

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA - Literature Review

MEDICINA DEL FUTURO EN LOS VENENOS DE ANIMALES. ECUADOR COMO FUENTE IMPORTANTE DE INVESTIGACIÓN.

Alemán Iñiguez Juan Miguel (1), Mora Bravo Franklin Geovanny (2)

(1) Interno rotativo del Hospital Jose Carrasco Arteaga, Universidad de Cuenca, Facultad de Ciencias Médicas, Escuela de Medicina, (2) Jefe del servicio de Nefrología del Hospital José Carrasco Arteaga, Docente de la Universidad de Cuenca y Universidad del Azuay

Correspondencia: juanmig_18@hotmail.com

Fecha de Recepción: 25/07/2014
Fecha de Aprobación: 03/12/2015

RESUMEN

La evolución ha permitido que varios animales produzcan secreciones para su supervivencia: los venenos, aquellos que son dañinos y letales cuando ejercen sus efectos en el organismo, modifican las respuestas normales como por ejemplo la coagulación y el proceso inflamatorio. Presentamos una revisión bibliográfica actualizada de los venenos que pueden ser empleados y así explicar cómo estas sustancias pueden representar una terapéutica en el futuro; de la misma manera describimos la situación de nuestro país que puede ser fuente de investigación en este tema.

Palabras Clave: venenos, Ponzañas, Biología Molecular, Terapéutica, Efectos Metabólicos Secundarios de Drogas y Sustancias

ABSTRACT

The evolution has allowed that several animals produce secretions for their survival: poisons, those that are harmful and lethal when they exert their effects on the body, altering the normal responses such as the coagulation and the inflammatory process. An updated literature review of poisons is presented which can be employed to explain how these substances can represent a future therapy; in the same way our country situation is described because it could be a source of research on this topic.

Keywords: poison, Venoms, Molecular Biology, Therapeutics, Efectos Metabólicos Secundarios de Drogas y Sustancias.

INTRODUCCIÓN

Los venenos de animales son mezclas complejas de proteínas, péptidos, enzimas y elementos no proteicos tales como carbohidratos y sales, cuya finalidad es inmovilizar la presa y comenzar a digerirla; algunos de éstos han sido descritos como toxinas letales, o se les han atribuido acciones potentes sobre proteínas específicas como por ejemplo, las involucradas en la coagulación sanguínea (1). Debido al descubrimiento en 1971 del péptido que dio origen al captopril y al entendimiento de los efectos potenciales de las toxinas, se empezó a considerar que los venenos de animales son fuentes ricas en compuestos bioactivos que no solo proporcionan las herramientas necesarias para descifrar los detalles moleculares de diversos procesos fisiológicos, sino que también sirven como fuente de desarrollo de agentes terapéuticos¹. En nuestro trabajo expondremos la aplicación de nuevas alternativas terapéuticas y de modelos para el diseño de las mismas, basados en moléculas aisladas de venenos de animales con alto potencial en la biomedicina.

Descripción de la biología del veneno y su síntesis

Un animal venenoso es aquel que posee glándulas para producir veneno y cuenta con estructuras como colmillos, espinas o aguijones por los cuales lo transmite. Estas sustancias son moléculas grandes de naturaleza proteínica y muchas de ellas termolábiles que por sus propiedades físicas y químicas pueden provocar alteraciones orgánicas o funcionales (2).

Importancia del estudio de venenos animales
El estudio de los venenos de animales en la medicina se fundamenta en cuatro características: 1) Constituyen la fuente de enzimas más concentrada en la naturaleza. 2) Las enzimas que contienen son habitualmente muy estables y capaces de actuar dentro de una escala muy amplia de condiciones experimentales. 3) Tratándose de una secreción presenta ventajas frente a otros materiales como fuente de extracción de enzimas. 4) Disponibilidad de preparaciones comerciales, que han facilitado la obtención de los mismos.

Así mismo, el estudio de los venenos de los animales ha seguido dos líneas principales: a) La elucidación de sus efectos fisiofarmacológicos y tóxicos para la creación de antídotos. b) El hecho de que los venenos atacan específicamente complejos químicos y reacciones claves en los organismos, los convierten en elementos de considerable utilidad con fines terapéuticos (3).

