

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA

DE MEXICO

Instituto de Investigaciones Biomédicas

ESTUDIO SOBRE LOS VENENOS DE

VARIAS ESPECIES ZOOLOGICAS



TESIS que para obtener el título de

MAESTRO EN INVESTIGACION BIOMEDICA BASICA

PRESENTA

Presenta:

Alejandro Atagón Cano

México, D.F.

1980



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Con afecto para Lourival D. Possani, Te Piao King y mis compañeros
de laboratorio.

CONTENIDO

AISLAMIENTO Y CARACTERIZACION DE TOXINAS DEL VENENO DE LOS ALACRANES Tityus serrulatus y Centruroides limpidus tecomanus.

- Toxinas de Veneno de Alacrán: Aislamiento y Caracterización.
- Bibliografía.
- Purification and Properties of Mammalian Toxins from the Venom of the Brazilian Scorpion Tityus serrulatus. Lutz and Mello. Arch. Biochem. Biophys. 180, 394-403 (1977).
- Isolation and Characterization of Several Proteins from Tityus serrulatus Scorpion Venom. Proc. 5th. Inter. Sym. on Animal, Plant and Microbial Toxins, San José, Costa Rica. Pergamon Press, New York. pp. 609-618 (1978).
- Purification and Characterization of a Mammalian Toxin from Venom of the Mexican Scorpion Centruroides limpidus tecomanus Hoffman. Toxicon (1980) En prensa.

AISLAMIENTO Y CARACTERIZACION DE CUATRO FOSFOLIPASAS DEL VENENO DE LAS SERPIENTES Bothrops asper y Micrurus fulvius microgalbineus

- Las Enzimas en los Venenos de Serpientes.
- Fosfolipasas A₂.
- Bibliografía
- Purification and Characterization of a Phospholipase A₂ from the Venom of the Coral Snake, Micrurus fulvius microgalbineus (Brown and Smith). Biochem. J. 179, 603-606 (1979).
- Venom from the Snake Bothrops asper Garman. Purification and Characterization of Three Phospholipases A₂. Biochem. J. 180 (1980) En prensa.

PROPIEDADES HEMOLITICAS DE LOS VENENOS DE VEINTIDOS ESPECIES ANIMALES.

-Hemólisis y Venenos

-Factor Hemolítico Directo (FHD)

-Papel de las Fosfolipasas A₂ en la Hemólisis

-Sinergismo entre FHD y Fosfolipasa A₂

-Bibliografía

-Comparison of Phospholipase Activity with Direct and Indirect Lytic Effects of Animal Venoms upon Human Red Cells. Comp. Biochem. Physiol.

64B, 231-234 (1979)

AI SLAM I EN TO Y CA RACT ER I ZAC I ON DE TOX I N AS DE L VE N EN O DE LOS ALACRANES

Tityus serrulatus y Centruroides limpidus tecomanus.

AISLAMIENTO Y CARACTERIZACION DE TOXINAS DEL VENENO DE LOS ALACRANES

Tityus Serrulatus y Centruroides Limpidus Tecomanus.

TOXINAS DE VENENO DE ALACRAN: AISLAMIENTO Y CARACTERIZACION.

A diferencia de las serpientes, todos los alacranes son venenosos. El veneno es inyectado a través de un aguijón que se encuentra en la punta del telson, el último segmento del postabdomen o "cola". Los alacranes pertenecen a la clase Arachnida y al orden Scorpionida. Los venenos mejor estudiados pertenecen a especies de la familia Buthidae, probablemente porque son éstas las de mayor peligrosidad para el hombre. Consisten principalmente de una mezcla de muchos péptidos y proteínas farmacológicamente activos.

Presentan también otro tipo de componentes como mucopolisacáridos y aminas libres. Las toxinas, que constituyen un alto porcentaje del veneno, son proteínas de bajo peso molecular (alrededor de 7,000), básicas (pI:8-10), con un total de residuos de aminoácidos que fluctúa de 57 a 78, la mayor parte de 62 a 66, cuya estructura terciaria está estabilizada con 4 y, a veces, 6 puentes disulfuro, y que en su mayoría, carecen de metionina. (ROCHAT, et al., 1967, MIRANDA et al., 1970, MC INTOSH y WATT, 1972, BABIN et al., 1974, POSSANI et al., 1977, ALAGON et al., 1978).

