal de las cadenas B β) (Marchi, 2012; Hernández, 2015).

La segunda etapa, inicia simultánea a la remoción de FpA y FpB, el cual deja expuestos en los dominios E centrales, los sitios de unión que favorecen la formación de monómeros de fibrina que se asocian entre sí, mediante interacciones no covalente tipo puentes de hidrógenos, formando así la malla de fibrina o protofibrilla. La tercera etapa, se da por el crecimiento lateral y longitudinal de la malla al producirse interacciones en las regiones D-D de una protofibrilla y otra, para luego ser estabilizada por una transglutaminasa o Factor XIII activado, la cual une de forma covalente las cadenas γ y α desde el momento en que se liberan los monómeros y comienzan a formarse las protofibrillas y durante todo el proceso de polimerización, otorgando resistencia a las rupturas mecánicas y a la acción de la plasmina conformando así, el polímero entrecruzado de fibrina insoluble (Levy *et al.*, 2012; Marchi, 2012; Hernández, 2015).

También, el fibrinógeno puede sufrir degradación proteolítica por la serinoproteasa plasmina, dando lugar a la formación de productos de diferentes pesos moleculares que pierden su función coagulante y no forman monómeros de fibrina o interrumpen la polimerización normal del coágulo definitivo (Marchi, 2012). La plasmina, es la enzima central del sistema fibrinolítico (Figura 3), la cual circula en sangre en su forma inactiva denominada plasminógeno, es una glucoproteína de una sola cadena sintetizada en el hígado con una concentración plasmática de 20 mg/dL, peso molecular en humano de 92 kDa y un tiempo de vida media de 2,2 días. La transformación de plasminógeno a plasmina, es mediada por t-PA (activador de plasminógeno tipo tisular) o u-PA (activador tipo uroquinasa) al cortar el enlace Arg561-Val562 en el plasminógeno (Palomo *et al.*, 2005; Hernández, 2015).

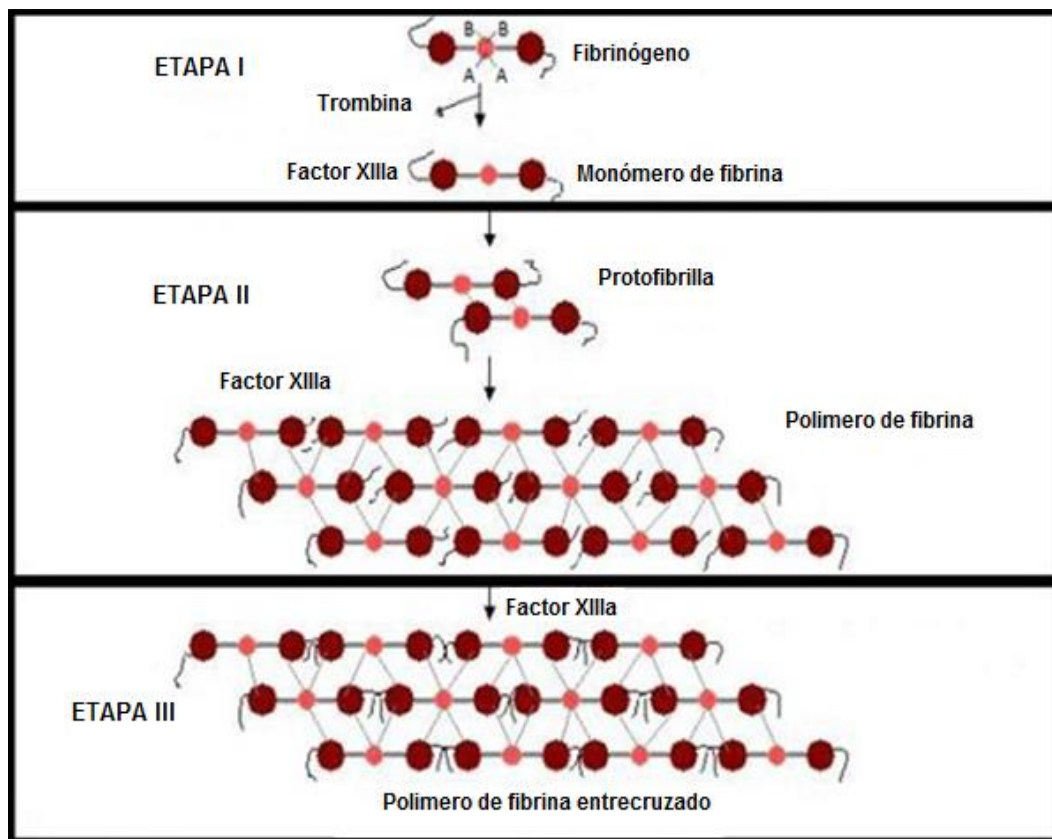


Figura 5. Degradación del fibrinógeno por trombina (Tomado de Hernández, 2015 modificado por la autora).

Cuando la plasmina degrada al fibrinógeno libera fracciones de los extremos C terminal y N terminal de las cadenas $A\alpha$ en los dominios D y simultáneamente escinde las regiones N terminales de las cadenas $B\beta$ obteniendo el fragmento X, luego la liberación del extremo C terminal de las cadenas $B\beta$ permitiendo la eliminación de las tres cadenas que unen el dominio D y E, dejando un dominio D libre y un binódulo E-D, denominado fragmento Y, el cual puede ser escindido de nuevo dejando los fragmentos D y E separados (Figura 6). Estos fragmentos interrumpen la polimerización de fibrina, por lo que se podría producir una hemorragia ya que los fragmentos X, Y, D y E actúan aboliendo la polimerización completa ya que si bien son reconocidos por trombina y podrían ser agregados a las protofibrillas, a estos fragmentos no se les puede seguir uniendo otras protofibrillas

por estar incompleta su estructura. Estos productos de degradación de fibrinógeno son metabolizados por el hígado y secretados por los riñones (Palomo *et al.*, 2005; Hernández, 2015).

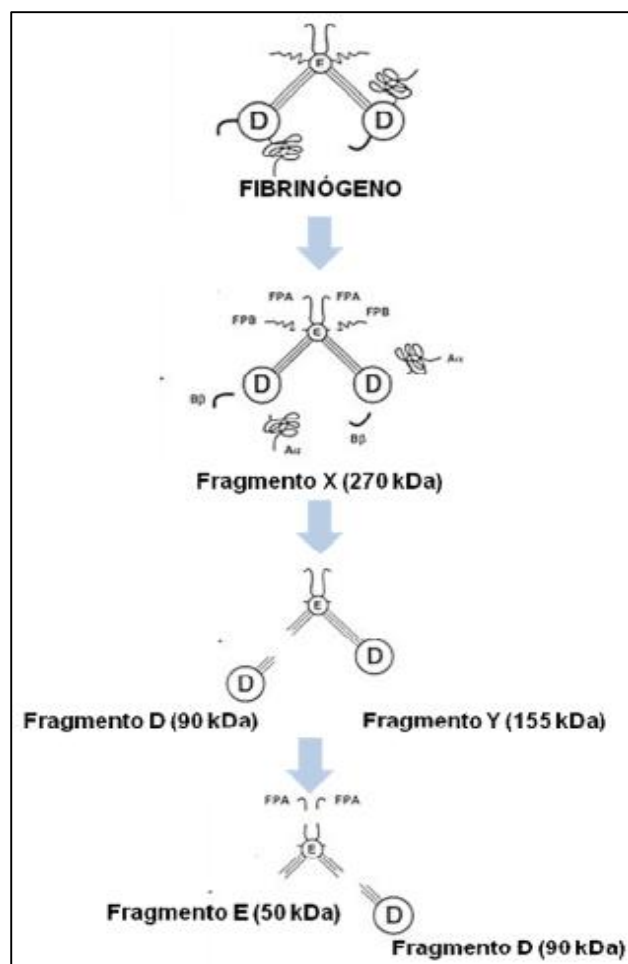


Figura 6. Acción de plasmina sobre el fibrinógeno (Tomado de Pereira, 2011).

1.9. Degradación del fibrinógeno por compuestos externos

Se han aislado compuestos de algas, plantas terrestres, bacterias, hongos, vertebrados e invertebrados, con capacidad de degradar tanto a la molécula como a las cadenas del fibrinógeno (Azañero *et al.*, 2000; Pinto *et al.*, 2004; Lee *et al.*, 2005; Choi *et al.*, 2014; Brazón *et al.*, 2014; Kang *et al.*, 2016), estos componentes han sido

denominados fibrinogenasas, estas enzimas tienen acción distinta a las proteasas fisiológicas, plasmina y trombina, generando fragmentos incoagulables (Markland, 1998). Estos compuestos han sido estudiados bioquímica y farmacológicamente a fin de establecer sus mecanismos de acción. Dichos componentes pueden presentar similitud en su composición y/o masa molecular (Hernández, 2015).

Las fibrinogenasas, han sido clasificadas de acuerdo a las cadenas de fibrinógeno que degradan. Las α -fibrinogenasa, en general son metaloproteasas con masas moleculares entre 21 y 58 kDa, que degradan preferencialmente las cadenas A α del fibrinógeno y pueden actuar sobre las cadenas B β y/o γ si se incrementa el tiempo de incubación. Las β -fibrinogenasa, son serinoproteasas en su mayoría, con masas moleculares entre 23 y 33 kDa, que degradan principalmente las cadenas B β y más lentamente pueden degradar las cadenas A α y/o γ . Hasta el presente no se han aislado enzimas fibrinogenolíticas capaces de degradar en primer lugar las cadenas γ del fibrinógeno. Además, algunas fibrinogenasas poseen actividad fibrinolítica y/o hemorrágica (Markland, 1998; Swenson & Markland, 2005).

Del alga verde *Ulva pertusa*, se aisló una serinoproteasa denominada ulveasa, que degrada fibrinógeno y fibrina. Además, tiene actividad activadora de plasminógeno. Siendo su actividad fibrino(geno)lítica óptima a 40 °C y pH 7,0, degradando principalmente las cadenas A α y luego las B β sin efecto sobre las γ (Kang *et al.*, 2016).

Choi *et al.* aislaron y caracterizaron parcialmente a partir de un extracto acuoso de hojas de la planta *Aster yomena* (Kitam) una fibrinogenasa que denominaron kitamasa con masa molecular de 50 kDa, que degrada las cadenas A α y γ del fibrinógeno y la fibrina, sin efecto sobre las B β . Siendo la temperatura óptima de incubación para la proteólisis 50 °C. Kitamasa es inhibida fuertemente por agentes quelantes metálicos y ha sido clasificada como metaloproteasa. Los autores sugieren que este componente tiene potencial como agente terapéutico contra la trombosis (Choi *et al.*, 2014).

De la bacteria *Chryseobacterium sp* se purificó una proteasa de 24 kDa denominada 24k-endorpeptidasa, la cual es capaz de degradar las cadenas A α del fibrinógeno y luego las B β sin acción sobre las cadenas γ (Lijnen, 2000).

Armillaria mellea, un hongo comestible, contiene una fibrinogenasa, tipo metaloproteasa, de 21 kDa, que degrada preferencialmente las cadenas A α del fibrinógeno, luego las B β y finalmente las γ . Esta proteasa trabaja a pH 6,0 y 33 °C (Lee *et al.*, 2005).

Azañero *et al.* (2000), purificaron una enzima proteolítica de la serpiente *Bothrops brazili*, con peso molecular de 22 kDa, y determinaron que la enzima tiene efecto principal sobre las cadenas A α y luego sobre las B β del fibrinógeno sin degradar las γ . La temperatura optima de esta enzima es 45 °C.

De la oruga *Lonomia obliqua*, se purificó una enzima con actividad fibrinolítica y fibrinogenolítica. Esta enzima fue denominada lonofibrase, con un peso molecular de 35 kDa y demostraron que degrada rápidamente las cadenas A α y B β del fibrinógeno, sin alterar las γ (Pinto *et al.*, 2004).

El veneno del escorpión *Tityus discrepans* contiene componentes tipos metaloproteasas y serinoproteasas con actividad α -fibrinogenasas, que alteran al sistema hemostático (Brazón *et al.*, 2014).

1.10. Antecedentes

Los quilópodos pertenecientes al orden Scolopendromorpha han recibido poca atención entre los animales ponzoñosos. Esto se debe posiblemente a que la incidencia de encuentros con humanos no es alta ni reportada como con otros animales venenosos, lo que se evidencia en la limitada cantidad de estudios realizados con ciempiés. Sin embargo, a continuación se presentan una serie de trabajos en los que se evalúa la actividad del veneno de escolopendras sobre el sistema hemostático.

El veneno de tres especies de ciempiés brasileños: *Otostigmus pradoi*, *Cryptops iheringi* y *Scolopendra viridicornis* posee componentes con actividad fibrinogenolítica y actividad coagulante (Malta *et al.*, 2008).

Además, el veneno de *S. supspinipes dehaani* contiene componentes con actividad anticoagulante como también componentes capaces de agregar plaquetas humanas (Liu *et al.*, 2012). Por otro lado, el veneno de *S. supspinipes mutilans* presenta un péptido con actividad antitrombótica, que inhibe la agregación plaquetaria y tiene masa molecular de 0,346 kDa (Kong *et al.*, 2013a). De este último veneno, también se purificó un péptido con actividad inhibitoria del Factor Xa de la coagulación, el cual tiene masa molecular de 0,5543 kDa (Kong *et al.*, 2013b).

En el año 2014, Granado evaluó el perfil proteico y la actividad enzimática del veneno de *S. gigantea* y obtuvo bandas con actividad serinoproteasa y bandas con actividad metaloproteasa, además de una elevada actividad hemolítica evaluada de forma directa en eritrocitos humanos.

Lee *et al.*, en el 2016, observaron que el veneno de *Scolopendra subspinipes mutilans*, presenta actividad antitrombótica ya que, el veneno prolongó el tiempo de tromboplastina parcial activada y tiempo de protrombina. Además, presentó actividad inhibitoria de trombina y factor X activado. Este veneno también contiene componentes que inhiben la agregación plaquetaria.

En las últimas décadas, numerosos grupos de investigaciones se han abocado a caracterizar bioquímica y funcionalmente los componentes presentes en el veneno de los ciempiés. En este trabajo, se evaluó el efecto del veneno de *Scolopendra gigantea* sobre proteínas que intervienen en el sistema hemostático.

1.11. Planteamiento del problema

Estudios con invertebrados venenosos, tales como sanguijuelas, garrapatas, orugas, arañas, escorpiones, entre otros, han determinado que poseen componentes capaces

de promover o inhibir la adhesión o la agregación plaquetaria, degradar fibrinógeno y/o fibrina, tener actividad semejante o inhibitoria a proteasas de la coagulación o fibrinólisis (Mory *et al.*, 2000; Pinto *et al.*, 2004; Kazimírová *et al.*, 2002; Guerrero, 2010; Brazón *et al.*, 2014). Estos hallazgos han permitido utilizar algunos componentes aislados de estos animales como potenciales agentes farmacológicos para el tratamiento de enfermedades trombóticas o hemorrágicas.