Toxinas y enzimas biológicas

El conocimiento del mecanismo acción de toxinas y enzimas biológicas, ha significado la construcción de investigaciones con evidencias que posibilitan el desarrollo de fármacos con utilidades en patologías como: diabetes, hipertensión arterial, cáncer, enfermedades autoinmunes, entre otras (4). A continuación se describen algunos ejemplos del mecanismo de acción sobre algunas funciones moleculares:

1. Las neurotoxinas actúan como bloqueadores en los canales de Na⁺ dependientes de voltaje y en consecuencia impiden la propagación del impulso nervioso paralizando las células musculares (4); por otro lado las anatoxinas pueden ser competidoras de la acetilcolina (AcCo). La anatoxina A compete con la AcCo por el receptor nicotínico, se une a él, lo activa y no es degradada por la acetilcolinesterasa; permanece activa, el receptor se encuentra estimulado de forma permanente con contracción prolongada del músculo (5), produciendo parálisis muscular flácida o espástica.

2. Las cardiotoxinas son agentes alquilantes que aumentan el estrés oxidativo y radicales libres produciendo apoptosis celular; la más importante es la cardiotoxina III que puede inducir apoptosis en células K562 por medio de la liberación de citocromo C (6,7). Los efectos cardiotóxicos son: la disminución del gasto cardíaco, arritmias, alargamiento del segmento QT y fenómeno de Torsade Points⁸.

3. Las miotoxinas son péptidos pequeños, obedecen a un mecanismo no-enzimático que producen severa necrosis muscular, actúan rápidamente, causando parálisis instan-

tánea pudiendo llevar a la muerte por falla respiratoria dependiente de los músculos respiratorios (9,10, 11).

4. Las toxinas activadoras de la coagulación sanguínea son: a) Coagulantes.- la protrombina y de los factores V y X de la coagulación, su peor efecto es el daño generalizado del endotelio provocando coagulación vascular diseminada (CID), por consumo de fibrinógeno. b) Anticoagulantes.- son activadoras de la proteína C e inhibidoras de la formación del complejo protrombina, fosfolipasas A2, enzimas fibrinogenolíticas o fibrinolíticas⁹, un ejemplo de este grupo es el anticoagulante lúpico, prueba diagnóstica para el Síndrome Antifosfolipídico, se basa en cambios que produce el veneno de la víbora de Russell diluida (DRVVT) sobre el suero sanguíneo del paciente (12).

Los anticoagulantes aislados de venenos de animales, son quizás el logro más ampliamente utilizado por la farmacología, por lo que en el siguiente apartado se citan ejemplos de estas moléculas:

a. Las enzimas conocidas por la sigla SVTLE (del inglés snake venom thrombin-like enzymes), imitan los efectos de la trombina al clivar los fibrinopéptidos A y B (FPA y FPB); por ello, sin la hidrólisis de ambos fibrinopéptidos estas enzimas no son capaces de activar el factor XIII por lo que el sistema fibrinolítico hidroliza fácilmente los coágulos formados por ellas. Las SVTLE más utilizadas son la batroxobina, aislada de *Bothrops atrox* (Reptilase®, Pentapharm, Basilea, Suiza) y el ancrod (Viprimex®, Knoll, Ludvisgshafen, Alemania), aislada de *Callosellasma rhodostoma*; ésta última ha sido efectiva en el tratamiento de accidentes cerebrovasculares isquémicos (13). Por otro lado, la batroxobina se usa para propósitos diagnósticos: en química clínica existe el tiempo de reptilasa (Reptilase®, Pentapharm, Basilea, Suiza) como alternativa al tiempo de trombina en muestras que contienen heparina. La fibrolasa aislada de *Agkistrodon contortrix* puede degradar ambas cadenas de la fibrina (á y â) y tiene potencial como agente trombolítico (14). En 2006 se produjo y fue sometida a estudios clínicos la Alfimeprasa® (Bayer Health Care, una forma recombinante de la fibrolasa) (15). Actualmente se encuen-

tra en la cuarta fase de los estudios clínicos como candidata para el tratamiento de oclusiones arteriales periféricas (16).

b. Los activadores de la protrombina están en investigación de sus mecanismos, aún no se identifican por completo sin embargo, se conocen sus efectos que tienen relación con la necesidad de cofactores. Se ha clasificado a estas proteínas en cuatro grandes grupos:

- Activadores del grupo A: son las metaloproteasas que no dependen de cofactores para activar la protrombina; una de las más estudiadas de este grupo es la ecarina aislada de *Echis carinatus* (17).

- Las del grupo B son proteínas formadas por dos subunidades que interactúan de forma no covalente y cuya activación requiere Ca^{2+} ; a este grupo pertenece la carinactivasa de *E. carinatus* (18).

- Los activadores del grupo C son serinoproteasas con un peso molecular aproximado de 300 KDa, cuya activación requiere Ca^{2+} y fosfolípidos; estas enzimas se encuentran en serpientes australianas de la familia Elapidae y las más estudiadas son las obtenidas de *Oxiuranus scutellatus* (19,20) y la de *Pseudonaja textilis* (21,22).