A la fecha han sido aislados y caracterizados cerca de 30 toxinas alacránicas. Dos toxinas, Am I y Am II, han sido purificadas del veneno de Androctonus mauretanicus colectado en Marruecos. La secuencia amino terminal de la Am II ha sido determinada (ROCHAT et al., 1972). Las toxinas Bop I y Bop II aisladas del veneno de Buthus occitanus, del norte de Marruecos han sido caracterizadas completamente por degradación de Edman (ROCHAT et al., 1975). Tres toxinas, Bot I, Bot II y Bot III, del veneno de Buthus occitanus tunetanus son conocidas a nivel de su composición de aminoácidos

y su secuencia aminoterminal (MIRANDA et al., 1970; ROCHAT et al., 1970). Otras toxinas, componentes menores, del mismo veneno fueron aisladas utilizando métodos diferentes a los inicialmente empleados (ROCHAT et al., 1975). De otro alacrán africano, el Leiurus quinquestriatus quinquestriatus han sido aisladas 5 toxinas (MIRANDA et al., 1970).

Del alacrán norteamericano Centruroides sculpturatus se han efectuado el aislamiento de 4 toxinas designadas I, II, III y IV, las cuales actúan sobre vertebrados (MC INSTOSH y WATT, 1973) y 3 variantes menos tóxicas para vertebrados, pero que producen parálisis en insectos (BABIN et al., 1974). Se ha determinado la estructura primaria de la toxina I que contiene 64 aminoácidos y carece de metionina y alanina (BABIN et al., 1975) y de las tres variantes que presentan 65, 66 y 65 aminoácidos, respectivamente (BABIN et al., 1974). Las secuencias de estas toxinas muestran grandes homologías, lo que sugiere que pertenecen a una familia de proteínas homólogas.

Del veneno del alacrán brasileño Tityus serrulatus se han purificado dos toxinas denominadas Tityus I y II (GOMEZ y DINIZ, 1966; TOLEDO y NEVES, 1976), las que contienen 63 y 78 residuos, respectivamente. La toxina Tityus II contiene 6 puentes disulfuro, lo que representa una excepción al igual que la toxina II de Centruroides sculpturatus y la toxina para crustáceos de Androctonus australis (ZLOTKIN, 1976). POSSANI et al., (1977) y ALAGON et al (1978) han caracterizado 5 toxinas del veneno de las que la más básica, toxina γ , contienen 62 residuos uno de los cuales es metionina. De los alacranes mexicanos Centruroides elegans y Centruroides limpidus Tecomanus se comienzan a conocer las características de sus toxinas (POSSANI et al., 1979; POSSANI et al., 1980)

Estudios comparativos de las secuencias conocidas de toxinas alacrán-

nicas han concluido un mínimo de 5 grupos de toxinas, que pueden indicar líneas divergentes de un ancestro común (ROCHAT et al., 1970; POSSANI et al., 1977). Recientemente, se ha sugerido que las toxinas de serpientes alacranes y abejas evolucionaron a partir de un polipéptido ancestral común a través de duplicación intragénica (ERICKSON, 1978)

BIBLIOGRAFIA

- Alagón A.C., Possani, L.D., Erickson B.W.: Isolation and characterization of several proteins from Tityus serrulatus scorpion venom. Proc. 5th. Inter. Sym. on Animal, Plant and Microbial Toxins, San José, Costa Rica. Pergamon Press, New York. pp. 609-618 (1978)
- Babin, D.R., Watt D.D., Goos, S.M., Mlejnek, R.W.: Amino acid sequence of neurotoxic proteins variants from the venom of Centruroides sculpturatus. Arch. Biochem. Biophys. 164, 694-706 (1974).
- Babin, D.R., Watt, D.D., Goos, S.M., Mlejnek, R.W.: Amino acid sequence of Neurotoxin I from Centruroides sculpturatus Ewing. Arch. Biochem. Biophys. 166, 125-134 (1975)
- Erickson B.W.: Sequence homology of snake, scorpion and bee venom. Proc. 5th. Inter. Sym. on Animal, Plant and Microbial Toxins, San José, Costa Rica. Pergamon Press, New York (1978)
- Gómez, M.V., Diniz, C.R.: Separation of toxic components from the Brazilian scorpion Tityus serrulatus venom. Mem. Inst. Butantan. 33, 899-902 (1966)
- Mc Instosh, M., y Watt, D.: Purification of toxins from the North American Scorpion Centruroides sculpturatus, en Toxins of Animal and Plant Origin. Eds. De Vries, A. y Kochva, E., Vol. 2, Gordon and Breach, New York, pp. 529-544 (1973)
- Miranda, F., Kupeyan, C., Rochat, H., Rochat, C. y Lissitzky, S.: Purification of Animal Neurotoxins. Isolation and characterization of eleven neurotoxins from the venoms of the scorpions Androctonus australis Hector., Buthus occitanus tunetanus and Leiurus quinquestriatus quinquestriatus. Eur. J.