En nuestro país se han realizado diversos estudios con *S. gigantea*, sobre sus hábitos alimenticios, manifestaciones clínicas en personas envenenadas por este ciempiés, pruebas histopatológicas relacionadas con lesiones de rabdomiólisis y necrosis a nivel muscular, desarrollo de un suero antiescolopéndrico probado en ratones y evaluación del perfil proteico del veneno (Molinari *et al.*, 2005; González *et al.*, 2000; Parrilla-Álvarez *et al.*, 2008; Granado, 2014). Sin embargo, no existen investigaciones que hayan identificado los componentes que podrían inducir hemorragias en algunos humanos envenenados por *S. gigantea*. Por tal razón, en este trabajo se plantea evaluar si el veneno de *S. gigantea* presenta actividad sobre el sistema hemostático y realizar una separación parcial en base a las masas moleculares de los componentes del veneno, que permita identificar la fracción (es) con la proteína (s) de interés. De manera tal que los resultados obtenidos podrían ser la base para futuros estudios sobre los componentes involucrados en los procesos patológicos producidos por envenenamiento con *S. gigantea*.

1.12. Justificación

El emponzoñamiento con quilópodos, particularmente del género *Scolopendra*, es uno de los casos de envenenamiento con invertebrados que afectan a gran parte de la región neotropical. Desde un punto de vista de la artropodología sanitaria, los accidentes con quilópodos que se registran con mayor frecuencia y de mayor severidad son los debidos a los taxones pertenecientes al orden Scolopendromorpha, particularmente a las especies del género *Scolopendra*, y poseen uno de los venenos más tóxicos. En Venezuela, se han reportado diversos casos de envenenamiento por

especies del género *Scolopendra*, principalmente en el Estado Falcón (Rodríguez-Acosta *et al.*, 2000a, 2000b; Cazorla *et al.*, 2012).

En comparación con los casos clínicos de envenenamiento, presentados por escorpiones y ofidios, los ciempiés son los que representan un menor índice de mortalidad, sin embargo esto no le ha restado importancia como problema de salud pública. Ya que, según la Dirección de Información Social y Estadística de Venezuela, desde el año 2002 hasta el 2010 se reportaron 51 muertes de individuos por contacto traumático con ciempiés, considerándose un aumento del número de muertes y casos de afecciones por escolopendrismo, que sugiere que esta situación podría estar en auge (DISE, 2003; DISE, 2004; DISE, 2010; DISE, 2011). Pero más preocupante aún, es el hecho de que actualmente no exista un tratamiento específico para las personas afectadas, sino que se realizan tratamientos sintomatológicos enfocados en la disminución del intenso dolor producido e inflamación del área afectada. Esto se debe a que se desconoce la composición específica del veneno, lo que limita tanto el desarrollo de tratamientos adecuados, como el estudio de sus potencialidades farmacológicas.

Debido a que *S. gigantea* es la especie de ciempiés que se encuentra reportada en nuestro país y que en algunos pacientes causa hemorragia, se hace evidente la necesidad de realizar estudios bioquímicos para evaluar la actividad proteolítica de su veneno con el fin de ayudar a entender el mecanismo de acción de los componentes responsables de las diversas manifestaciones clínicas presentadas por las personas con escolopendrismo. Enfocándose este trabajo a identificar componentes presentes en el veneno de *Scolopendra gigantea* que puedan activar y/o inhibir el sistema hemostático.

1.13. Objetivos

1.13.1. Objetivo General

Caracterizar bioquímicamente la actividad fibrinogenolítica del veneno de *Scolopendra gigantea*.

1.13.2. Objetivos Específicos

- Evaluar la actividad fibrinogenolítica del veneno de *Scolopendra gigantea* a distintas concentraciones, tiempo, temperaturas y pH.
- Determinar el tipo de fibrinogenasa.
- Fraccionar el veneno de *Scolopendra gigantea*.
- Determinar cuál(es) fracción(es) del veneno tiene(n) actividad fibrinogenolítica.

CAPÍTULO II

MARCO METODOLÓGICO

2.1. Zona de colecta de los ejemplares de *Scolopendra gigantea*

Los ciempiés se colectaron en los alrededores del Parque Zoológico de Paraguaná Gustavo Rivera (11°39'04.5"N 70°13'21.5"W), en el sector Cardón, Punta Cardón, municipio Carirubana, Estado Falcón. La colecta se realizó siguiendo la metodología descrita por Granado (2014). Los animales colectados fueron depositados en envases plásticos (10 x 30 cm) con las tapas agujereadas para permitir la entrada de oxígeno hasta que fueron llevados a sus terrarios.

2.2. Protocolo de mantenimiento de los animales en cautiverio

Se realizó siguiendo la metodología propuesta por Granado (2014), la cual indica que los ciempiés en cautiverio deben estar bajo condiciones que se asemejan a los parámetros climáticos de las zonas de colecta. Los animales fueron ubicados en el Museo de Zoología, Departamento de Biología, Facultad Experimental de Ciencias y Tecnología (FACYT), Universidad de Carabobo.

2.3. Extracción del veneno y preparación de la muestra

Se colectó el veneno de los ejemplares adultos de *S. gigantea* cada 15 días, siguiendo la metodología descrita por Malta *et al.* (2008) con modificaciones de Granado (2014). Se indujo estrés a los ciempiés para estimular la producción de veneno en los conductos forcípuales, se introdujeron en recipientes de vidrio contenidos en una cava con hielo, con el fin de disminuir su actividad locomotora. Por último, se le aplicó electroestimulación en la base de las forcípuas, previamente humedecidas con agua, utilizando un estimulador eléctrico Phipps & Bird modelo 7092-611, con un voltaje entre 80-100 mV durante 30 segundos. El veneno fue recolectado con una micropipeta y se depositó en tubos de centrifuga de 0,6 mL, luego fue congelado a -80 °C para su traslado al Laboratorio de Neurofarmacología

Celular, Centro de Biofísica y Bioquímica del Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC). El veneno fue procesado en un liofilizador LABCONCO (Kansas, USA). Posteriormente, fue resuspendido en 1 mL de agua bidestilada, se centrifugó a 18000 g durante 30 minutos a 4 °C (Centrífuga Digicen 21R, Orto Alresa) para remover los restos insolubles. Finalmente, el sobrenadante fue dividido en alícuota y congelado nuevamente a -80 °C hasta su uso.

2.4. Determinación de proteínas totales

La concentración proteica fue estimada por espectrofotometría a 280 nm empleando un espectrofotómetro Eppendorf BioPhotometer plus (Hamburgo, Alemania). Para ello, se consideró la ley de Lambert y Beer, donde una unidad de absorbancia/cm de longitud de la trayectoria a 280 nm es equivalente a 1 mg/mL de proteína (D'Suze et al., 1996).

2.5. Estimación de las masas moleculares de los componentes que conforman el veneno de *S. gigantea*

Se realizó mediante electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE), siguiendo el protocolo descrito por Laemmli (1970) empleando gel en gradiente de 4-20%. La corrida electroforética fue realizada en una cámara de electroforesis Mini-PROTEAM Tetra System de Bio-Rad, a 110 V durante aproximadamente 1 hora. Se utilizó un estándar de proteínas (6,5-200 kDa) preteñido de Bio-Rad. El gel fue teñido con Coomassie Blue R-250 0,1% m/v y decolorados con una solución de etanol y ácido acético, al 30% y 7% v/v, respectivamente, con el fin de eliminar el exceso de colorante.

2.6. Actividad amidolítica del veneno de *S. gigantea*

El método amidolítico de Guerrero y Arocha-Piñango (1992) fue empleado para evaluar en el veneno de *S. gigantea* la presencia de componentes con actividad semejante a proteasas de la coagulación (trombina y calicreína) como proteasas del

sistema fibrinolítico (plasmina y uroquinasa). El ensayo se llevó a cabo en placas de poliestireno de 96 pozos fondo plano (Nunc™, USA), en las que se colocaron 100 µL de una mezcla que contiene 68 µL del tampón requerido por cada sustrato, 10 µL de la muestra (3,35 mg/mL) y 22 µL del sustrato en cada pozo. Luego de incubar las placas a 37 °C por 30 minutos, se midió la liberación de cromóforo a 405 nm. La actividad amidolítica fue expresada como UA/min/µg. Los ensayos se realizaron por triplicado, como control se utilizó las enzimas preincubadas con el tampón. Los sustratos empleados fueron: S-2238 (0,6 mM, específico a Trombina, tampón Tris 50 mM/ NaCl 130 mM pH 8,3), S-2444 (1 mM, específico a u-PA, tampón Tris 50 mM/ tween 80 0,01% pH 7,4), S-2302 (0,6 mM, específico para calicreina, tampón Tris/HCl 50 mM/ NaCl 150 mM pH 7,6) y S-2251 (0,8 mM, específico para plasmina, tampón Tris/HCl 50 mM pH 7,4). Tanto los sustratos como las enzimas fueron comprados a la empresa American Diagnostic Inc., USA.

También, en el veneno de *S. gigantea* se evaluó la presencia de componentes con actividad inhibitoria para las proteasas: trombina (0,6 mM), calicreina (0,6 mM), plasmina (0,8 mM) y u-PA (1 mM). Estas proteasas fueron incubadas una por una con el veneno (3,35 mg/mL) a 37°C durante 30 min. Entonces, se añadió el sustrato cromogénico específico para cada enzima. Después la placa fue incubada a 37°C durante 30 min y luego se midió la liberación de cromóforo a 405 nm. Como control se utilizó aprotinina (153,56 mM), benzamidina (10 mM), EACA (100 µg/mL) y ácido tranexámico (100 µg/mL). Los resultados se expresaron como porcentaje de inhibición a partir de la actividad amidolítica residual.

2.7. Determinación de la actividad coagulante

Para determinar la presencia de actividad coagulante del veneno de *S. gigantea*, se utilizó la metodología descrita por Jim, 1957, empleando solución de fibrinógeno humano grado L de la casa comercial American Diagnostica Inc, USA, al 0,3 % en imidazol salino, pH 7,4. Brevemente, en un tubo de borosilicato (10 x 75 mm) se agregaron 0,1 mL de solución de fibrinógeno y 0,1 mL de tampón Tris-HCl 0,05 M /

NaCl 0,15 M, a pH 7,4 (tampón Tris), se mezcló suavemente y se incubó a 37 °C durante 1 minuto, luego se agregó 0,1 mL de solución de trombina/Tris-HCl (2,5 U/mL) o de veneno a diferentes concentraciones de proteínas (1,5 – 100 µg/mL), se mezcló bien y se determinó el tiempo de coagulación en segundos. Como blanco se utilizó el tampón Tris (sustituto de la solución de trombina). Valores referenciales para el control están entre 20-22 segundos, se considera alterada la prueba si el tiempo de coagulación es 2 segundos < 20 o 2 segundos > 22.

2.8. Actividad fibrinolítica

La actividad fibrinolítica del veneno se evaluó empleando placas de fibrina (Marsh y Arocha-Piñango, 1972). Las cuales fueron preparadas usando placas de Petri de 35 mm diámetro a las que se le añadió 1,5 mL de solución de fibrinógeno humano 0,2% m/v (que contiene plasminógeno como contaminante), disuelto en un buffer constituido por imidazol 0,05 M y NaCl 0,15 M a pH 7,4, luego se agregó 75 µL de trombina-calcio (10 U/mL en 0,025 M CaCl₂). Esta solución fue homogeneizada e incubada a 25 °C por 30 min. Posteriormente, se añadió sobre cada placa de fibrina 10 µL de veneno a diferentes cantidades (15, 30, 60, 100, 250, 500, 750 y 1000 µg de veneno). Finalmente, las placas fueron incubadas a 37 °C por 24 horas y el diámetro del área lisada fue medido en mm². Se usó como control plasmina (0,652 mM).

2.9. Actividad fibrinogenolítica

Para estudiar el efecto del veneno sobre la molécula del fibrinógeno y sus cadenas, se incubó a 37 °C durante 24 horas, 30 µg de fibrinógeno (Fg) con diferentes cantidades de veneno (0,25; 0,50; 1; 5; 10; 20 y 30 µg). La mezcla veneno/Fg fue analizada mediante SDS-PAGE empleando geles al 7,5% en condiciones reducidas para evaluar el efecto sobre las cadenas del fibrinógeno y al 5% bajo condiciones no reducidas para determinar el efecto sobre la molécula del fibrinógeno, siguiendo el protocolo de Laemmli (1970), descrito en la sección 2.5 de este trabajo. El fibrinógeno utilizado fue humano grado L de la casa comercial American Diagnostica

Inc, USA. Se utilizó un estándar de proteínas (10-225 kDa) de la casa comercial Promega.

La relación veneno/Fg donde se obtuvo la máxima degradación del fibrinógeno se utilizó para evaluar la actividad fibrinogenolítica a diferentes tiempos de incubación (1,5; 3; 6; 12; 24 y 48 horas) a 37 °C, para determinar cuándo se inicia y finaliza la degradación de esta glucoproteína.

Posteriormente, manteniendo constante la relación veneno/Fg y tiempo de incubación donde se obtuvo la máxima degradación del fibrinógeno, se procedió a evaluar la actividad fibrinogenolítica a diferentes temperaturas de incubación (5; 12; 25; 37; 55; 80 y 100 °C), con el fin de determinar la temperatura óptima de degradación del Fg.

Luego de haber establecido la relación veneno/Fg, el tiempo de incubación y la temperatura donde se obtuvo la máxima degradación de fibrinógeno, se evaluó la actividad fibrinogenolítica del veneno de *S. gigantea* a diferentes pH (1; 5; 7; 9 y 11).

2.10. Determinación del porcentaje de degradación del fibrinógeno

Los geles se fotografiaron con el equipo FotoDyne incorporated, en el que las imágenes son tomadas por el programa Foto/Analyst® PC image, y son guardadas en formato JPG para su procesamiento. Con el programa Gimp las imágenes fueron recortadas y clarificadas. Luego, con el programa ImageJ, se cuantificó el porcentaje de degradación. Se le asignó al Fg control 0% de degradación (Pereira y Brazón, 2015).

2.11. Efecto de inhibidores de proteasas

El efecto del veneno de *S. gigantea* sobre el fibrinógeno humano se evaluó en presencia de inhibidores de proteasas (los cuales son descritos abajo). Para ello, se incubó 30 µg de veneno con cada inhibidor (a las concentraciones mencionadas abajo) a 37°C durante 30 minutos y luego se incubó esta mezcla con 30 µg de

fibrinógeno a 37°C por 12 horas. Posteriormente, se evaluó la actividad fibrinogenolítica por SDS-PAGE, siguiendo el protocolo descrito en la sección 2.5 y 2.9.