- Activadores del grupo D requieren, además de Ca^{2+} y fosfolípidos, el factor V de la cascada de coagulación; estas proteínas son homólogos estructurales del factor X. Los activadores de la protrombina tienen varias aplicaciones: se usan en la preparación de meizotrombina (uno de los productos principales de la activación de la protrombina), en la obtención de formas no enzimáticas de trombina y meizotrombina y en estudios de hidrólisis de protrombina (23).

c. Activadores de los factores V y X de la cascada de coagulación. El veneno de la víbora de Russell (*Doboia russelli*) posee proteínas que activan estos dos factores de la coagulación. La molécula con preferencia por el factor V es una serinoproteasa conocida como RVV-V (del inglés Russell viper venom V), cuya secuencia de aminoácidos está definida (24). Se puede utilizar el RVV-V (Pentapharm, Basilea, Suiza) en ensayos de rutina

del factor V, dada su alta selectividad para la activación de tal factor (25). Por el contrario, del activador del factor X conocido como RVVX (del inglés Russell Viper Venom X), también comercializado por la compañía Pentapharm, se sabe que su estructura incluye un dominio de desintegrina y otro de metaloproteasa, que activa directamente el factor X; además, se ha empleado para cuantificar tal factor de la coagulación (26) y es muy útil en los ensayos para diferenciar entre las deficiencias de los factores VII y X (25). En estudios recientes se aislaron dos activadores del factor X del veneno de *Vipera ammodytes ammodytes*, con un alto potencial para el tratamiento de pacientes con disfunción de los factores IXa o VIIIa.

5. Toxinas con actividad analgésica: en este grupo se encuentra la analgesina, aislada de la cobra real (*Ophiophagus hannah*), esta toxina se une a los receptores de opioides causando una analgesia 2 700 veces más fuerte que la de la morfina; además, su efecto fue bloqueado por la naloxona (antago-

nista de dichos receptores), hecho que ratifica su acción sobre los mismos (27, 28).

Recientemente se aisló de la serpiente cascabel suramericana *Crotalus durissus terrificus*, otro péptido que ejerce su acción sobre estos blancos moleculares, recibió el nombre de crotalfina. Dicha molécula presentó una fuerte actividad analgésica y antinociceptiva en modelos de dolor neuropático y además, fue activa por las vías oral, intravenosa e intraplantar en ratones; se demostró que su acción era mediada por la activación de los receptores opioides tipo μ (29, 30).

Como se revisó, varias son las especies de animales que portan toxinas con propiedades moleculares altamente específicas en la fisiología de la analgesia, metabolismo, inflamación; etc.; se destaca su exclusiva especificidad a la diana farmacológica determinada siendo que sus acciones son reversibles con antídotos y su dosificación. (Figura No. 1 y Tabla No. 1).