Biochem. 16, 514-523 (1970).

Possani, L.D., Alagón, A.C., Fletcher, P.L. Jr., Erickson, B.W.: Purification and properties of mammalian toxins from the venom of the Brazilian scorpion Tityus serrulatus Lutz and Mello. Arch. Biochem. Biophys. 180, 394-403 (1977).

Possani, L.D., Ramírez, G.A., Fletcher, P.L. Jr., Gurrola, M.A.: Isolation of two mammalian toxins from the venom of the Mexican scorpion Centruroides elegans (Thorell). FEBS Letters 91, 261-264 (1978)

Possani, L.D., Fletcher, P.L. Jr., Alagón, A.B.C., Alagón, A.C., Juliá, J.Z.: Purification and characterization of a mammalian toxin from venom of the Mexican scorpion Centruroides limpidus tecomanus Hoffman. Toxicon, en prensa (1980).

Rochat, C., Rochat, H., Miranda F., Lissitzky, S.: Purification and some properties of the neurotoxins of Androctonus australis Hector. Biochemistry 6, 578-585 (1967).

Rochat, H., Rochat, C., Kopeyan, C., Miranda, F., Lissitzky, S., Edman, P.: Scorpion neurotoxins: a family of homologous proteins. FEBS Letters. 10, 359-361 (1970)

Rochat, H., Rochat, C., Sampieri, F., Miranda, F., Lissitzky, S.: Amino acid sequence of neurotoxin II of Androctonus australis Hector. Eur. J. Biochem., 28, 381-388 (1972).

Rochat, H., Kopeyan, C., García, L.G., Martínez, G., Rosso, J.P., Pakaris, A., Martín, M.F., García, A., Martin-Moutot, M., Gregoire, J., Miranda, F.:

Recent results of the structure of scorpion and snake toxins. Comunicado en el 4th International Symposium on Animal, Plant and Microbial Toxins, Tokio, Sept. 1974, Resumen: Toxicon, 13, 116-117 (1975)

Toledo, D., Neves, A: Purification and partial characterization of a second toxin from the scorpion Tityus serrulatus. Comp. Biochem. Physiol. 55B, 249 -253 (1976)

Zlotkin, E.: A protein scorpion venom toxic to crustaceans. En: Animal, Plant and Microbial Toxins. Eds. Ohsaka, A., Hayashi, K., Sawai, Y. Plenum Press, New York - London. pp. 73-79 (1976)

Purification and Properties of Mammalian Toxins from the Venom of the Brazilian Scorpion *Tityus serrulatus* Lutz and Mello¹

LOURIVAL D. POSSANI, ALEJANDRO C. ALAGÓN, PAUL L. FLETCHER, JR.,
AND BRUCE W. ERICKSON

Departamento de Biología Experimental, Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México, México 20, D. F.; Section of Cell Biology, Yale University School of Medicine, New Haven, Connecticut 06510, and The Rockefeller University, New York, New York 10021

Received September 1, 1976

The water-soluble part of the dried venom from the scorpion, *Tityus serrulatus* Lutz and Mello (range, Southeastern Brazil), showed 16 polypeptide bands on polyacrylamide gel electrophoresis. This material exhibited toxic and hyaluronidase activity but no phospholipase, phosphodiesterase, protease, or fibrinolytic activity. Fractionation on glycineamide-treated Sephadex G-50 afforded three protein fractions, which were non-toxic, equitoxic, and three times more toxic than the water-soluble venom. Subsequent separation of the toxic fractions on carboxymethyl-cellulose with phosphate buffers furnished five toxic components, which were further purified on carboxymethyl-cellulose with a salt gradient in acetate buffer. Toxin γ , the major and most basic toxin, is a 62-residue protein that, unlike other scorpion toxins, contains methionine. Automated Edman degradation showed the amino-terminal sequence to be H-Lys-Glu-Gly-Tyr-Leu-Met-Asp-His-Glu-Gly-Cys-Lys-Leu-Ser-Cys-Phe-Ile-Arg-Pro-Ser-Gly-Tyr-Cys-Gly-Arg-Glu-Cys-Gly-Ile-. Toxin γ is the first example of a fifth structural type of mammalian toxin from scorpion venom. Its amino-terminal sequence shows greater homology with toxins similar to *Centruroides suffusus suffusus* toxin III and *Androctonus australis* toxin II than with toxins similar to *A. australis* toxin I or *Buthus occitanus tunetanus* toxin I.