Se evaluaron las siguientes actividades de proteasas: i) metaloproteasa, con los inhibidores EDTA-Na (10 mM) y 1,1-Fenantrolina (10 mM); ii) serinoproteasa, con Benzamidina (10 mM) y PMSF (10 mM); iii) cisteinoproteasa, con ácido iodoacético (0.1 mM); y iv) aspartatoproteasa, con Peptatina (10 mM).

2.12. Actividad coagulante remanente del fibrinógeno pretratado con veneno

La actividad coagulante residual se evaluó a través de la prueba del tiempo de trombina-Tris descrito por Jim en 1957. En un tubo de borosilicato (10 x 75 mm) se añadió 0,1 mL de buffer (Tris-HCl 0,05 M, NaCl 0,15 M pH 7,4) y 0,1 mL de fibrinógeno humano al 0,1% m/v en tampón imidazol salino (imidazol 0,05 M, NaCl 0,85% m/v, pH 7,4), sin tratar o tratado con el veneno a una relación 1/1. Se mezcló bien y se incubó a 37 °C durante diferentes intervalos de tiempo (1,5; 3; 6; 12 horas). Posteriormente, se colocó 0,1 mL de trombina/Tris-HCl y se midió el tiempo que tarda la formación de coágulo en segundos. Todos los ensayos se realizaron por triplicado. Para la interpretación de los resultados, el tiempo de coagulación obtenido con el fibrinógeno pretratado con veneno se comparó con el registrado para fibrinógeno sin tratar (control). Valores referenciales para el control están entre 20-22 segundos, se considera alterada la prueba si el tiempo de coagulación es 2 segundos < 20 o 2 segundos > 22.

2.13. Adhesión de plaquetas a fibrinógeno tratado con veneno de *S. gigantea*

Para evaluar la adhesión plaquetaria, se obtuvieron plaquetas a partir de sangre fresca citratada, que fue centrifugada primero por 15 minutos a 400 g para obtener plasma rico en plaquetas (PRP); luego el PRP fue nuevamente centrifugado por 10 minutos a 700 g, para obtener el concentrado de plaquetas libre de plasma, el cual fue resuspendido en 1 mL de tampón NaCl 134 mM, KCl 2,9 mM, Hepes 20 mM,

Na₂HPO₄ 12•H₂O 0,34 mM, Glucosa 5 mM, MgCl₂ 1 mM y NaHCO₃ 12 mM (tampón tirode). El número de plaquetas fue ajustado a través del conteo manual utilizando la cámara de Neubauer, realizando las diluciones necesarias con el tampón tirode hasta obtener 1.732.000 células.

El estudio de adhesión plaquetaria a fibrinógeno se evaluó determinando la actividad de la fosfatasa ácida plaquetaria colocando en placa de poliestireno de 96 pozos (NuncTM, USA) 100 µL de fibrinógeno sin tratar y tratado con veneno a diferente pH [7; <7 (1;5); >7 (9;11)] y temperatura [37; <37 (4; 12; 25); >37 (55; 80; 100) °C]. La placa fue incubada a 4 °C durante toda la noche. Luego se bloquearon las muestras en la placa por 1 hora a temperatura ambiente con albúmina sérica bovina (BSA) 1% m/v diluida en tampón fosfato (PBS), y posteriormente se realizaron 3 lavados de 3 minutos cada uno con PBS sin BSA. Después, se colocaron 100 µL de suspensión de plaquetas (1.732.000) por pozo y esto se dejó incubar en cámara húmeda por 2 horas a temperatura ambiente. Luego se realizaron 3 lavados de 3 minutos cada uno con PBS. Finalmente se colocaron 150 µL del tampón de citrato de sodio 0,1 M pH 5,4, que contiene *p*-nitrofenilfosfato 5 mM y tritón X-100 al 1% v/v. Se incubó por 1 hora a temperatura ambiente y se detuvo la reacción con 100 µL de NaOH 2N. El color desarrollado por el *p*-nitrofenol liberado fue medido en un lector de ELISA a 405 nm. La BSA (40 µg/mL) se usó como control negativo de la adhesión de las plaquetas.

2.14. Fraccionamiento del veneno de *Scolopendra gigantea*

Mediante cromatografía de exclusión molecular empleando una columna empacada con Sephadex G-100 (1 x 67 cm, fine Pharmacia Biotechnology, Uppsala, Suecia) se fraccionó el veneno (100 mg en 1 mL de tampón de acetato de amonio 0,05 M pH 7,4) utilizando el mismo tampón donde se disolvió el veneno para equilibrar la columna y eluir los componentes del veneno de la misma. La corrida se realizó a 4 °C con velocidad de flujo de 0,56 mL/min, y la detección espectrofotométrica de las proteínas se realizó a 280 nm. Las fracciones obtenidas

fueron liofilizadas empleando un liofilizador LABCONCO (Kansas, USA) para concentrar las muestras. A estas fracciones se les determinó la masa molecular y la actividad fibrinogenolítica según las metodologías descritas en las secciones 2.5 y 2.9.

2.15. Análisis estadístico

Para el análisis de los resultados de la actividad coagulante remanente y de la adhesión plaquetaria se realizó un ANOVA de una vía con el objetivo de determinar si existen diferencias significativas entre los tratamientos realizados. El tamaño de la muestra (n) fue 3. Estas pruebas paramétricas se realizaron utilizando el paquete estadístico GraphPad Prism versión 6.

CAPÍTULO III

RESULTADOS

3.1. Estimación de las masas moleculares de los componentes que conforman el veneno de *S. gigantea*

En la Figura 7 se presenta el perfil proteico del veneno de *S. gigantea* obtenido por SDS-PAGE utilizando un gel en gradiente del 4-20%. Observándose que el veneno presentó bandas de distintas masas moleculares, las cuales se pudieron dividir en tres grupos. Al medir la movilidad relativa (RF) de las bandas de los marcadores de masa molecular empleado (Figura 8), se pudo estimar que el primer grupo presenta tres bandas de proteínas con masas moleculares de 6,7; 7,9 y 20,2 kDa, el segundo con cuatro bandas con masas moleculares de 47,8; 58; 65,9 y 78,9 kDa y el tercero con tres bandas una de 164,8 kDa y dos con masa molecular >200 kDa.

3.2. Actividad amidolítica del veneno de *S. gigantea*

Los resultados mostraron que el veneno (3,35 mg/mL) no posee actividad semejante ni inhibitoria a calicreína, trombina, uroquinasa ni a plasmina.

3.3. Determinación de la actividad coagulante

El veneno no es capaz de coagular fibrinógeno humano, es decir que no presenta componentes semejantes a trombina.

3.4. Actividad fibrinolítica

Se observó que el veneno de *Scolopendra gigantea* a las concentraciones evaluadas (1,5; 3; 6; 10; 25; 50; 75 y 100 µg/µL) no produjo degradación de la fibrina (Figura 9).

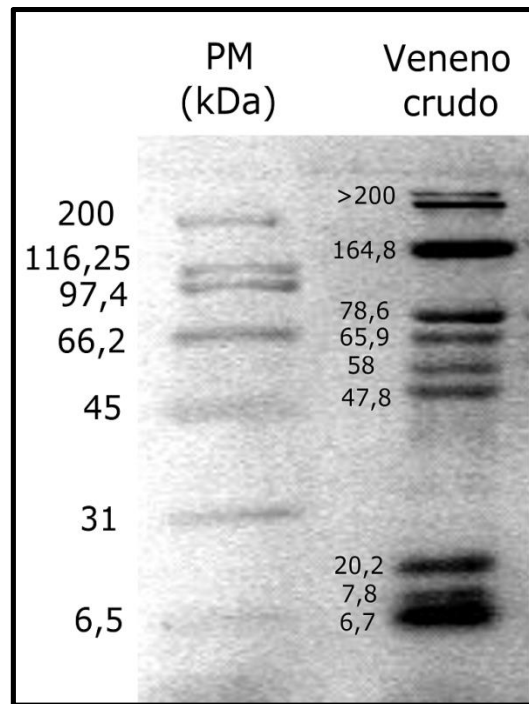


Figura 7. Perfil proteico del veneno crudo de *S. gigantea* empleando gel en gradiente al 4-20% bajo condiciones no reductoras. PM: marcador de peso molecular. Veneno crudo (7 µg)

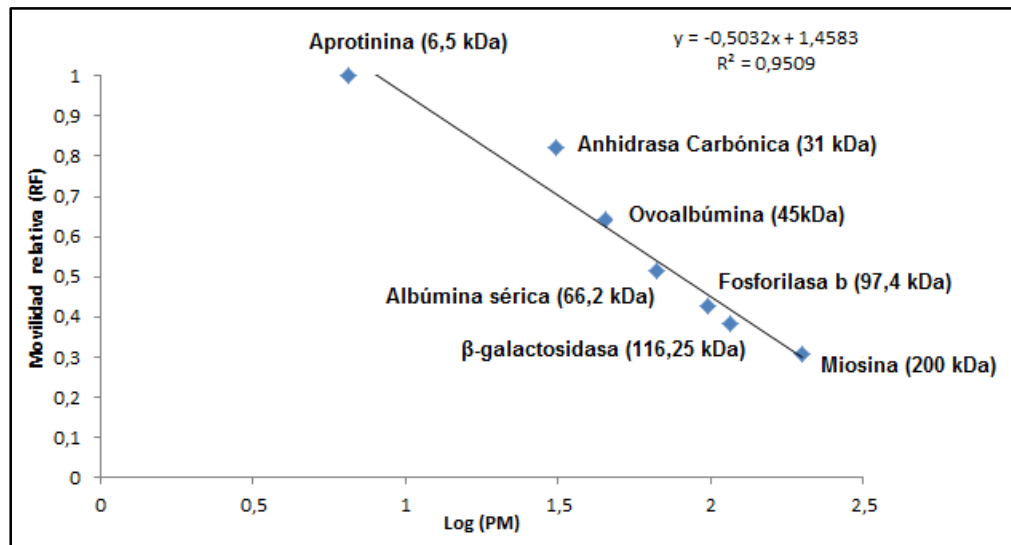


Figura 8. Curva de movilidad relativa. Marcadores de masa molecular de la electroforesis en gradiente 4 – 20%.

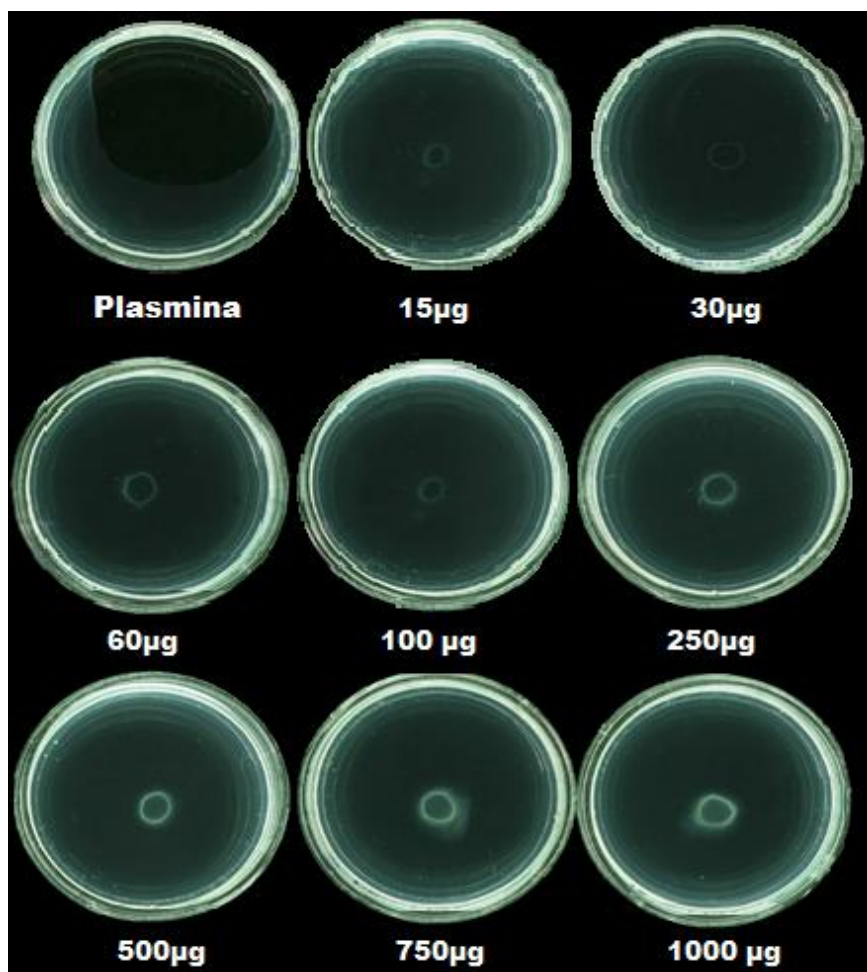


Figura 9. Actividad fibrinolítica del veneno de *S. gigantea*. En placas de fibrina ricas en plasminógeno, se colocaron 10 µL de diferentes cantidades de veneno (15, 30, 60, 100, 250, 500, 750 y 1000 µg) y plasmina (0,652 mM). Las placas fueron incubadas a 37 °C durante 24 horas.

3.5. Actividad fibrinogenolítica

En condiciones no reductoras se observó que a medida que aumenta la cantidad de veneno incrementa la degradación del fibrinógeno y este efecto fue máximo a la relación 30/30 con 47,9% de degradación (Figura 10A). Bajo condiciones reductoras la degradación de las cadenas A α del Fg comenzó con la relación 1/30 obteniéndose la máxima degradación (92,9%) a la relación 30/30, no obstante, las cadenas B β y γ , no se ven afectadas por la acción del veneno de *S. gigantea* (Figura 10B).