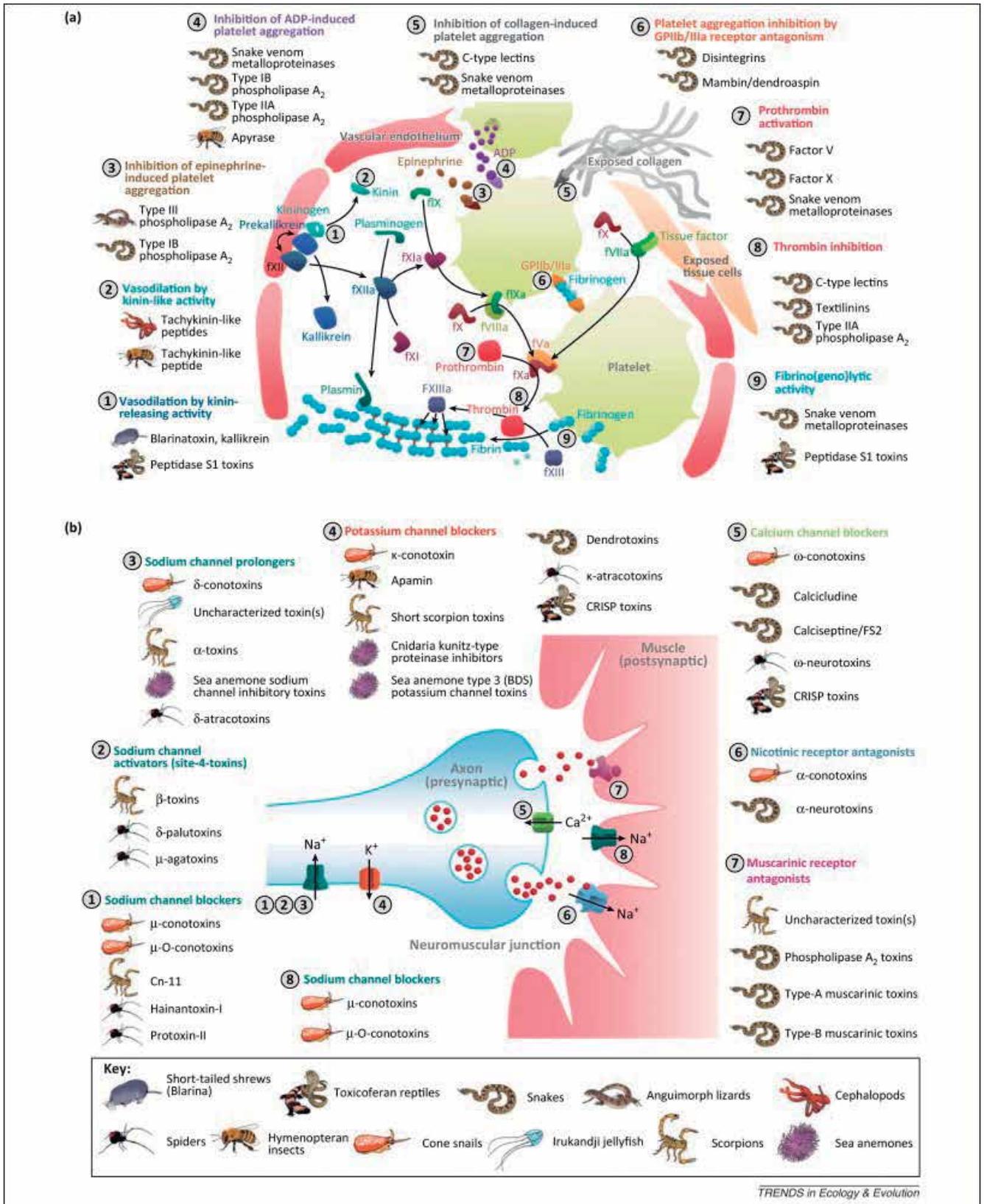


Figura No. 1: Esquema del total de especies cuyos venenos tienen dianas farmacológicas: a) Dianas en la cascada de coagulación y b) en la unión neuromuscular (Tomado de: Nicholas R. Casewell^{1, 2} (2013). Complex cocktails: the evolutionary novelty of venoms. Trends in Ecology and evolution)

Tabla N°1: Utilidad de las toxinas más importantes de la coagulación. (Autor: Juan Miguel Alemán I. Basado en: Pereáñez Jiménez Jaime Andrés, V. M. (2009). Toxinas de serpientes con alto potencial terapéutico y su uso en la biomedicina.)

SUSTANCIA	MECANISMO DE ACCIÓN	EFEECTO	USO FARMACOLÓGICO
TOXINAS ANTICOAGULANTES			
Batroxobina, aislada de <i>Bothrops atrox</i>.	Enzimas con acción similar a la trombina, no activan el factor VII	Trombolíticos	Reptilase®, Pentapharm, (Basilea, Suiza) Alternativa al tiempo de trombina en muestras que contienen heparina. Tratamiento de oclusiones arteriales periféricas.
Toxina aislada de <i>Callosellasma rhodostoma</i>	Enzimas con acción similar a la trombina, no activan el factor VII	Trombolíticos	Ancrod, Viprimex®, (Knoll, Ludvisgshafen, Alemania), tratamiento de accidentes cerebrovasculares isquémicos.
Fibrolasa, aislada de <i>Agkistrodon contortrix</i>	Degradar ambas cadenas de la fibrina.	Trombolíticos	Alfimeprasa®(Bayer Health Care),
RVV-V (Pentapharm, Basilea, Suiza).	Alta selectividad para la activación de tal factor V	Trombogénesis	Dosificación del factor V.
RVVX (del inglés Russell Viper Venom X), Pentapharm, Suiza	Activador del factor X	Trombogénesis	Cuantificar tal factor X de la coagulación y es muy útil en los ensayos para diferenciar entre las deficiencias de los factores VII y X.
Activadores del factor X del veneno de <i>Vipera ammodytes ammodytes</i>.	Activador del factor X	Trombogénesis	Con un alto potencial para el tratamiento de pacientes con disfunción de los factores IXa o VIIa.
TOXINAS CON ACTIVIDAD ANALGÉSICA			
Annalgésina aislada del veneno de la cobra real (<i>Ophiophagus hannah</i>).	Activación de los receptores opioides	Causa una analgesia 2.700 veces más fuerte que la morfina.	En estudio dolor crónico neuropático
La crotalina aislada del veneno de la cascabel suramericana <i>Crotalus durissus terrificus</i>	Activación de los receptores opioides tipo δ .	Actividad analgésica y antinociceptiva	En estudio dolor crónico neuropático