The high degree of toxicity of scorpion venoms is due to the presence of polypeptide neurotoxins (1-3). The venoms of North African and North American scorpions contain 3 to 11 neurotoxic components (4-8), which differ in amino acid composition and in the degree of toxicity toward various vertebrate and invertebrate animals. The venom of the Brazilian scorpion *Tityus serrulatus* Lutz and Mello has previously been separated into two neurotoxic fractions, from which the protein called Tityustoxin was isolated (9, 10). This toxin was recently described as a 61-

residue basic protein having lysine at the amino terminus (11). This paper describes a new procedure for fractionation of the venom of *T. serrulatus* into at least five toxins, which have been characterized by chromatography, electrophoresis, and toxicity in mice. Toxin γ , the major toxic protein, was characterized by amino acid analysis (12) and partial sequence determination (13). The total soluble venom was also examined for several enzymatic activities.

MATERIALS AND METHODS

The venom of the Brazilian scorpion *Tityus serrulatus* Lutz and Mello, which was extracted by electrical stimulation, air-dried, and stored at -20°C , was a gift from Instituto Butantan, São Paulo, Brazil. Sephadex G-50 (medium, Pharmacia) was coupled with glycineamide to block the residual carboxylic acid groups (14). Urea (ultrapure, Schwarz/Mann) was deionized by passing an aqueous solution

¹ This research was supported in part by Grant 043/76 to L.D.P. from the Mexican National Council of Science and Technology; by Grant GM-21714 to P.L.F. from the U. S. Public Health Service, and by Grant-in-Aid 74-844 to B.W.E. from the American Heart Association and with funds contributed by the New York Heart Association.

ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF SEVERAL PROTEINS FROM *TITYUS* *SERRULATUS* SCORPION VENOM

ALEJANDRO C. ALAGÓN, LOURIVAL D. POSSANI
and BRUCE W. ERICKSON

*Departamento de Biología Experimental, Instituto de Biología, Universidad
Nacional Autónoma de México, México 20, D.F. and The Rockefeller University,
New York, New York 10021*

The soluble venom from the Brazilian scorpion, *Tityus serrulatus* Latr & Vello, showed 16 polypeptide bands by polyacrylamide gel electrophoresis. It contained proteins with toxic and hyaluronidase activity but none with phospholipase, phosphodiesterase, protease, or fibrinolytic activity. Separation on glyoxalated Sephadex G-50 gave three fractions that were nontoxic, as toxic, and three times more toxic than the soluble venom. Separation of the toxic fractions on Sephadex G-100 using phosphate buffers gave three toxic components, three of which were further purified to homogeneity. Toxin Y, the most basic of these toxins, is a 65,000 dalton protein that reacts with anti-venom serum antibodies.

DISCUSSION

The venoms of North African and North American scorpions contain three to eleven toxins (Kawanabe et al., 1974) that differ in amino acid composition and toxicity toward various species and invertebrate animals. The venom of the Brazilian scorpion *Tityus serrulatus* Latr & Vello has been separated into two toxic fractions from which the protein cytotoxin was isolated (Perez and Martin, 1968; Diniz 1971). This report describes a new procedure for fractionation of the venom of *T. serrulatus* into at least five toxins, which have been characterized by chemical analysis, electrophoresis, and toxicity in mice. Toxin Y, the most basic and major toxic protein, was also characterized by amino acid analysis. In addition, the soluble venom has been assayed for several enzymatic activities. Further characterization of these venom proteins from a South American scorpion should reveal their biological and phylogenetic relationships to the protein components of North American and North African scorpions (Habersetzer-Rochat and Sampieri, 1976).

PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF A
MAMMALIAN TOXIN FROM VENOM OF THE MEXICAN
SCORPION, *CENTRUROIDES LIMPIDUS TECOMANUS*
HOFFMAN^{1/2}

LOCRIVAL D. POSSANI,¹ PAUL L. FLETCHER, JR.,² ANDRES B. C. ALAGON,¹
ALEJANDRO C. ALAGON¹ and JURDI Z. JULIA³

¹Departamento de Neurociencias, Centro de Investigaciones en Fisiología Celular and
Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, UNAM, Apartado Postal 70-600,
Mexico 20, D.F., Mexico

²Section of Cell Biology, Yale University School of Medicine, New Haven, Connecticut
06510, U.S.A., and ³Instituto Nacional de Higiene, S.S.A., Mexico 17, D.F.