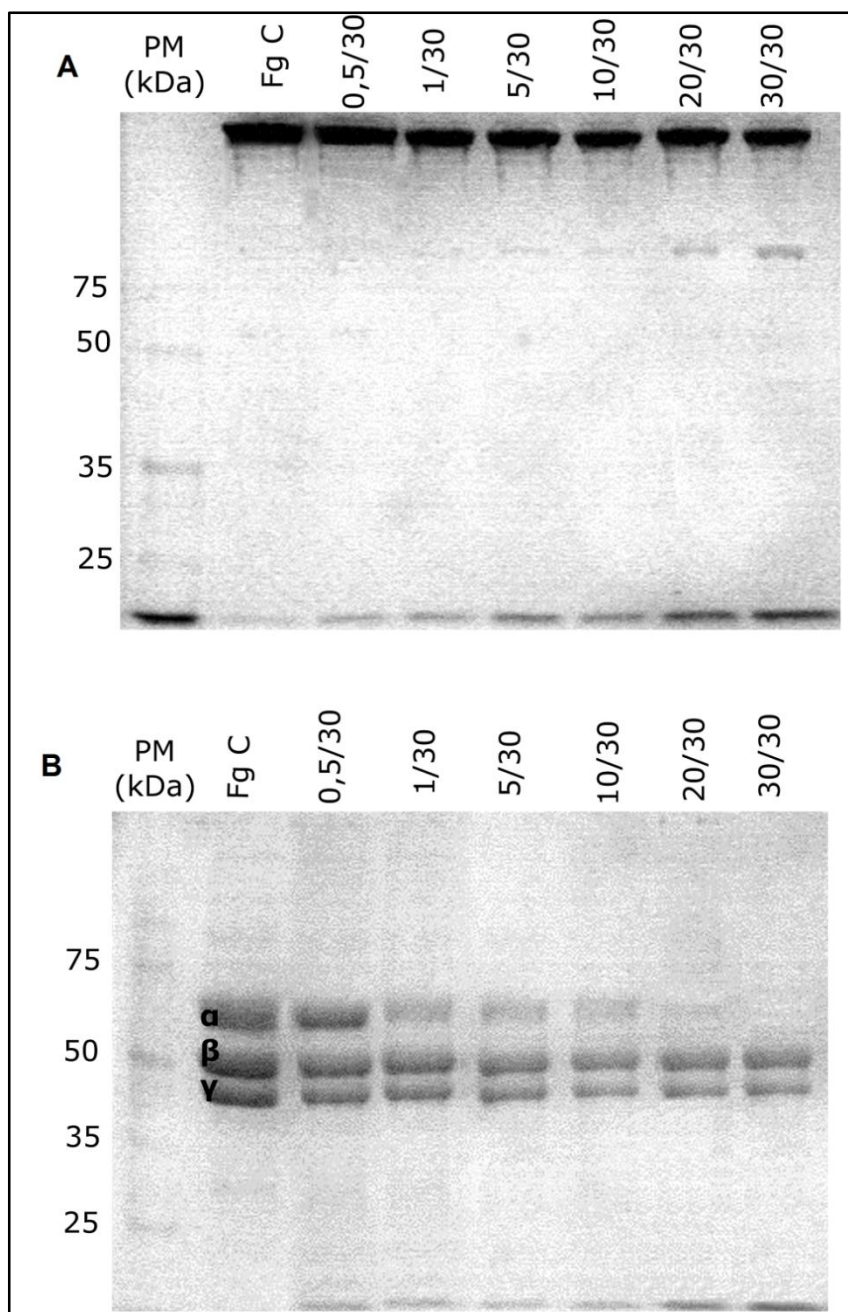


Figura 10. Efecto del veneno de *S. gigantea* sobre el fibrinógeno (Fg) a diferentes relaciones. En condiciones no reductoras (A) y bajo condiciones reductoras (B). El fibrinógeno (Fg) fue incubado con el veneno a diferentes relaciones (0,5/30; 1/30; 5/30; 10/30; 20/30 y 30/30) durante 24 horas a 37 °C. PM, marcador de peso molecular. Fg C, Fibrinógeno control. Los símbolos α , β y γ representan los tres pares de cadenas del Fg.

Luego de haber determinado que la relación 30/30 (μg veneno crudo de *S. gigantea* / μg Fg) es la relación de máxima degradación (Figura 10), se evaluó la actividad fibrinogenolítica a diferentes tiempos de incubación (1,5; 3; 6; 12; 24 y 48 horas), observándose en condiciones no reductoras que la máxima degradación del fibrinógeno se produce a tiempos de incubación ≥ 12 horas (Figura 11). La molécula se degradó en 46,9% a las 12 horas y luego incrementó ligeramente hasta 48,4 % a las 48 horas (Figura 11A), mientras que en condiciones reductoras se observó que a partir de 1,5 horas ocurre degradación de las cadenas A α (55,4 %), fue máximo a 12 horas (91 %) y aumentó un poco luego de 48 horas (93,3 %) Las cadenas B β y γ , no fueron afectadas por la acción del veneno de *S. gigantea* (Figura 11B).

Posteriormente, se evaluó el efecto del veneno de *S. gigantea* sobre el fibrinógeno a diferentes temperaturas (4; 12; 25; 37; 55; 80 y 100 °C), manteniendo constante la relación veneno/Fg (30/30) y el tiempo de incubación (12 horas), condiciones determinadas previamente (Figura 11). Los resultados revelaron que en condiciones no reductoras la máxima degradación de la molécula de Fg se obtuvo al incubar el veneno a 37°C (48,5%) temperaturas < 37 °C no mostraron efecto significativo en la degradación de la molécula ($\leq 19,8$ %), mientras que al incubar el veneno a temperaturas > 37 °C no se observó degradación del fibrinógeno (Figura 12A). En condiciones reductoras se observó que a 12 y 25 °C hay una degradación parcial de las cadenas A α ($\leq 35,2$ %), sin embargo se produce la máxima degradación de las cadenas A α (93,9%) al incubar las muestras a 37 °C, no obstante, las cadenas B β y γ , no se ven afectadas por la acción del veneno de *S. gigantea*. Las restantes temperatura (4, 55, 80 y 100 °C) no mostraron ningún efecto sobre la capacidad del veneno en degradar las cadenas del fibrinógeno (Figura 12B).

Al evaluar la actividad fibrinogenolítica del veneno de *S. gigantea* a diferentes pH, sin variar las condiciones establecidas anteriormente (30 μg veneno /30 μg Fg; 12 horas; 37°C), se pudo observar que en condiciones no reductoras, la actividad fibrinogenolítica es óptima a pH 7 con 48,2% de degradación de la molécula de fibrinógeno, no siendo afectada por los restantes pH (Figura 13A). En condiciones

reductoras, se observó la misma tendencia obteniéndose máxima degradación de las cadenas A α (92,9%) a pH 7. Las cadenas B β y las γ no fueron afectadas con la variación del pH (Figura 13B). En todos los geles los porcentajes de degradación fueron obtenidos a través del análisis densitométrico en ImageJ.

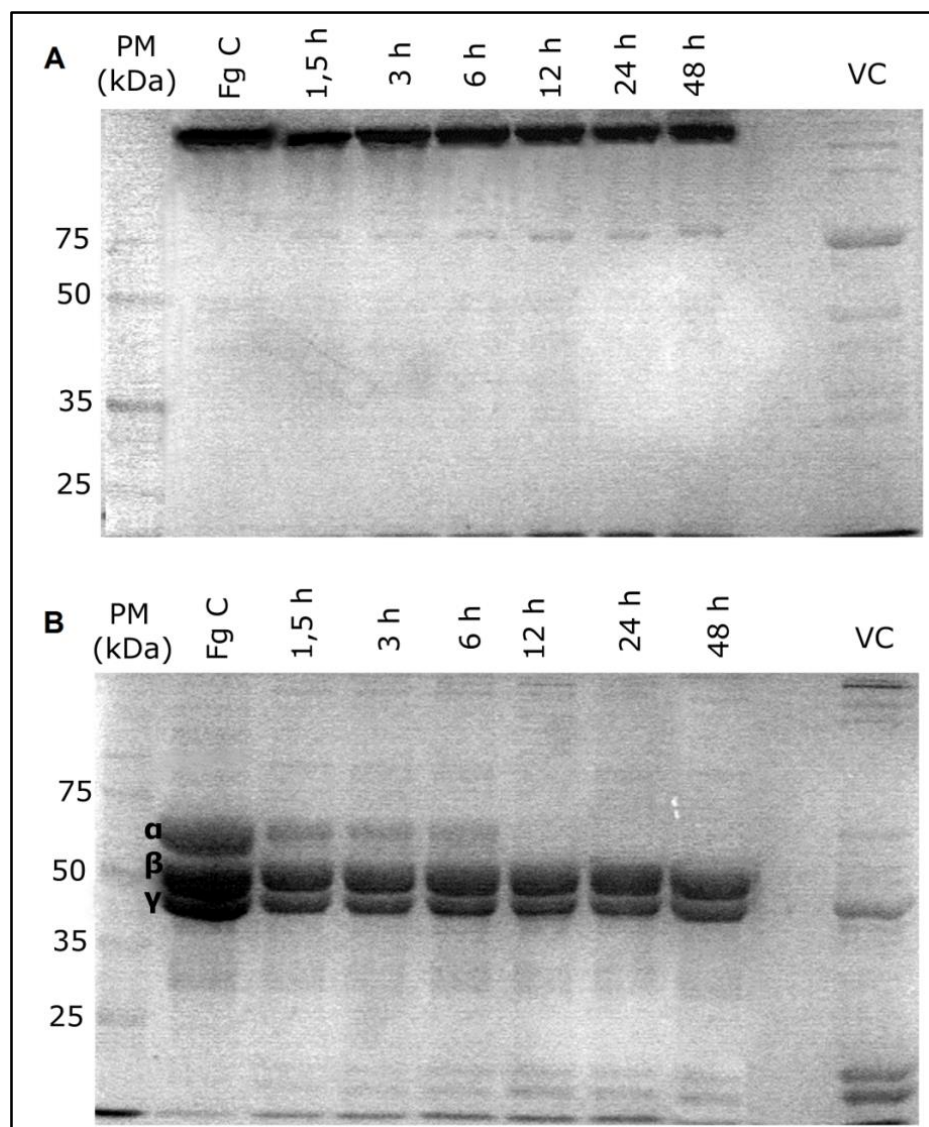


Figura 11. Efecto del tiempo de incubación sobre la actividad fibrinogenolítica del veneno de *S. gigantea*. En condiciones no reductoras (A) y bajo condiciones reductoras (B). El fibrinógeno (Fg) fue incubado con el veneno a 37 °C, a una relación 30/30 y a diferentes tiempos de incubación (1,5; 3; 6; 12; 24 y 48 horas). PM, marcador de peso molecular. Fg C, Fibrinógeno control. VC, veneno crudo. Los símbolos α , β y γ representan los tres pares de cadenas del Fg.

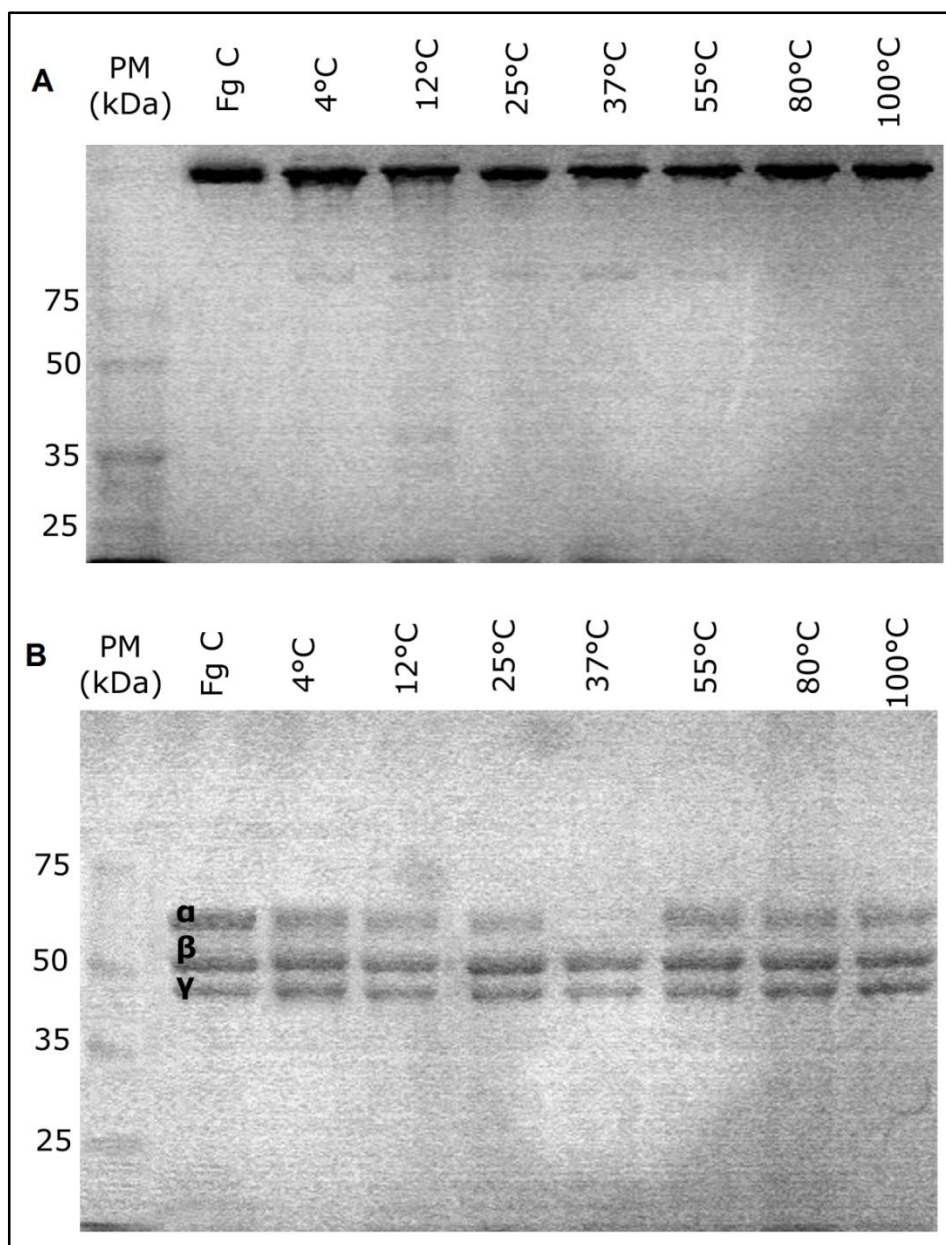


Figura 12. Efecto de la temperatura sobre la actividad fibrinogenolítica del veneno de *S. gigantea*. En condiciones no reductoras (A) y bajo condiciones reductoras (B). El fibrinógeno (Fg) fue incubado con el veneno a diferentes temperaturas (4; 12; 25; 37; 55; 80 y 100 °C), durante 12 horas, a la relación 30/30. PM, marcador de peso molecular. Fg C, Fibrinógeno control. Los símbolos α , β y γ representan los tres pares de cadenas del Fg.