Banco o biblioteca mundial de toxinas

En la Universidad de Chicago, Zoltan Takacs, inventó la tecnología del diseño de toxinas para crear las bibliotecas de toxinas. Cada una contiene miles de millones de toxinas animales nativas y artificiales utilizando la genómica computacional, veneno de animales y métodos moleculares. Las bibliotecas son examinadas en un objetivo - una molécula, que decide el destino de una enfermedad. La única toxina que es más específica para diana farmacológica se aísla, se somete a verificación farmacológica, y se convierte en una plantilla de drogas. Es como probar un

millón de llaves a la vez y elegir la que abre un candado para una cerradura que nadie tenía la llave antes. El control de la cerradura significa tener control sobre la enfermedad³.

Biología molecular en la obtención de las toxinas medicamentosas

La primera etapa del proceso consiste en identificar el ácido mitocondrial desoxirribonucleico (ADN) de las diferentes especies de animales venenosos amplificado por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Luego se visualiza por tinción con bromuro de etidio e iluminación UV. (Fig. 2).

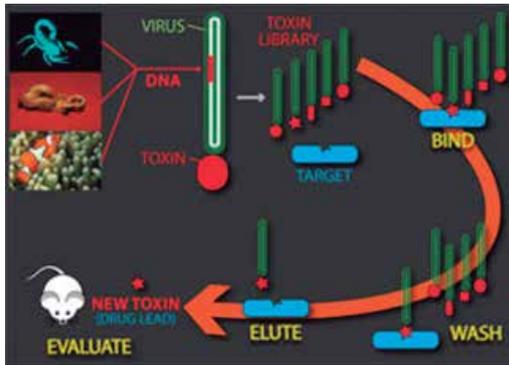


Figura N°2: Fases para evaluar la toxina desde que es extraída hasta que se inocula en ratones. (Tomado de: Takacs, Z. (2010). Zoltan Takacs Venom Explorations.)

Con una precisión extrema, las toxinas apuntan a objetivos vitales como el control de los mecanismos de señalización del nervio al músculo, la circulación de la sangre o de coagulación. A menudo, los objetivos mismos están implicados en enfermedades. Así cuidadosa domesticación de tales objetivos con toxinas o moléculas derivadas de la toxina tiene un efecto terapéutico.

Las toxinas en animales son la fuente de una extraordinaria variedad de productos farmacéuticos: alrededor de 12 medicamentos para tratar los ataques del corazón (Integrilin® y Aggrastat), presión arterial alta (Captopril®), la diabetes (Byetta®), y el dolor del cáncer (Prialt®) con ventas de más de un billón de dólares al año 10. Otras toxinas se encuentran en ensayos clínicos para tratar tumores cerebrales, insuficiencia cardíaca, y trastornos autoinmunes. El fundamento de este éxito es que los animales sintetizan toxinas que evolucionaron hace 400 millones de años para matar a sus presas y depredadores; por lo tanto son las moléculas más específicas de la naturaleza destinadas a objetivos en órganos clave desde el corazón hasta el sistema nervioso, plantillas ideales para fármacos. Sin embargo, la mayoría de las toxinas de la naturaleza permanece aún inexplorada³⁰. (Tabla No. 2).

Tabla N°2: Utilidad de toxinas (Autor: Pedro José Alemán I. Basado en: Pereáñez Jiménez Jaime Andrés, V. M. (2009). Toxinas de serpientes con alto potencial terapéutico y su uso en la biomedicina)

ESPECIE	FÁRMACO	PRINCIPIO ACTIVO O TOXINA	MECANISMO DE ACCIÓN	APLICACIÓN MÉDICA
Yayará brasileña	Captopril	Factor de potenciación de la bradiquinina	Disminución de los niveles séricos de angiotensina II y aldosterona	Hipertensión y la insuficiencia cardíaca
Mamba verde del Congo	-----	Calcicludina	Inhíbe los canales de calcioactivados de alto potencial	Cardiopatías
Monstruo de Guila	Exenatide	Exendina-4	Mejora la secreción de insulina por las células beta pancreáticas, suprime la secreción de glucagón, y retarda el vaciado gástrico	Diabetes mellitus II
Escorpión azul	Escozul	Toxina del escorpión azul	Inhíbe la proteasa, una enzima que rodea como una membrana todo tipo de cáncer	Evita desarrollo tumoral
Murciélago vampiro	-----	Desmoteplasa	Se dirige a la fibrina (el andamio estructural de los coágulos y trombos sanguíneos) y la destruye.	Trombosis