(Accepted for publication 18 June 1979)

L. D. POSSANI, P. L. FLETCHER, JR., A. B. C. ALAGON, A. C. ALAGON and J. Z. JULIA. Purification and characterization of a mammalian toxin from venom of the Mexican scorpion, *Centruroides limpidus tecomanus* Hoffmann. *Toxicon* 18; 600-603, 1979. A toxin from the scorpion *Centruroides limpidus tecomanus* Hoffmann was obtained by the regeneration of envenomed rats and electrical stimulation of anaesthetized animals. Both venom preparations contain toxic proteins to mice and were separated in a Sephadex G-50 column followed by carboxymethyl-cellulose chromatography. At least two toxic fractions were resolved from the homogenized venoms and three toxic fractions from the venom obtained by electrical stimulation. Rechromatography of the latter fractions on an ion exchange column (Affixex A-5) gave a homogeneous toxin called H.9.3, which on amino acid analysis was shown to be composed of 65 residues with a calculated mol. wt of 7535. The N-terminal sequence is H-Lys-Gly-Gly-N-Ileu-Val-Asx-His-N-Thr-Gly-Cys-... homologous to other scorpion toxins. The venom obtained by electrical stimulation was further characterized: the fraction I from the Sephadex G-50 chromatography shows hyaluronidase activity, although the fraction III shows at least 15 different components positive to ninhydrin, after separation by peptide mapping techniques.

INTRODUCTION

SEVERAL toxins have been isolated from the venom of scorpions belonging to the genus *Centruroides* (BABIN *et al.*, 1974, 1975; ROUMAT *et al.*, 1976). These toxins are polypeptides containing approximately 10 amino acids and are similar to the toxins from the genus *Buthus*, *Leiurus*, *Androctonus* and *Tityus* (ROUMAT *et al.*, 1970a, 1970b, 1972, 1976; ZLOTKIN, 1971; POSSANI *et al.*, 1977). The toxins from the scorpion of the species *Centruroides limpidus* represented by two sub-species: *Centruroides limpidus limpidus* and *Centruroides limpidus tecomanus* (*C. l. tecomanus*) have not been chemically characterized; nevertheless, these two sub-species are the most dangerous to humans in Mexico. More than 50% of the people stung by scorpions (over 100,000 every year) in Mexico are stung by *C. limpidus* (ALAGON and LOPEZ, personal communication). In the present communication we describe a procedure for the purification of one toxic protein from the venom of *C. l. tecomanus*. Preliminary information regarding the chemical characteristics of this protein is also included.

¹Part of this paper was presented as an abstract during the XII Meeting of the Sociedad Mexicana de Bioquímica, in October 1978, San Luis Potosí, Mexico.

AISLAMIENTO Y CARACTERIZACION DE CUATRO FOSFOLIPASAS DEL VENENO DE LAS
SERPIENTES Bothrops asper y Micrurus fulvius microgalbineus

AISLAMIENTO Y CARACTERIZACION DE CUATRO FOSFOLIPASAS DEL VENENO DE LAS
SERPIENTES Bothrops asper y Micrurus fulvius microcalbineus

LAS ENZIMAS EN LOS VENENOS DE SERPIENTES

Un gran número de venenos animales incluyendo aquéllos de las ser-
pientes, los monstruos de Gila, los alacranes, las arañas y las abejas,
contienen distintos tipos de enzimas además de toxinas. Estas activida-
des enzimáticas juegan un papel importante en las siguientes acciones
patofisiológicas de los venenos (MELDRUM, 1965): (a) daño local de capi-
lares y necrosis tisular por proteinasas, fosfolipasas, arginil éster
hidrolasas y hialuronidasas (SLOTTA, 1955; KAISER y MICHEL, 1958; SUZU-
KI e IWANAGA, 1970); (b) acciones coagulantes y anticoagulantes por va-
rias enzimas proteolíticas algunas de ellas muy específicas (MEAUME,
1966) y (c) producción de hipotensión aguda y dolor debido a la libe-
ración de péptidos vasoactivos por kininogenasas (SUZUKI e IWANAGA,
1970). Otros tipos de enzimas han sido propuestos como agentes tóxicos
en los venenos de serpientes: 5'-nucleotidasa, fosfodiesterasa, colines-
terasa, y L-aminoácido oxidasa. Sin embargo, varios estudios, en los
que los venenos de muchas especies de serpientes han sido fraccionados
por cromatografía y electroforesis, han demostrado que estas enzimas
per se no intervienen directamente en el cuadro tóxico agudo ocasionado
por los venenos (MINTON, 1974).