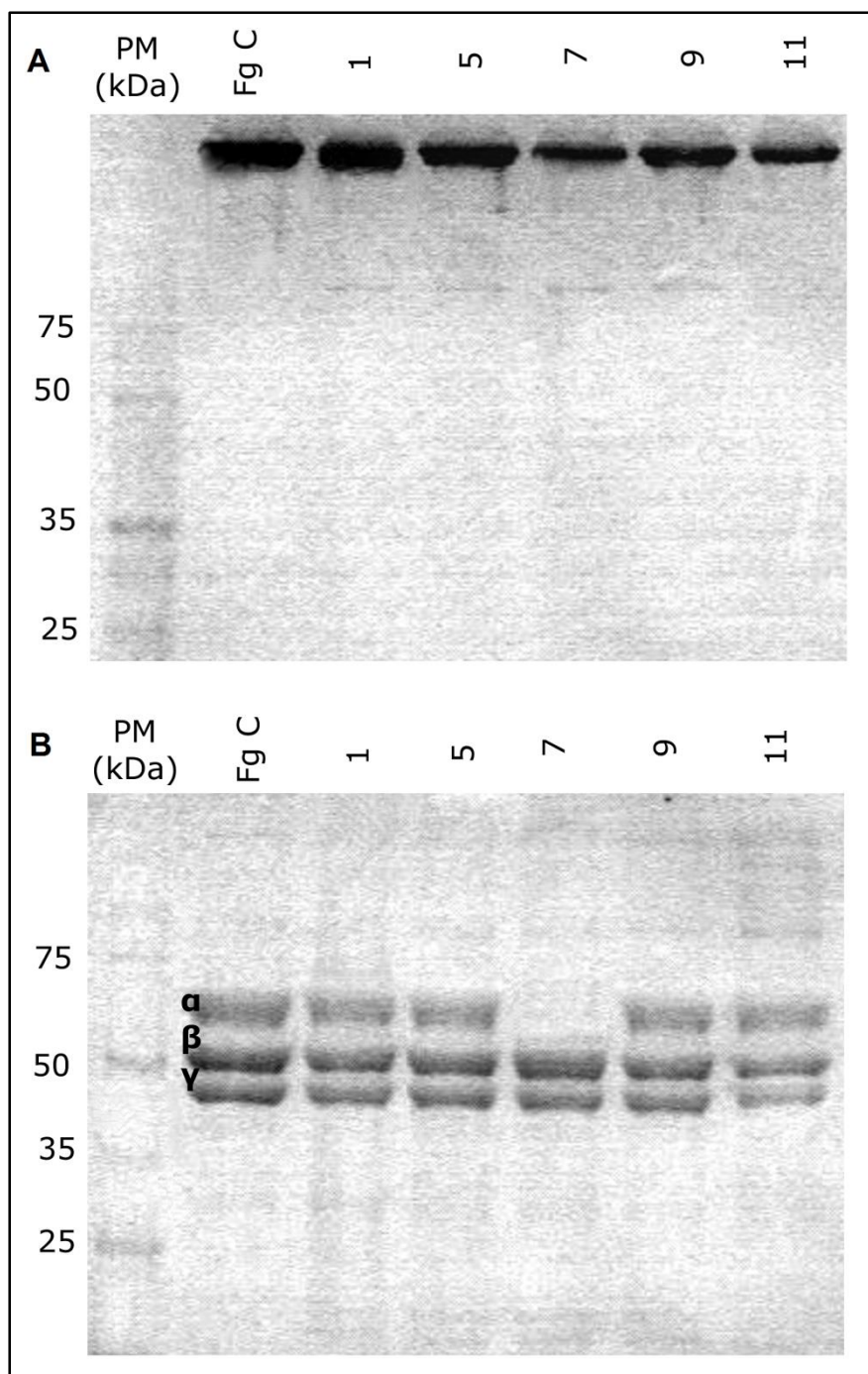


Figura 13. Efecto del pH sobre la actividad fibrinogenolítica del veneno de *S. gigantea*. En condiciones no reductoras (A) y reductoras (B). El fibrinógeno (Fg) fue incubando con el veneno a 37°C, durante 12 horas, a la relación 30/30 y diferentes pH (1; 5; 7; 9 y 11). PM, marcador de peso molecular. Fg C, Fibrinógeno control. Los símbolos α , β y γ representan los tres pares de cadenas del Fg.

3.6. Efecto de inhibidores de proteasas

Se evaluó la actividad fibrinogenolítica del veneno crudo de *S. gigantea* en presencia de inhibidores de proteasas y se obtuvo que EDTA y 1,10 Fenantrolina (inhibidores de metaloproteasas) protegen al fibrinógeno de la degradación por el veneno. Por otra parte, la peptatina (inhibidor de aspartatoproteasas) protegió parcialmente al fibrinógeno, observándose que la molécula fue degradada en 31,2%, mientras que las cadenas A α del Fg fueron degradadas en 64,4%, sin efecto sobre las cadenas B β y γ . Los inhibidores de serinoproteasas benzamidina y PMSF como el inhibidor de cisteinoproteasa ácido iodoacético no impidieron el efecto proteolítico del veneno sobre el fibrinógeno (Figura 14).

3.7. Actividad coagulante remanente del fibrinógeno pretratado con veneno

La actividad coagulante remanente del fibrinógeno pretratado con el veneno fue determinada empleando el ensayo de tiempo de trombina-Tris. Al realizar un ANOVA se puede observar que existen diferencias significativas en el tiempo de coagulación de las muestras incubadas a diferentes tiempos ($F= 41,22$, $p= 0,0000$). En la Figura 15 se muestra que a medida que se incrementó el tiempo de incubación del Fg con el veneno, en comparación al fibrinógeno control incubado con tampón, ocurre un alargamiento en el tiempo de coagulación por trombina; desde 21,97 (control) hasta 51,59 segundos (con 12 horas de incubación), lo que indica pérdida de la actividad coagulante del fibrinógeno. No siendo significativo este alargamiento cuando el Fg es incubado con el veneno por tiempos ≤ 3 horas.

3.8. Adhesión de plaquetas a fibrinógeno tratado con veneno de *S. gigantea*

Los resultados de la adhesión plaquetaria fueron analizados con un ANOVA de una vía ($F=7,66$ $p=0,0019$). En la figura 16A se observa que el fibrinógeno incubado con el veneno a 37 °C durante 12 horas a pH 7 y a la relación 30/30, incrementa significativamente la adhesión plaquetaria con respecto al Fg sin tratar ($p=0,023$). No

obstante, podemos observar que variaciones de pH (≤ 7 ; > 7) durante la incubación a 37°C no muestran diferencias significativas al compararlo con el Fg sin tratar ($p=0,625$ y $0,646$ respectivamente). Cuando la mezcla de veneno/Fg es incubada a temperaturas inferiores a 37°C; manteniendo constante las otras condiciones, se evidencia un aumento significativo de la adhesión plaquetaria con respecto al Fg sin tratar ($p=0,025$), un efecto parecido al observado cuando se incuba el veneno con el Fg a 37 °C (Figura 16B). No obstante, al incubar el veneno con el Fg a temperaturas superiores a 37°C no se afecta la adhesión plaquetaria obteniéndose resultados similares a la muestra control ($p=0,9914$).

3.9. Fraccionamiento del veneno crudo de *Scolopendra gigantea*

Al separar el veneno crudo de *Scolopendra gigantea* (100 mg/mL) por la columna de exclusión molecular G-100, se obtuvieron 4 fracciones las cuales fueron denominadas F1, F2, F3 y F4 (Figura 17). La duración de la separación cromatográfica fue de 3,73 horas. En la tabla I, se muestran los tiempos, volúmenes de retención y actividad fibrinogenolítica de cada fracción. De las fracciones obtenidas solo F3 y F4 fueron capaces de degradar fibrinógeno, sin embargo F4 fue la más activa, degradando la molécula de Fg en 47,8 % y a las cadenas A α en 93,5%, sin efecto sobre las B β y γ (Figura 18). También se le determinó las masas moleculares a la fracción F4 (Figura 19), observándose que esta fracción está compuesta por 2 bandas con masas moleculares de 11,9 y 20,2 kDa.

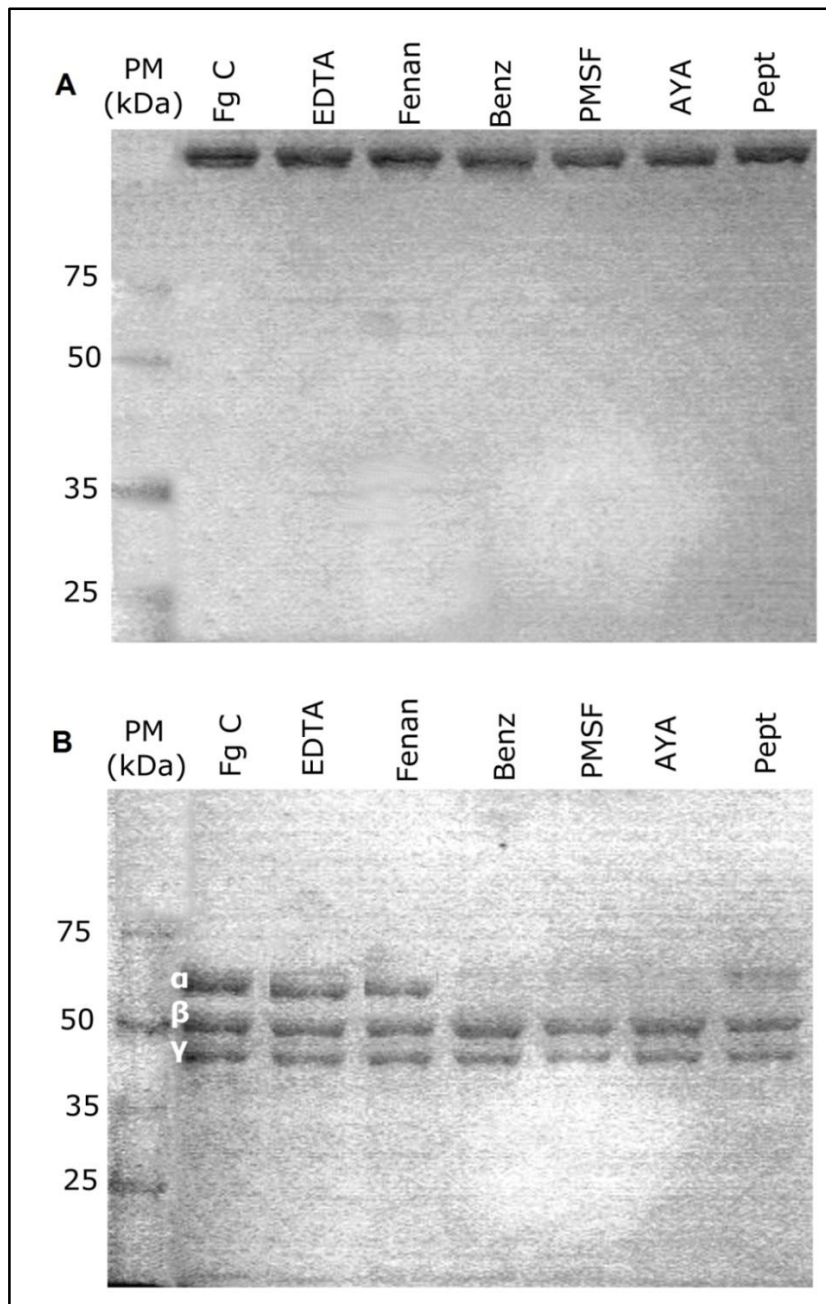


Figura 14. Efecto de inhibidores de proteasas sobre la actividad fibrinogenolítica del veneno de *S. gigantea*. En condiciones no reductoras (A) y reductoras (B). El ensayo se realizó incubando el veneno con cada inhibidor a 37 °C durante 30 minutos, posteriormente la mezcla es incubada con fibrinógeno (Fg) a 37°C, durante 12 horas, a la relación 30/30. PM, marcador de peso molecular. Fg C, Fibrinógeno control. Los símbolos α , β y γ representan los tres pares de cadenas del Fg. EDTA (ácido etilendiamino tetraacético); Fenant (1,10 fenantrolina); Benz (benzamidina); PMSF (Fluoruro de fenilmetilsulfonil); AYA (ácido iodoacético) y Pept (Peptatina).

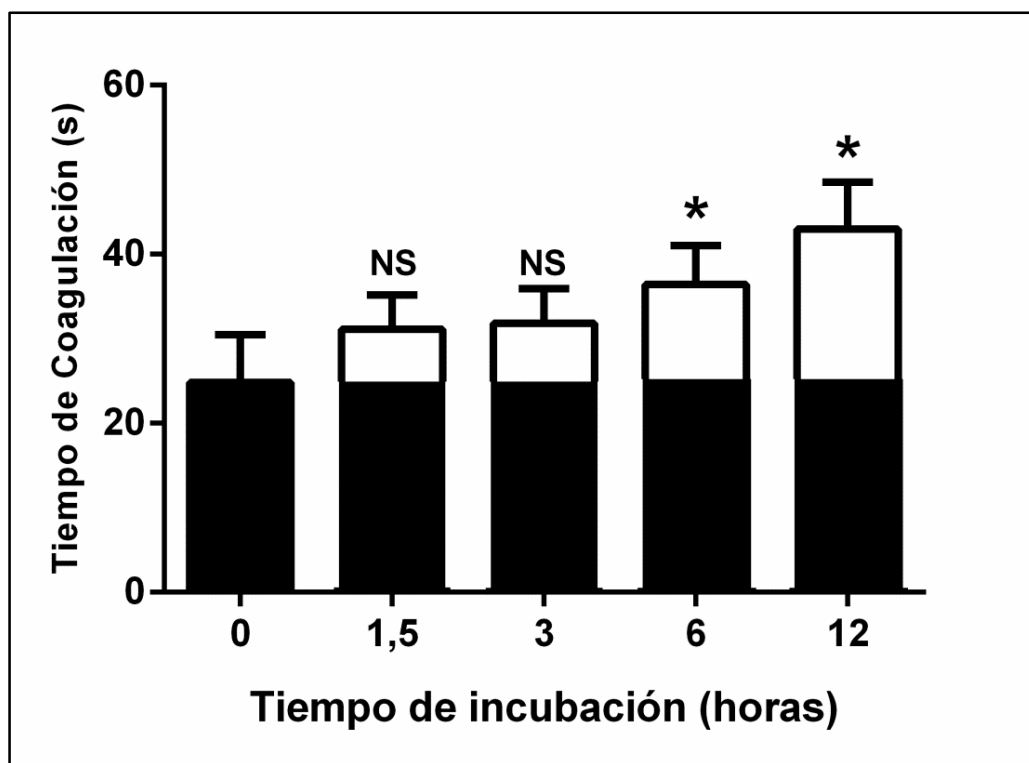


Figura 15. Actividad coagulante remanente del fibrinógeno pretratado con veneno a diferentes tiempos de incubación.