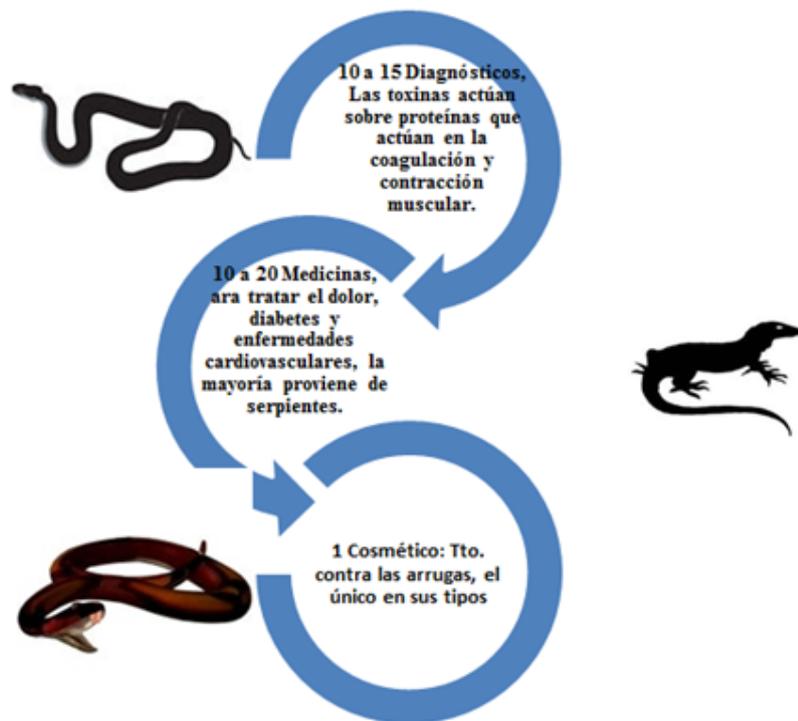


Gráfico N°3: Los productos del veneno (Autor: Juan Miguel Alemán I. Modificado de: Zoltan Tacaks. Biblioteca mundial de toxinas)

Banco o biblioteca mundial de toxinas

En la Universidad de Chicago, Zoltan Takacs, inventó la tecnología del diseño de toxinas para crear las bibliotecas de toxinas. Cada una contiene miles de millones de toxinas animales nativas y artificiales utilizando la genómica computacional, veneno de animales y métodos moleculares. Las bibliotecas son examinadas en un objetivo - una molécula, que decide el destino de una enfermedad. La única toxina que es más específica para diana farmacológica se aísla, se somete a verificación farmacológica, y se convierte en una plantilla de drogas. Es como probar un

millón de llaves a la vez y elegir la que abre un candado para una cerradura que nadie tenía la llave antes. El control de la cerradura significa tener control sobre la enfermedad³.

Biología molecular en la obtención de las toxinas medicamentosas

La primera etapa del proceso consiste en identificar el ácido mitocondrial desoxirribonucleico (ADN) de las diferentes especies de animales venenosos amplificado por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Luego se visualiza por tinción con bromuro de etidio e iluminación UV. (Fig. 2).

Tabla N°3: Utilidad de toxinas en el Ecuador

	Yarará	Hemotoxinas
SERPIENTES	Equis	Hemotoxinas
	Coral	Neurotoxinas
ARÁCNIDOS	Viuda negra	Neurotoxinas
	Araña de casa	Hemotoxinas
	Tarántula	Neurotoxinas
RANAS	<i>Epipedobates tricolor</i>	Epipedobatidina
	Rana mono	Deltorfina y la Demorfina

(Autor: Juan Miguel Alemán I. Basado en: [http://demedicina.com/venenos-para-curar/.](http://demedicina.com/venenos-para-curar/))

Las aplicaciones generales de los venenos de serpientes, ya eran usadas por las tribus de la Amazonía, en sus dardos para adormecer a los animales; en la comunidad médica se usaba para lograr una relajación muscular.

Dentro de la gran variedad de sustancias aisladas en especies de animales de Ecuador, se destaca en concreto la que proviene de la rana mono, ya que de su veneno se han conseguido dos compuestos que pueden ser muy importantes en el tratamiento de enfermedades como la isquemia, el párkinson, el cáncer o la depresión: los compuestos son la deltorfina y la demorfina, con alta especificidad sobre las sinapsis neuronales y sobre la cascada de coagulación³⁰.

Diseño de investigaciones. Ecuador en la biblioteca mundial de toxinas

La biblioteca de toxinas de Zoltan Takacs también ha realizado investigaciones en nuestro país donde destaca sobre todo una especie que es la rana *Epipedobates anthony* que solo se la encuentra en el Ecuador y es endémica de las provincias de Loja y Zamora Chinchipe; ésta contiene una sustancia llamada epipedobatidina la cual es de 200 a 400 veces más potente que la morfina y no produce adicción ni toxicidad en seres humanos, por lo que se está investigando en la generación de medicamentos y analgesia intratecal con gran éxito.