Las enzimas de los venenos de serpientes, una de las fuentes natu-
rales con más alta concentración de enzimas, han encontrado varios usos
en la investigación biomédica. La L-aminoácido oxidasa, por ejemplo,
ha sido utilizada en la identificación de isómeros ópticos de aminoáci-
dos y en la preparación de α -cetoácidos (MEISTER, 1965); la fosfodies-

terasa, en estudios estructurales de ácidos nucleicos y de coenzimas dinucleotídicas (LASKOWSKI, 1966); las enzimas proteolíticas, para estudios de secuencia de péptidos y proteínas (MELLA et al., 1967; VAN DER WALT y JOUBERT, 1972); y la fosfolipasa A₂, en la investigación de lípidos (VAN DEENEN y DE HAAS, 1966). Otras enzimas, con actividad de trombina (reptilasa, ancrode y batroxobina) o procoagulantes (stypven), tienen cierta aplicación en clínica. Estos usos bioquímicos y terapéuticos de las enzimas de venenos de serpientes son algunas de las razones que han conducido al estudio intensivo de la ocurrencia, purificación y caracterización de estas enzimas por muchos grupos de trabajo en todo el mundo.

Por lo menos un mínimo de 26 enzimas diferentes, la mayoría de ellas hidrolasas, han sido detectadas en venenos de serpientes (IWANAGA y SUZUKI, 1979). De éstas, 12 se encuentran presentes en todos los venenos aunque su contenido varía importantemente; las restantes están presentes sólo en ciertos grupos taxonómicos, o son características de algunas especies en particular (TABLA 1). Los elápidos, por ejemplo, se caracterizan por la presencia de acetilcolinesterasa, enzima que no se encuentra en los vipéridos y crotálidos (ZELLER, 1948); éstas dos últimas familias poseen actividades de endopeptidasa, arginil éster hidrolasa, kininogenasa, trombina y procoagulante, no detectadas en los venenos de elápidos (DEUTSCH y DINIZ, 1955). Con raras excepciones, los venenos de ciertos elápidos (Ophiophagus hannah y Pseudechis colletti) contienen actividad proteolítica y de arginil éster hidrolasa, si bien es muy baja (MEBS, 1970). Los venenos de los crotálidos y de los vipéridos se parecen más entre sí que cuando comparados con los de los elápidos. Sin embargo, aun para especies estrechamente relacionadas, hay reportes de diferencias significativas en cuanto al contenido de alguna o algunas enzimas, hecho difícil de interpre-

TABLA 1. ENZIMAS PRESENTES EN LOS VENENOS DE SERPIENTES

A. Presentes en todos los venenos:

Fosfolipasa A₂ (3.1.1.4), L-Aminoácido oxidasa (1.4.3.2), Fosfodiesterasa (3.1.4.1), 5'-Nucleotidasa (3.1.3.5), Fosfomonoesterasa (3.1.3.2), Deoxiribonucleasa (3.1.4.6), Ribonucleasa (2.7.7.16), Adenosín trifosfatasa (3.6.1.8), Hialuronidasa (4.2.99.1), NAD-nucleosidasa (3.2.2.5), Arginilamidasa, Peptidasa.

B. Presentes en venenos de crotálicos y vipéridos:

Endopeptidasa, Arginil éster hidrolasa, kininogenasa (3.4.4.21), con actividad semejante a Trombina, Activador del Factor X de la coagulación, Activador de Protrombina.

C. Presentes principalmente en venenos de elápidos:

Acetilcolinesterasa (3.1.1.7), Fosfolipasa B (3.1.1.5), Glicerofosfatasa.

D. Presentes en algunos venenos:

Transaminasa glutámico-pirúvica (2.6.1.2), Catalasa (1.11.1.6), Amilasa (3.2.1.1), α-Glucosaminidasa, Lactato deshidrogenasa (1.1.1.27), Heparinasa.

tar ya que pueden variar grandemente dependiendo de la condición de las serpientes (edad, sexo, nutrición, condiciones de cautiverio, etc) y del manejo y conservación del veneno. Otra dificultad presente en este tipo de estudios comparativos es la existencia de factores en el mismo veneno que pueden influenciar la actividad de las enzimas: inhibidores de enzimas proteolíticas (RAUDONAT, 1955), endopeptidasas que degradan kininas interfiriendo en la determinación de kalikreínas (SUZUKI e IWANAGA, 1970).