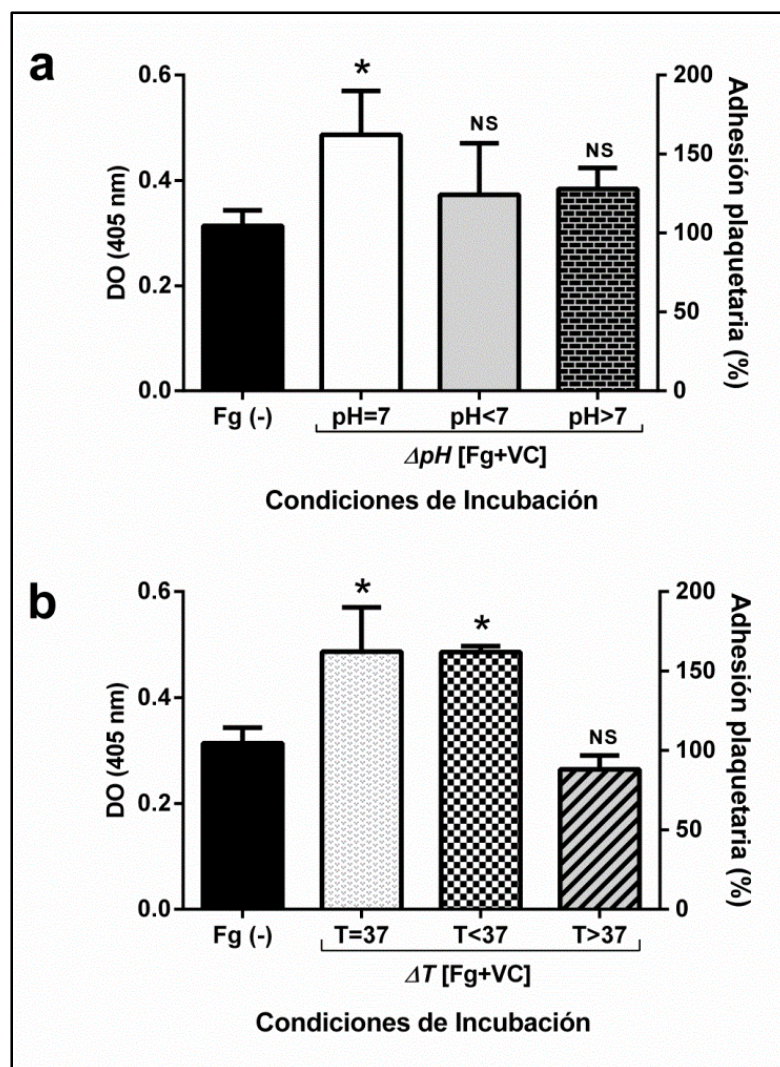


Figura 16. Adhesión plaquetaria (determinada por el método de la fosfatasa ácida) a fibrinógeno preincubado con veneno de *S. gigantea*. Diferentes pH (A) y diferentes temperaturas (B) durante 12 horas a la relación 30/30. Datos expresados como medias y sus errores estándares, $n = 3$. NS = No hay diferencias significativas respecto al control. * Diferencias significativas

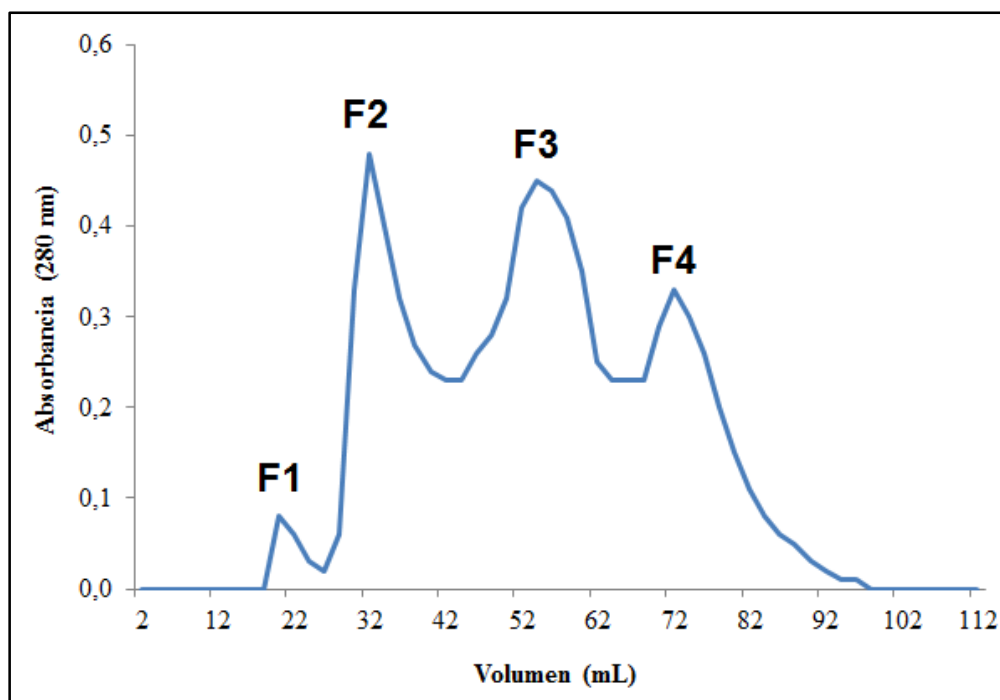


Figura 17. Cromatograma del veneno de *Scolopendra gigantea*. Se empleó una columna exclusión molecular Sephadex G-100 (1 x 67 cm) usando buffer Acetato de Amonio 0,05 M pH 7,4 para el equilibrio de dicha columna y la elución de los componentes. Velocidad de flujo de 0,56 mL/min y detección a 280 nm. Las letras y números sobre los picos representan las fracciones obtenidas.

Tabla I. Separación del veneno crudo de *Scolopendra gigantea* por Sephadex G-100 con los volúmenes y tiempos de retención de cada fracción obtenida.

Fracciones	Volumen de Retención (mL)	Tiempo de Retención (min)	Actividad fibrinogenolítica
F1	20	56	-
F2	44	88	-
F3	68	136	+
F4	96	192	++

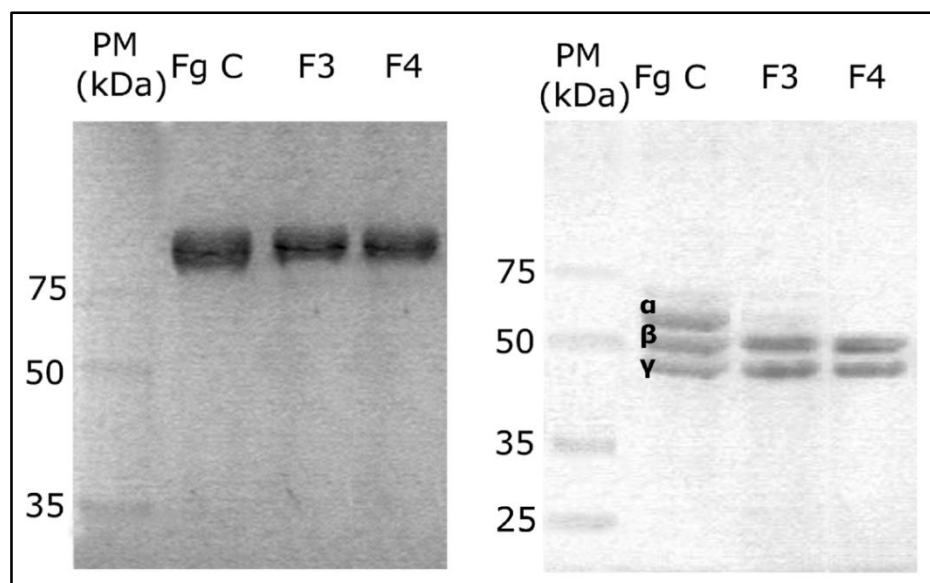


Figura 18 Actividad fibrinogenolítica de la fracción F4 obtenida a partir de veneno de *S. gigantea*. En condiciones no reductoras (A) y condiciones reductoras (B). El fibrinógeno (Fg) fue incubado con F4 a 37 °C durante 12 horas a la relación 30/30. PM, marcador de peso molecular. Fg C, Fibrinógeno control. Los símbolos α , β y γ representan los tres pares de cadenas del Fg.

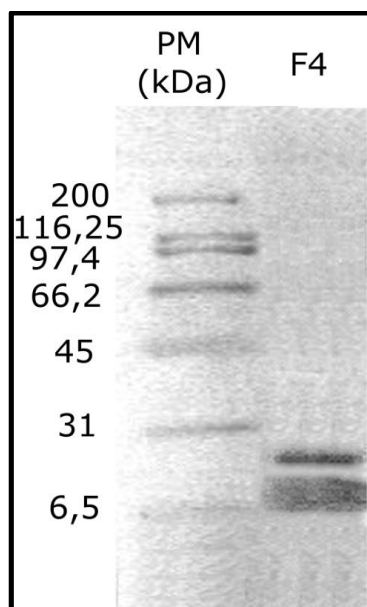


Figura 19. Electroforesis en gel en gradiente de 4-20% de la fracción F4 obtenida luego del fraccionamiento por cromatografía de exclusión molecular. PM: marcador de peso molecular. F4 (10 μ g).

CAPÍTULO IV

DISCUSIÓN

El veneno de las escolopendras constituye una fuente rica de proteínas y péptidos farmacológicamente importantes, algunos de estos han sido caracterizados bioquímicamente y podrían ser útiles como agentes terapéuticos (Hakim *et al.*, 2015). Generalmente los accidentes con ciempiés ocasionan dolor local intenso, eritema, edema, endurecimiento y necrosis, rara vez pueden causar reacciones sistémicas como anafilaxia, hipotensión, isquemia miocárdica y/o hemorragias. Estos síntomas dependerán de factores tales como la edad y peso corporal del afectado, sitio anatómico del escolopendrismo, el tamaño y la especie de ciempiés (Rodríguez-Acosta *et al.*, 2000; Bush *et al.*, 2001; Malta *et al.*, 2008; Mavridis *et al.*, 2016).

Tomando en cuenta que algunos casos de escolopendrismo en humano producen hemorragia, la cual puede ser debida en parte a un desequilibrio en el sistema hemostático, en este trabajo se evaluó el efecto del veneno de *Scolopendra gigantea* sobre algunas proteínas de la coagulación y la fibrinólisis observándose que este veneno degrada al fibrinógeno, sustrato central de la coagulación. Componentes con esta actividad han sido identificados y/o aislado de secreciones biológicas o venenos de otros organismos vivos (Arocha-Piñango *et al.*, 1999; Azañero *et al.*, 2000; Rodríguez-Acosta *et al.*, 2000; Bush *et al.*, 2001; Pinto *et al.*, 2004; Lee *et al.*, 2005; Malta *et al.*, 2008; Choi *et al.*, 2014; Brazón *et al.*, 2014; Mavridis *et al.*, 2016; Kang *et al.*, 2016).

El perfil proteico del veneno crudo de *S. gigantea* obtenido en este trabajo mostró 10 bandas con masas moleculares entre 6,7 y ≥ 200 kDa, siendo parecido al obtenido por Parrilla-Álvarez *et al.* (2008) y Granado (2014), quienes también estudiaron el veneno de esta especie de ciempiés. Parrilla-Álvarez *et al.* en el 2008, reportan que el veneno presenta 10 bandas con masas moleculares entre 6 y 190 kDa. Mientras que, Granado en el 2014 indicó que el veneno de *S. gigantea* contiene 28 bandas de

proteínas con masas moleculares entre 19 y más de 250 kDa. Esto permite concluir que el veneno es una mezcla de componentes con diferentes masas moleculares.

Las diferencias observadas en cuanto al número de bandas del perfil proteico obtenido en este trabajo en comparación a las obtenidas por Granado en el 2014 quien usó ciempiés colectados en la misma zona y algunos de los ejemplares son los mismos para ambas investigaciones, posiblemente se deban a diversos factores tales como el tiempo de cautiverio y dieta de los animales que podrían influir en la calidad del veneno producido, traslado de las muestras del estado Carabobo (Universidad de Carabobo) al estado Miranda (IVIC) y/o tiempo transcurrido entre la extracción y el desarrollo de los experimentos, que podría influir en la autodegradación de los componentes del veneno debido a la presencia de proteasas en el mismo.

Otras especies de ciempiés pertenecientes al género *Scolopendra*, tales como *S. viridis say*, *S. viridicornis*, *S. viridicornis nigra* y *S. cingulata*, también contienen una mezcla de proteínas con masas moleculares diversas (Muñoz-Andrade *et al.*, 2005; Malta *et al.*, 2008; Rates *et al.*, 2007).

Al evaluar la actividad semejante e inhibitoria a proteasas de la coagulación (calicreína y trombina) y la fibrinólisis (u-PA y plasmina), se determinó que el veneno de *S. gigantea* no fue capaz de hidrolizar los substratos cromogénicos de cada una de las enzimas estudiadas (no presenta actividad semejante) ni tampoco bloqueó la capacidad de estas enzimas de cortar sus respectivos substratos para liberar el cromóforo (para-nitroanilina) unido, por ende el veneno no posee actividad inhibitoria sobre calicreína, trombina, uroquinasa (u-PA) y plasmina. Lo que sugiere que los episodios hemorrágicos observados en algunos casos de escolopendrimo no podrían ser atribuidos a la presencia de componentes con actividad inhibitoria de calicreína y/o trombina ni a la presencia de componentes con actividad semejante a u-PA y/o plasmina en el veneno de *S. gigantea*.

Además se pudo corroborar la ausencia de actividad semejante a trombina con el ensayo de tiempo de trombina-Tris, observándose que el veneno no coagula plasma

pobre en plaqueta ni fibrinógeno humano cuando se reemplaza la solución de trombina por veneno.

Al evaluar la actividad fibrinolítica del veneno de *Scolopendra gigantea* se obtuvo que éste no degrada fibrina en ninguna de las concentraciones evaluadas. Estos resultados son respaldados con los obtenidos en la prueba de actividad semejante a u-PA y plasmina empleando sustratos cromogénicos, por lo tanto el veneno no posee componentes que activen la fibrinólisis de forma indirecta (u-PA) o directa (plasmina) para llevar a cabo la disolución del coágulo de fibrina y contribuir en una exacerbada actividad fibrinolítica que podría desencadenar episodios hemorrágicos (Menéndez *et al.*, 2011; Flores-Rivera *et al.*, 2014).

Sin embargo, se ha demostrado que otras especies del género *Scolopendra*, presentan componentes fibrinolíticos, tal es el caso de *S. subspinipes mutilans*, el cual contiene una serinoproteasa con esta actividad (You *et al.*, 2004).

Con el fin de determinar a qué nivel del sistema de la coagulación podría estar actuando el veneno de *Scolopendra gigantea* para producir episodios hemorrágicos, se evaluó la actividad fibrinogenolítica de este veneno a distintas cantidades sobre una cantidad fija de fibrinógeno, además se mantuvo constante el tiempo (24 h) y la temperatura (37°C) de incubación, se observó que la relación 30 µg veneno/ 30 µg fibrinógeno, bajo condiciones reductoras produce mayor degradación de las cadenas Aα sin efecto aparente sobre las Bβ y γ, lo que sugiere que los componentes fibrinogenolíticos son del tipo α-fibrinogenasa, siendo estos resultados similares a fibrinogenasas reportadas en plantas, venenos de serpiente y artrópodos (Rajesh *et al.*, 2006; Paes *et al.*, 2008; Trisina *et al.*, 2011; Siritapetawee *et al.*, 2012; Patel *et al.*, 2012; Brazón *et al.*, 2014, Malta *et al.*, 2008).