La necesidad de dilucidar la estructura, la actividad y los blancos farmacológicos de las toxinas conducirá a entender mejor el papel de algunas proteínas blanco en los procesos fisiológicos y a desarrollar nuevos fármacos dirigidos hacia la activación o inhibición de procesos fisiológicos específicos.

El estudio de los venenos de animales y especialmente el de sus toxinas, se convierte en una estrategia que aportará excelentes beneficios terapéuticos; el posible descubrimiento y caracterización de nuevas toxinas podría llevar a la descripción de nuevos blan-

cos farmacológicos tomando como punto de partida toda la información estructural y funcional disponible y el uso de técnicas como la biología molecular.

Un hecho importante es la aplicación de la bioética en especial en cuanto a los derechos de los animales y la naturaleza; actualmente existen técnicas que no perjudican el hábitat ni la integridad del sujeto de estudio; el proceso de estudio de los venenos es complejo y tiene niveles de investigación donde el primero es la creación de modelos moleculares de interacción y con estos dilucidar una fisiopatología y modificarlos con este efecto. Finalmente, por su complejidad y riqueza en moléculas bioactivas, los venenos poseen un gran potencial como fuente de agentes terapéuticos, propiedad que se debe aprovechar al máximo.

El Ecuador y su biodiversidad de animales venenosos ofrece una gran fuente aun inexplorada de conocimientos, las contadas investigaciones extranjeras sobre todo de la biblioteca mundial de toxinas, describe particulares beneficios exitosos, por lo tanto, si se diseñaran estudios propios, se podrían obtener resultados innovadores que solucionarían enfermedades que aún no poseen tratamiento completo ya que los venenos poseen capacidades analgésicas, inmunomoduladoras, hematológicas, neurodinámicas, cardiodinámicas y endocrinológicas, de gran utilidad en la creación de medicamentos como fuente nueva y muy diferentes de las sustancias activas obtenidas en la plantas. En definitiva, la investigación de venenos animales abre un campo totalmente nuevo, recordando que estas sustancias tienen más de 400 millones de años de evolución; la propia naturaleza las ha dotado de una increíble especificidad que abre una posibilidad grande hacia la medicina del futuro tanto en la terapéutica como en el diagnóstico de un sin número de enfermedades inclusive aquellas raras como el déficit de un factor determinado de la coagulación.