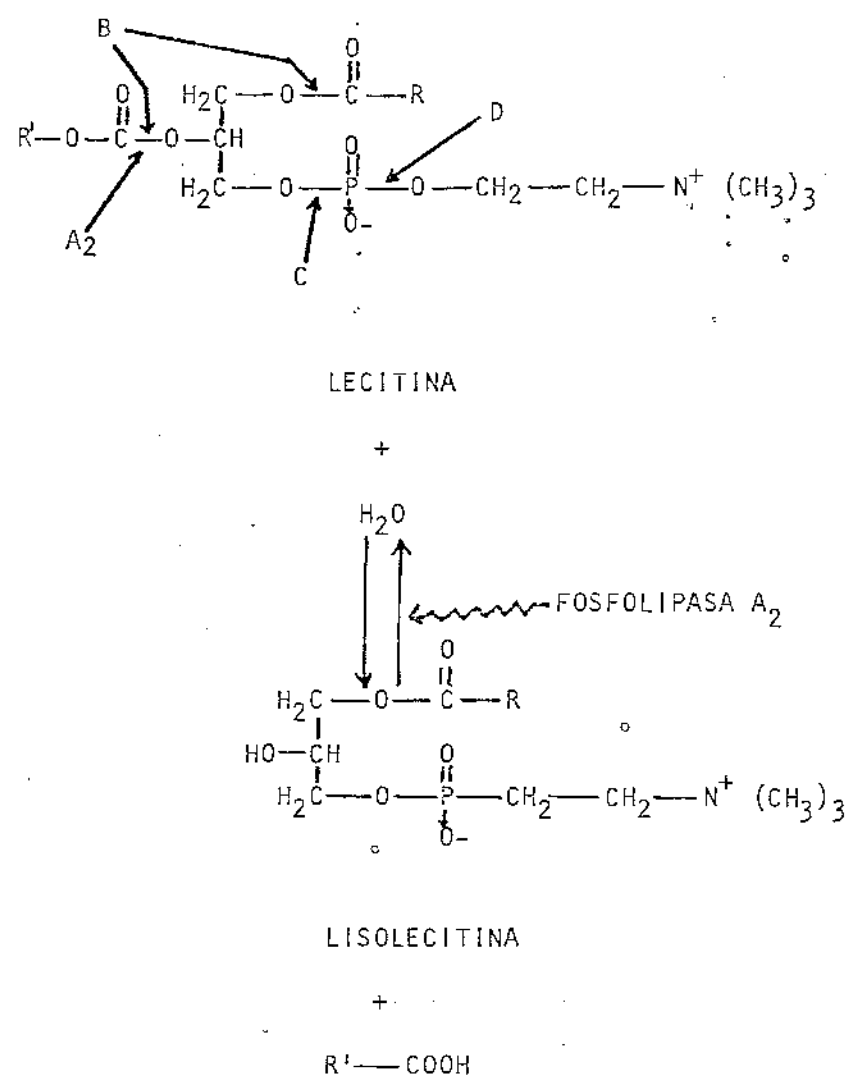
Por lo general, los venenos de crotálidos y vipéridos presentan un contenido muy elevado de enzimas, en tanto que los de los elápidos son muy ricos en toxinas de bajo peso molecular y relativamente pobres en enzimas (MEBS, 1969). La mayor parte de las enzimas de venenos de serpientes son muy estables cuando se les guarda en estado seco (RUSSELL y EVENTON, 1964). Las propiedades de los distintos componentes de los venenos se conservan en buen estado si estos últimos son liofilizados en forma inmediata a la extracción.

FOSFOLIPASAS A₂

Las fosfolipasas son enzimas que degradan hidrolíticamente a los fosfolípidos. Se reconocen 4 clases de acuerdo a su sitio de acción sobre glicerofosfátidos (ESQUEMA 1). De todas ellas la que predomina en los venenos de serpientes es la fosfolipasa A₂, la que hidrolisa selectivamente el acilo de la posición 2 de los sn-3-fosfoglicéridos (ESQUEMA 1). También ha sido denominada como fosfolipasa A, fosfatidasa A, lecitinasa A, y hemolisina, por su capacidad indirecta de lisar eritrocitos, propiedad que será discutida más adelante en esta tesis. La alta especificidad de esta enzima ha sido útil en análisis estructurales de fosfolípidos y triglicéridos, así como en el estudio de las interacciones lípido-proteína (SINGER, 1971). Entre sus propiedades más sobresalientes resaltan: un requerimiento absoluto de

Ca²⁺, una gran resistencia a temperaturas elevadas, y una estructura terciaria muy estable dada por numerosos puentes disulfuro. Son las fosfolipasas A₂ las enzimas de venenos de serpientes mejor estudiadas.