Posteriormente, la relación donde se observó mayor degradación de las cadenas Aα (30/30) se utilizó para conocer el tiempo donde se inicia y se completa la degradación de estas cadenas, conservando la temperatura de incubación constante (37 °C). Los resultados mostraron que la degradación inicia a las 1,5 horas y es

máxima a las 12 horas, siendo este efecto similar a las 24 y 48 horas, no observándose ningún efecto sobre las otras cadenas del fibrinógeno. Estos resultados confirman la presencia de α -fibrinogenasas en este veneno y sugieren que los compuestos que degradan fibrinógeno tienen actividad distinta a las enzimas fisiológica trombina y plasmina, ya que no se observa el patrón de degradación del fibrinógeno característico de la hidrólisis por estas enzimas, ya que la trombina degrada parcialmente las cadenas A α y B β sin alterar las γ , mientras que la plasmina degrada los tres pares de cadenas del fibrinógeno (Levy *et al.*, 2012; Marchi, 2012; Hernández, 2015; Palomo *et al.*, 2005).

Las α -fibrinogenasas en el veneno de *Scolopendra gigantea* actúan a temperatura y pH óptimo de 37 °C y 7 respectivamente. Algunas de dichas α -fibrinogenasas aisladas de serpientes, orugas, presentan resultados similares a los reportados en este trabajo, sin embargo hasta la fecha no se ha evaluado estos parámetros a los componentes fibrinogenolíticos presentes en el ciempiés *Scolopendra viridicornis* (Pinto *et al.*, 2004; Malta *et al.*, 2008; Yunusova *et al.*, 2013).

Cuando se evaluó el efecto del veneno de *Scolopendra gigantea* sobre la molécula del fibrinógeno en condiciones no reductoras se observó que la máxima degradación de esta glucoproteína se produjo también con la relación 30/30, la degradación fue afectada por el tiempo de incubación temperatura y pH, siendo las condiciones óptimas 12 horas, 37 °C y 7 respectivamente. Es importante resaltar que con los distintos tratamientos no se observó degradación total de la molécula de fibrinógeno. Sin embargo, la molécula resultante luego de la acción del veneno, no es capaz de polimerizar para formar coagulo de fibrina cuando este fibrinógeno es incubado con trombina, observándose un alargamiento del tiempo de coagulación al emplear el ensayo de tiempo de trombina-Tris, generando el veneno un efecto anticoagulante. Estos resultados sugieren que la acción proteolítica del veneno sobre el fibrinógeno probablemente altera los sitios de acción de la trombina sobre el fibrinógeno, o afecta los sitios de polimerización necesarios para la asociación de monómeros de fibrina (Brazón *et al.*, 2014).

Posteriormente para determinar qué tipo de proteasa degrada las cadenas A α del fibrinógeno, se utilizaron inhibidores para metaloproteasas, serinoproteasas, cisteinoproteasas y aspartatoproteasas. Los resultados muestran que EDTA y 1,1-fenantrolina inhibieron la actividad fibrinogenolítica del veneno (relación 30/30, incubación a 37°C durante 12 horas), lo que indica que las proteasas que degradan las cadenas A α del fibrinógeno son de tipo metaloproteasas. Mientras que, benzamidina, PMSF y ácido iodoacético no presentaron ningún efecto sobre la actividad fibrinogenolítica del veneno de *Scolopendra gigantea*, por lo que se concluye que este veneno no presenta α -fibrinogenasas con actividad de serinoproteasas. Este hallazgo concuerda con los resultados obtenidos en los venenos de escolopendras que indica que una de las enzimas mayoritarias en estos venenos son las metaloproteasas (Undheim & King, 2011)

Entre los procesos de adhesión celular de importancia en la hemostasia se encuentra la adhesión de las plaquetas, elementos formes de la sangre que desempeñan un papel crucial desde los primeros momentos de la activación del sistema hemostático. Las interacciones adhesivas de las plaquetas son mediadas por los receptores tipo integrinas, los cuales interactúan con una variedad de glicoproteínas extracelulares como fibrinógeno, fibronectina, factor von Willebrand, vitronectina, colágeno y laminina. Las plaquetas contienen cinco miembros de la familia de receptores tipo integrinas: $\alpha_b\beta_3$, $\alpha_v\beta_3$, $\alpha_2\beta_1$, $\alpha_5\beta_1$, $\alpha_6\beta_1$, cada uno de los cuales está involucrado en mayor o menor extensión en el mantenimiento de la estructura normal de la vasculatura y en la reparación de daños vasculares asociados a heridas o a la angiogénesis (Apitz-Castro, 1995; Arzamendia *et al.*, 2006; González & García, 1992).

Para demostrar si el veneno de *S. gigantea* altera las propiedades adhesivas del fibrinógeno, se evaluó la adhesión a plaquetas no activadas, bajo diferentes condiciones de incubación. Los resultados evidenciaron que la proteólisis del fibrinógeno por el veneno no disminuye la capacidad de adherir plaquetas, por el contrario se encontró un incremento de la adhesión en relación al fibrinógeno control;

siendo mayor a 37°C y pH 7, lo cual podría ser debido: 1) a una exposición de sitios requeridos para la unión a receptores plaquetarios, en los fragmentos de fibrinógeno generados por acción del veneno; o 2) por activación de receptores plaquetarios involucrados en la adhesión al fibrinógeno por medio de proteasas del veneno. Deben realizarse estudios con fragmentos de fibrinógeno aislados; en presencia de inhibidores de proteasas; y tratando las plaquetas con el veneno de *S. gigantea*, para dilucidar el posible mecanismo de acción involucrado en esta respuesta.

Una vez caracterizada la actividad fibrinogenolítica del veneno de *Scolopendra gigantea*, este fue fraccionado mediante cromatografía de exclusión molecular empleando una columna Sephadex G-100, que permite separar los componentes del veneno en función de sus masas moleculares. De las 4 fracciones obtenidas, solo F3 y F4 degradaron en diferentes proporciones los tres pares de cadenas del fibrinógeno, siendo F4 la más activa, la cual degradó preferencialmente las cadenas A α del fibrinógeno. Tomando en cuenta los hallazgos obtenidos hasta este momento, se puede concluir que los componentes más activos en cuanto a su capacidad de degradar fibrinógeno son α -fibrinogenasa tipo metaloproteasa con masa molecular ≤ 20 kDa. Teniendo estos componentes fibrinogenolíticos masa molecular similar a componentes purificados de otros animales, que en general poseen masas moleculares entre 21 y 58 kDa (Swenson & Markland, 2005).

Como proyectos futuros se tratará de incrementar el número de ciempiés en cautiverio con el fin de obtener mayor cantidad de veneno que permitan realizar nuevas purificaciones del veneno de *Scolopendra gigantea*, para continuar con la caracterización de los componentes con actividad fibrinogenolítica, probar la actividad hemorrágica *in vivo* del o los componentes activos. Estimar la masa molecular, secuencia y estructura de las fibrinogenasas por medio de espectrometría de masa. Determinar el sitio de corte de los componentes activos sobre el fibrinógeno. Realizar estudios de adhesión de plaquetas pretratándola con el veneno y sus fracciones purificadas, para evaluar los posibles receptores implicados.

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES

- El veneno de *S. gigantea* no posee actividad semejante ni inhibitoria a calicreína, trombina, uroquinasa ni plasmina.
- El veneno de *S. gigantea* degrada preferencialmente las cadenas A α del fibrinógeno (α -fibrinogenasa), con condiciones óptimas: 30/30 (μ g de veneno/ μ g de Fg), 37°C, 12 horas y pH 7.
- Las α -fibrinogenasas presentes en el veneno de *S. gigantea* son de tipo metaloproteasa.
- Los componentes del veneno de *S. gigantea* inducen pérdida de la actividad coagulante del fibrinógeno.
- El veneno de *S. gigantea* incrementa la adhesión plaquetaria a las condiciones óptimas de trabajo (37°C, pH 7).
- Las α -fibrinogenasas presentes en el veneno se ubican en la fracción 4, obtenida a través de una columna Sephadex G-100, las cuales tienen masas moleculares $\leq$ 20 kDa.

BIBLIOGRAFÍA

- Apitz-Castro, R. (1995). Plaquetas, fisiología y fisiopatología en: Pérez Requejo J.L. Eds. Pub. Hematología. Caracas, Venezuela.
- Arzamendia, D., Freixaa, X., Puiga, M. & Herasa, M. (2006). Mecanismo de acción de los fármacos antitrombóticos. *Rev Esp Cardiol Supl*.6:2-10
- Azañero, M., Escobar, E. & Yarlequé, A. (2000). Purificación de una enzima proteolítica del veneno de *Bothrops brazili* y estudio de su actividad sobre fibrinógeno. *Rev. Peru. Biol.* 7(1):55-66.
- Brazón, J., Guerrero, B., D'Suze, G., Sevcik, C. & Arocha-Piñango, C. (2014). Fibrin(ogen)olytic enzymes in scorpion (*Tityus discrepans*) venom. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part B* 168:62-69.
- Bush, S., King, B., Norris, R. & Stockwell, S. (2001). Centipede envenomation. *Wilderness Environ. Med.* 12: 93-99.
- Cazorla, D., Loyo, J., Lugo, L., Acosta, M. & Morales P. (2012). Aspectos clínicos, epidemiológicos y de tratamiento de 11 casos por envenenamiento por ciempiés en Adícora, Península de Paraguaná, Estado Falcón, Venezuela. *A. Toxicol. Arg.* 20: 25-33.
- Canseco-Ávila, L., Jerjes-Sánchez, C., Ortiz-López, R., Rojas-Martínez, A. & Guzmán-Ramírez, D. (2006). Fibrinógeno ¿Factor o indicador de riesgo cardiovascular?. *Arch. Cardiol. Mex.* 76(4): 158-172.
- Choi, J., Kim, D., Park, S., Choi, B., Sapkota, K. & Kim, S. (2014). Novel thrombolytic protease from edible and medicinal plant *Aster yomena* (Kitam) Honda with anticoagulant activity: Purification and partial characterization. *Journal of Bioscience and Bioengineering.* 1-6.
- Cooper, A., Fox, G., Nelsen, D. & Hayes, W. (2014). Variation in venom yield and protein concentration of the centipedes *Scolopendra polymorpha* and *Scolopendra subspinipes*. *Toxicon.* 82:30-51.

- Coronato, S., Laguens, G. & Di Girolamo, V. (2012). Rol de las metaloproteinasas y sus inhibidores en patología tumoral. *Medicina (Buenos Aires)*. 72(6): 495-502.
- DISE (Dirección de Información Social y Estadística) (2003). Anuario de Mortalidad 2002. Ministerio del Poder Popular para la Salud. Caracas, Venezuela. Disponible en línea: http://www.mpps.gob.ve/index.php?option=com_phocadownload&view=categor&id=11:anuarios-de-mortalidad&Itemid=915. Revisado: 17-03-2015
- DISE (Dirección de Información Social y Estadística) (2004). Anuario de Mortalidad 2003. Ministerio del Poder Popular para la Salud. Caracas, Venezuela. Disponible en línea: http://www.mpps.gob.ve/index.php?option=com_phocadownload&view=categor&id=11:anuarios-de-mortalidad&Itemid=915. Revisado: 17-03-2015
- DISE (Dirección de Información Social y Estadística) (2010). Anuario de Mortalidad 2008. Ministerio del Poder Popular para la Salud. Caracas, Venezuela. Disponible en línea: http://www.mpps.gob.ve/index.php?option=com_phocadownload&view=categor&id=11:anuarios-de-mortalidad&Itemid=915. Revisado: 17-03-2015
- DISE (Dirección de Información Social y Estadística) (2011). Anuario de Mortalidad 2009. Ministerio del Poder Popular para la Salud. Caracas, Venezuela. Disponible en línea: http://www.mpps.gob.ve/index.php?option=com_phocadownload&view=categor&id=11:anuarios-de-mortalidad&Itemid=915. Revisado: 17-03-2015
- D'Suze, G., Corona, F., Possani, LD., Sevcik, C. (1996). HPLC purification and amino acid sequence of toxins from the muscarinic fraction of *Tityus discrepans* scorpion venom. *Toxicon*. 34: 591–598
- Edgecombe, G. & Giribet, G. (2007). Evolutionary biology of centipedes (Myriapoda: Chilopoda). *Annu. Rev. Entomol.* 52:151-170.

- Flores-Rivera, O., Ramírez-Morales, K., Meza-Márquez, J. & Nava-López J. (2014). Fisiología de la coagulación. *Revista Mexicana de Anestesiología* 37(2): S382-S386.
- Fuster-Lluch, O., Galindo, M., Ceña, V. & Jordán, J. (2004). Las serina proteasas y su función en los procesos de muerte neuronal. *Rev. Neurol.* 38:449-457.
- Gálvez, K. & Cortes, C. (2012). Tromboelastografía: nuevos conceptos en la fisiología de la hemostasia y su correlación con la coagulopatía asociada al trauma. *Revista Colombiana de Anestesiología.* 40(3), 224-230
- Giribet, G., Carranza, S., Riutort, M., Bagun, J. & Ribera, C. (1999). Internal phylogeny of the Chilopoda (Myriapoda, Arthropoda) using complete 18S rDNA and partial 28S rDNA sequences. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B.* 354:215-222.
- González, R.J. & García, V. (1992). Glicoproteínas de membrana plasmática de plaqueta en: Antonio López Borrasca, Carmen L. Arocha P, Celso C. Campos G., Antonio Parreira, Santiago Pavlovsky, Guillermo Ruiz A., Jesús F. San Miguel. Eds. Pub. Enciclopedia Iberoamericana de Hematología. Salamanca.
- González, A., Rodríguez-Acosta, A., Gassette, J., Ghisoll, M., Sanabria, E. & Reyes-Lugo, M. (2000). Aspectos bioecológicos de la escolopendra (*Scolopendra gigantea* LINNAEUS 1758) y la actividad histopatológica de su veneno. *Rev. Cien. FCV-LUZ.* 10:303-309.
- González-Morales, L., Diego-García, E., Segovia, L., Gutiérrez, M. & Possani, L. (2009). Venom from the centipede *Scolopendra viridis* Say: Purification, gene cloning and phylogenetic analysis of a phospholipase A2. *Toxicon.* 54:8-15.
- González-Morales, L., Pedraza-Escalona, M., Diego-García, E., Restano-Cassulini, R., Batista, C., Gutierrez, M., & Possani, L. (2014). Proteomic characterization of the venom and transcriptomic analysis of the venomous gland from the Mexican centipede *Scolopendra viridis*. *Journal of Proteomics,* 111:224–237.
- Granado, C. (2014). Perfil proteico y actividad enzimática del veneno de *Scolopendra gigantea*. Trabajo Especial de Grado. Departamento de Biología.