BIBLIOGRAFÍA

1. Emily S. W. Wong, K. Belov. Venom evolution through gene duplications. *Gene*. 2012, 496(1): 1–7.
2. Fry BG, Undheim EAB, Ali SA, et al. Squeezers and Leaf-cutters: Differential Diversification and Degeneration of the Venom System in Toxicoferan Reptiles. *Molecular & Cellular Proteomics : MCP* 2013; 12(7):1881-1899.
3. Hargreaves A., Swain M., Hegarty M., Logan D, Mulley J. Restriction and recruitment-gene duplication and the origin and evolution of snake venom toxins. *Genome Biol Evol*. 2014; 6(8):2088-95.
4. Cestele S, Yarov-Yarovoy V, Qu Y, Sampieri F, Scheuer T, Catterall WA. Structure and function of the voltage sensor of sodium channels probed by a beta-scorpion toxin. *J Biol Chem*, 2006; 281:21332-21344.
5. Purkerson SL, Baden DG, Fieber LA. Brevetoxin modulates neuronal sodium channels in two cell lines derived from rat brain. *J Biol Chem*, 2010. 32(6), 34-43.
6. Yang S, Chien C, Lu MC, Lu YJ, Wu ZZ, Lin SR. Cardiotoxin III induces apoptosis in K562 cells through a mitochondrial-mediated pathway. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 2006. 32 (7): 515–20.
7. Force T, Kolaja KL.. Cardiotoxicity of kinase inhibitors: the prediction and translation of preclinical models to clinical outcomes. *Nat Rev Drug Discov*. 2011; 10(2):111-26.
8. Tomonari M, To H, Nishida M, Mishima T, Sasaki H, Kurose H. Mechanism of the cardioprotective effects of docetaxel pre-administration against adriamycin-induced cardiotoxicity. *J Pharmacol Sci*. 2011; 115(3):336-45.
9. Nicastro G, Franzoni L, de Chiara C, Mancin AC, Giglio JR, Spisni A. Solution structure of crotamine, a Na⁺ channel affecting toxin from *Crotalus durissus terrificus* venom. *Eur. J. Biochem*. 2005. 270 (9):1969–79.
10. Griffin PR, Aird SD. A new small myotoxin from the venom of the prairie rattlesnake (*Crotalus viridis viridis*). *FEBS Lett*. 2005. 274 (1): 43-47.
11. Samejima Y, Aoki Y, Mebs D. Amino acid sequence of a myotoxin from venom of the eastern diamond-back rattlesnake (*Crotalus adamanteus*). *Toxicon* 2009; 29(4):461-468.
12. Thakur R, Chattopadhyay P, Mukherjee AK. Biochemical and pharmacological characterization of a toxic fraction and its cytotoxin-like component isolated from Russell's viper (*Daboia russelii russelii*) venom. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*. 2015; 168:55-65.
13. Samsa GP, Matchar DB, Williams GR, Levy DE. Cost effectiveness of ancrod treatment of acute ischaemic stroke: results from the Stroke Treatment with Ancrod Trial (STAT). *J Eval Clin Prac* 2002; 8: 61–70.
14. Markland FS. Snake venom fibrinogenolytic and fibrinolytic enzymes: an updated inventory. *Thromb Haemost* 1998; 79: 668–674.
15. Toombs CF. Alfimeprase: pharmacology of a novel fibrinolytic metalloproteinase for thrombolysis. *Haemostasis* 2011; 31: 141–147.
16. Swenson S, Toombs CF, Pena L, Johansson J, Markland FS, Jr. Alpha-fibrinogenases. *Curr Drug Targets Cardiovasc Haematol Disord* 2004; 4: 417–435.
17. Kornalik F, Vorlova Z. Ecarin test in diagnosis of dicoumarol therapy, liver diseases and DIC. *Folia Haematol (Leipzig)* 2008; 115: 483–487.
18. Kini RM, Rao VS, Joseph JS. Procoagulant proteins from snake venoms. En: Bon C, Kini M, Markland FS, Marsh NA, Rosing J, eds. *International Conference on Exogenous Factors affecting Thrombosis and Haemostasis*. Haemostasis 2011; 31: 218–224.
19. Owen WG, Jackson CM. Activation of prothrombin with *Oxyuranus scutellatus scutellatus* (Taipan snake) venom. *Thromb Res* 2003; 3: 705–714.
20. Speijer H, Govers-Riemslog JWP, Zwaal RFA, Rosing J. Prothrombin activation by an activator from the venom of *Oxyuranus scutellatus* (Taipan snake). *J Biol Chem* 2006; 261: 13258–13267.
21. Masci PP, Whitaker AN, De Jersey J. Purification and characterization of a prothrombin activator from the venom of the Australian brown snake, *Pseudonaja textilis textilis*. *Biochem Int* 2008; 17: 825–835.
22. Rao VS, Kini RM. Pseutarin c, a prothrombin activator from *Pseudonaja textilis* venom: Its structural and functional similarity to mammalian coagulation factor Xa-Va complex. *Thromb Haemost* 2002; 88: 611–619.
23. Rao VS, Joseph JS, Kini RM. Group D prothrombin activators from snake venom are structural homologues of mammalian blood coagulation factor Xa. *Biochem J* 2002; 369: 635–642.
24. Novoa E, Seegers WH. Mechanisms of α -thrombin and α -thrombin-E formation: use of ecarin for isolation of meizothrombin 1. *Thromb Res* 2000; 18: 657–668.
25. Stevens WK, Cote HCF, MacGillivray RTA, Nesheim ME. Calcium ion modulation of meizothrombin autolysis at Arg55–Asp56 and catalytic activity. *J Biol Chem* 2006; 271: 8062–8067.
26. Tokunaga F, Nagasawa K, Tamura S, Miyata T, Iwanaga S, Kisiel W. The factor V-activating enzyme (RVV-V) from Russell's viper venom. *J Biol Chem* 2008; 263: 17471–17481.
27. Kisiel W, Canfield WM. Snake venom proteases that activate blood coagulation factor V. *Methods Enzymol* 2011; 80: 275–285.
28. Stocker K. Application of snake venom proteins in the diagnosis of hemostatic disorders. En: Stocker K, ed. *Medical Use of Snake Venom Proteins*, 1a ed. Boca Raton: CRC-Press; 1990. 213–252.

29. Pu XC, Wong PT, Gopalakrishnakone P. A novel analgesic toxin (hannalgesin) from the venom of king cobra (*Ophiophagus hannah*). *Toxicon* 2005; 33, 1425–1431.

30. Gutierrez VP, Konno K, Chacur M, Sampaio SC, Picolo G, Brigatte P, et al. Crotalphine induces potent antinociception in neuropathic pain by acting at peripheral opioid receptors. *Eur J Pharmacol* 2008; 594: 84–92.