Facultad Experimental de Ciencias y Tecnología. Universidad de Carabobo. Venezuela.

- Guerrero, B. & Arocha-Piñango, C. (1992). Activation of human prothrombin by the venom of *Lonomia achelous* (Cramer) caterpillars. *Thrombosis Research*. 66: 169–177.
- Guerrero, B., Finol, H., Reyes-Lugo, M., Salazar, A., Sánchez, E., Estrella, A., Roschman-González, A., Ibarra, C., Salvi, I. & Rodríguez-Acosta, A. (2010). Activities against hemostatic proteins and adrenal gland ultrastructural changes caused by the brown widow spider *Latrodectus geometricus* (Araneae: Theridiidae) venom. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*. 151(1):113-121
- Guerrero, B. & López, M. (2015). Generalidades del sistema de la coagulación y pruebas para su estudio. *Invest Clin* 56(4):432–454.
- Guo, J., Zhang, R., Wang, J & Miao, L. (2013). Molecular cloning and characterization of a new cDNA encoding a trypsin-like serine protease from the venom gland of *Scolopendra subspinipes mutilans*. *Afr. J. Pharm. Pharmacol*. 7(17):1054-1060
- Gutiérrez, M., Abarca, C. & Possani, L. (2003). A toxic fraction from *Scolopendra* venom increases the basal release of neurotransmitters in the ventral ganglia of crustaceans. *Comp. Bioch. Phys. Part C*. 135: 205-214.
- Hernández, H. (2015) Aislamiento y caracterización de compuestos fibrinogenolíticos presentes en el extracto acuoso floral de *Brownea macrophylla*. Trabajo Especial de Grado. Escuela de Biología. Facultad de Ciencias. Universidad Central de Venezuela. Venezuela.
- Jarrar, B. (2010). Morphology, Histology and Histochemistry of the Venom Apparatus of the Centipede, *Scolopendra valida* (Chilopoda, Scolopendridae). *Int. J. Morphol*. 28(1):19-25.
- Jim, R. (1957). A study of the plasma thrombin time. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*. 50:45-60

- Kazimírová, M., Viera, J., Petříková, M., Takáč, P., Labuda, M. & Nosál, R. (2002). An Inhibitor of Thrombin-Stimulated Blood Platelet Aggregation from the Salivary Glands of the Hard Tick *Amblyomma variegatum* (Acari: Ixodidae). *Experimental & Applied Acarology*. 28:1, 97–105.
- Kang, S., Choi, J., Kim, D., Park, S., Sapkota, K., Kim, S. & Kim, S. 2016. A bifunctional protease from green alga *Ulva pertusa* with anticoagulant properties: partial purification and characterization. *J Appl Phycol*. 28(1): 599-607.
- Kenneth, K., Marshall, A., Beutler, E., Kipps, T., Seligsohn, U. & Prchal, J. (2010). Williams Hematology. McGraw-Hill. Eighth Edition. California, USA.
- Kimura, L., Prezotto-Neto, J., Fernandes, B. Antoniazzi, M., Knysak, I., Gióia, S., Larami, M. & Barbaro, C. (2013). Local inflammatory reaction induced by *Scolopendra viridicornis* centipede venom in mice. *Toxicon*. 76:239–246.
- Kong, Y., Hui, J., Shao, Y., Huang, S., Chen, H., & Wei, J. (2013a). Cytotoxic and anticoagulant peptide from *Scolopendra subspinipes mutilans* venom. *Afr. J. Pharm. Pharmacol*. 7(31), 2238-2245.
- Kong, Y., Huang, SL., Shao, Y., Li, S. & Wei, JF. (2013b). Purification and characterization of a novel antithrombotic peptide from *Scolopendra subspinipes mutilans*. *J. Ethnopharmacol*. 145:182-186.
- Laemmli, U. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 227:680–685.
- Levy, J., Szlam, F., Tanaka, K. & Sniecinski, R. (2012). Fibrinogen and Hemostasis: A Primary Hemostatic Target for the Management of Acquired Bleeding. *International Anesthesia Research Society*. 114: 261-274.
- Lee, W., Lee, J., Kulkarni, R., Kim, M., Hwang, J., Na, M. & Bae, J. (2016). Antithrombotic and antiplatelet activities of small-molecule alkaloids from *Scolopendra subspinipes mutilans*. *Sci. Rep*. 6, 21956.
- Lijnen, H., Van Hoef, B., Roelants, I. & Collen, D. (2000). Fibrin(ogen) degradation by a 24kendopeptidase from a *Chryseobacterium* sp. *Fibrinolysis & Proteolysis*. 14: 247-252.

- Liu, Z., Zhang, R., Zhao, F., Chen, Z., Liu, H., Wang, Y., Jiang, P., Zhang, Y., Wu, Y., Ding, J., Lee, W. & Zhang, Y. (2012). Venomic and Transcriptomic Analysis of Centipede *Scolopendra subspinipes dehaani*. *J. Proteome Res.* 11:6197–6212
- Malta, M., Lira, M., Soares, S., Rocha, G., Knysak, I., Martins, R., Guizze, S., Santoro, M. &Barbaro, K. (2008). Toxic activities of brazilian centipede venoms. *Toxicon.* 52:255-263.
- Markland, F. (1998). Snake venom fibrinogenolytic and enzymes: An updated inventory. *Thrombosis and Haemostasis*, 79:668-674.
- Marsh, N. & Arocha-Piñango, C.L. (1972). Evaluation of the plate method for estimating plasminogen activators. *Thromb. Diath. Haemorrh.* 28, 75–88.
- Marchi, R. (2012). Fibrinogen and fibrin: Structure and Functional Aspects. In: Thrombin: Function and Pathophysiology. Nova publisher. OpenAccess.
- Mavridis, I., Meliou, M. & Pyrgelis, E. (2016). Clinical consequences of centipede bite: Is it neurotoxic?. *World J Neurol.* 6(2):23-29.
- Menéndez, E., Rubio, S. & Sánchez, M. (2011). Visión moderna de la hemostasia: nuevo modelo de coagulación. Asociación Española de Biopatología Médica. Madrid, España.
- Mohamed, A., Abu-Sinna, G., El-Shabaka, H. & El-Aal, A. (1983). Proteins, lipids, lipoproteins and some enzyme characterizations of the venom extract from the centipede *Scolopendra morsitans*. *Toxicon.* 21:371-377.
- Molinari, J., Gutiérrez, E., De Ascensão, A., Nassar, J., Arends, A. & Márquez, R. (2005). Predation by Giant Centipedes, *Scolopendra gigantea*, on Three Species of Bats in a Venezuelan Cave. *Caribbean J Sci.* 41:340-346.
- Monzón-Muñoz, F. & Blasco-Gil, R. (1997). Patología causada por artrópodos de interés toxicológico y alergológico. Los Artrópodos y el Hombre. *Bol. S.E.A.* 20:193-215.

- Mory, R., Mindell, D. & Bloom, D. (2000). The Leech and the Physician: Biology, Etymology, and Medical Practice with *Hirudinea medicinalis*. *World J. Surg.* 24, 878–883.
- Muñoz, B., Valladares, M. & Gutiérrez, M. (2005). Aislamiento y caracterización del péptido responsable de la actividad hialuronidasa presente en el veneno del ciempiés (*Scolopendra viridis* Say, 1821). XI Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería. Sociedad Mexicana de Biotecnología y Bioingeniería. México.
- Ozsarac, M., Karcioğlu, O., Ayrik, C., Somuncu, F. & Gumrukcu, S. (2001). Acute coronary ischemia following centipede envenomation: Case report and review of literature. *Wilderness Environ. Med.* 15:109-112.
- Paes, A., Prezoto, B., Yamashiro, E., Bertholim, L., Tashima, A., Klitzke, C., Camargo, A. & Serrano S. (2008). Bothrops protease A, a unique highly glycosylated serine proteinase, is a potent, specific fibrinogenolytic agent. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 6: 1363–1372.
- Palomo, I., Pereira, J. & Palma, J. (2005). Hematología, Fisiopatología y Diagnostico. Editorial Universidad de Talca. Talca, Chile.
- Parrilla-Alvarez, P., Navarrete, L., Girón, M., Aguilar I., & Rodríguez-Acosta, A. (2008). Use of hen egg derived immunoglobulin against scolopendra (*Scolopendra gigantea*) venom. *Rev. Cien. FCV-LUZ*. 18:385-392.
- Patel, G., Kawale, A. & Sharma, A. (2012). Purification and physicochemical characterization of a serine protease with fibrinolytic activity from latex of a medicinal herb *Euphorbia hirta*. *Plant Physiology and Biochemistry*. 52: 104-111.
- Pereira, B. (2011). Efecto de componentes presentes en el extracto acuoso de flores de *Brownea macrophylla* (Fabaceae) sobre el sistema hemostático. Trabajo Especial de Grado. Departamento de Biología. Facultad Experimental de Ciencias y Tecnología. Universidad de Carabobo. Venezuela.

- Pereira, B. & Brazón, J. (2015). Aqueous extract from *Brownea grandiceps* flowers with effect on coagulation and fibrinolytic system. *Journal of Ethnopharmacology*. 160:6-13.
- Peng, K., Kong, Y., Zhai, L., Wu, X., Jia, P., Liu, J. & Yu, H. (2009). Two novel antimicrobial peptides from centipede venoms. *Toxicon*. 55:274-279.
- Pinto, A., Dobrovolski, R., Veiga, A. & Guimarães, J. (2004). Lonofibrase, a novel α -fibrinogenase from *Lonomia obliqua* caterpillars. *Thrombosis Research*. 113:147-154.
- Rajesh, R., Raghavendra, C., Nataraju, A., Dhananjaya, B., Kemparaju, K. & Vishwanath, B. (2006). Procoagulant activity of *Calotropis gigantea* latex associated with fibrin(ogen)olytic activity. *Toxicon*. 46: 84-92.
- Rates, B., Bemquerer, M., Richardson, M., Borges, M., Morales, R., De Lima, M. & Pimenta, A. (2007). Venomic analyses of *Scolopendra viridicornis nigra* and *Scolopendra angulata* (Centipede, Scolopendromorpha): Shedding light on venoms from a neglected group. *Toxicon*. 49:810-826.
- Rodríguez-Acosta, A., Gassette, J., González, A. & Ghisoli, M. (2000a). Envenomation in a newborn. *Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo*. 42: 341- 342.
- Rodríguez-Acosta, A., Ghisoli, M., Gassette, J., González, A. & Reyes, M. (2000b). Venezuelan outbreak of venomous accidents produced by centipedes (*Scolopendra gigantea* Linnaeus 1758) (Scolopendromorpha: Scolopendrinae). *Acta Biol Venez.* 20:67-70.
- Rondón, J. (1992). Evaluación de la hemostasis. 12(1):21–56.
- Sánchez, E. (2004). Desintegrinas en Veneno de Serpientes: un nuevo enfoque en el tratamiento de las enfermedades Cardiovasculares, Cáncer, Diabetes. *Revista de la Facultad de Medicina*. 27(1):10-14.
- Serinken, M., Erdur, B., Sener, S., Kabay, B. & Alper, C. (2005). A case of mortal necrotizing fasciitis of the Trunk resulting from a centipede (*Scolopendra morsitans*) Bite. *Internet J. Emergency Med*. 2:1-8.

- Siritapetawee, J., Thumanu, K., Sojikul, P. & Thammasirirak, S. (2012). A novel serine protease with human fibrino(geno)lytic activities from *Artocarpus heterophyllus* latex. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1824: 907–912.
- Swenson, S. & Markland, F. (2005). Snake venom fibrin(ogen)olytic enzymes. *Toxicon*. 45:1021–1039
- Tennent, G., Brennan, S., Stangou, A., O’Grady, J., Hawkins, P. & Pepys, M. (2007). Human plasma fibrinogen is synthesized in the liver. *Blood*. 109(5), 1972-1974.
- Toros, H., Castellanos, R. & Fernández-Britto, J. (2005). Fibrinógeno y riesgo trombótico cardiovascular: algunas reflexiones. *Rev Cubana Invest Biomed*. 24(3).
- Trisina, J., Sunardi, F., Suhartono, M. & Tjandrawinata, R. (2011). DLBS1033, A Protein Extract from *Lumbricus rubellus*, Possesses Antithrombotic and Thrombolytic Activities. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*. 2011: 1-7.
- Undheim, E. & King, G. (2011). On the venom system of centipedes (Chilopoda), a neglected group of venomous animals. *Toxicon*. 57:512-524.
- Undheim, E., Fry, B. & King, G. (2015). Centipede venom: recent discoveries and current state of knowledge. *Toxins*. 7:679–704.
- Undheim, E., Jenner, R. & King, G. (2016). Centipede venoms as a source of drug leads. *Expert Opinion on Drug Discovery*, DOI: 10.1080/17460441.2016.1235155
- Veiga, A., Pinto, A. & Guimarães, J. (2003). Fibrinogenolytic and procoagulant activities in the hemorrhagic syndrome caused by *Lonomia obliqua* caterpillars. *Thrombosis Research*. 111:95-101.
- Yang, S., Liu, Z., Xiao, Y., Li, Y., Rong, M., Liang, S., Zhang, Z., Yu, H., King, G. & Lai, R. (2012). Chemical punch packed in venoms makes centipedes excellent predators. *Mol. Cell. Prot.* 11: 640-650.

- Yildiz, A., Biçeroglu, S., Yakut, N., Blir, C., Akdemir, R., & Akili, A. (2006). Acute myocardial infarction in a young man caused by centipede sting. *Emerg. Med. J.* 23:1-3.
- You, W., Sohn, Y., Kim, K. ., Park, D., Jang, Y. & Chung, K. (2004). Purification and molecular cloning of a novel serine protease from the centipede, *Scolopendra subspinipes mutilans*. *Insect Biochem Mol Biol.* 34(3):239-250
- Yunusova, E., Sadykov, E., Shkinev, A. & Sultanalieva, N. (2013). ISOLATION AND CHARACTERISTICS OF -FIBRINOGENASE VENOM FROM *Naja oxiana*. *Chemistry of Natural Compounds.* 49(4):712-715.
- Weisel, J. (2005). Fibrinogen and fibrin. *Adv Protein Chem.* 70:247-299.
- Wenhua, R., Shuangquan, Z., Daxiang, S., Kaiya, Z. & Guang, Y. (2006). Induction, purification, and characterization of an antibacterial peptide scolopendrin I from the venom of centipede *Scolopendra subspinipes mutilans*. *Indian J. Bioche. & Biophy.* 43,88-93.