ESQUEMA 1. CLASES DE FOSFOLIPASAS. ACCION DE LA FOSFOLIPASA A₂



Purificación. A la fecha se han aislado fosfolipasas A₂ de venenos pertenecientes a todas las familias de serpientes (UWATOKO-SETOGUCHI y OHBO, 1969; TU et al., 1970; VIDAL y STOPPANI, 1971; KAWAUCHI et al., 1971; SHILOAH et al, 1973; BOTES y VILJOEN, 1974b; TSAO et al., 1975; JOUBERT, 1975a; JOUBERT y VAN DER WALT, 1975). El esquema de purificación es rela-

tivamente simple, comparado con los utilizados para otras enzimas de venenos como fosfodiesterasas, endopeptidasas y L-aminoácido oxidasas. En muchos casos una filtración en gel seguida de cromatografía por intercambio iónico, ha sido suficiente para obtener fosfolipasas en estado homogéneo. Los rendimientos reportados fluctúan alrededor del 20 al 30%. La cromatografía por afinidad ha dado mejores resultados, con rendimientos del 90% (ROCK y SNYDER, 1975). La presencia de múltiples formas de fosfolipasa A₂ es un hallazgo frecuente en la mayoría de los venenos. SALACH et al (1971) identificaron de 7 a 11 isoenzimas en los venenos de Naja naja y Vipera russellii. De 2 a 3 isoenzimas con actividad fosfolipásica han sido identificadas para los venenos de Crotalus adamanteus (WELLS y HANAHAN, 1969), Agkistrodon halys blomhoffi (IWANAGA y KAWAUCHI, 1959; KAWAUCHI et al., 1971), Naja nigricollis (WAHLSTROM, 1971), Bothrops neuwiedii (VIDAL et al., 1972), Vipera palestinae (SHILOAH et al., 1973), Vipera berus (DELORI, 1973), y Naja melanoleuca (JOUBERT y VAN DER WALT, 1975).

Propiedades Fisicoquímicas. Las fosfolipasas de venenos de serpientes son muy resistentes a temperaturas elevadas, pHs extremos, liofilización, congelamiento-descongelamiento y concentraciones elevadas de urea (KAWAUCHI et al., 1971; BREITHAUPT, 1976).

El peso molecular de las fosfolipasas fluctúa entre 8500 y 31000, ejemplos: de Crotalus atrox, 14500 (WU y TINKER, 1969); de Naja naja, 24000 (CURRIE et al., 1968); Naja nigricollis, con dos isoenzimas de 13000 y de 14000 (WAHLSTROM, 1971); de Vipera palestinae, 16000 (SHILOAH et al., 1973); Bothrops neuwiedii, con dos isoenzimas de 8500 y 20000 (VIDAL et al., 1972).

Como ha sido mencionado anteriormente, la presencia de múltiples formas de fosfolipasas en un mismo veneno ha sido bien documentada. TU (1977)

señala que este hecho pudiera explicarse de diferentes maneras:

- 1) Que fueran isoenzimas en el sentido tradicional, es decir, que sean codificadas a nivel genético en su estructura primaria.
- 2) Que resulten de diferentes estados de agregación (oligómeros) de una misma enzima.
- 3) Que resulten de la degradación proteolítica limitada por enzimas presentes en el mismo veneno (principalmente en los venenos de crotálicos y víperidos).

Sin embargo, no todos los venenos de serpientes presentan múltiples formas de fosfolipasas. Por ejemplo, el veneno de la serpiente marina Laticauda semifasciata tiene una sola fosfolipasa, la que ha sido bien caracterizada y purificada por dos laboratorios en forma independiente (UWATOKO-SETOGUCHI, 1969; TU et al., 1970).

Otra característica de estas enzimas es su tendencia a la formación de dímeros; el equilibrio entre el monómero y el dímero puede ser desplazado en cualquier sentido dependiendo de las condiciones del medio, sobre todo de la fuerza iónica y de la presencia (o ausencia) de Ca^{2+} . Una baja fuerza iónica y la presencia de Ca^{2+} favorecen al dímero; las condiciones opuestas resultan en el monómero (BOTES y VILJOEN, 1974b). Probablemente, esto mismo pudiera aplicarse en los casos de Crotalus atrox (WU y TINKER, 1969, HACHIMORI et al., 1971), C. adamanteus (WELLS y HANAHAN, 1969) y Bothrops neuwiedii (VIDAL et al., 1972).

Estudiando la composición de aminoácidos para varias fosfolipasas A_2 de distintos venenos se encuentra que todas tienen un contenido elevado de ácido aspártico, glicina, tirosina y cisteína. Los aminoácidos básicos presentan una tendencia muy interesante: mientras que el número de residuos de histidina varía de 1 a 3 y el de arginina de 3 a 6, el de lisi-

nas es muy variable, de 4 a 17. En ningún caso ha sido demostrada la presencia de carbohidratos o de grupos tiol libres.

Por dicroísmo circular se ha calculado que el monómero de la fosfolipasa de Agkistrodon halys-blohoffi tiene de 32 a 37% de α -hélice (probablemente con giro a la derecha) (KAWAUCHI et al., 1971). El contenido de α -hélice para el dímero de Crotalus adamanteus (WELLS, 1971a) y el monómero de Vipera ammodytes (GUBENSEK y LAPANJE, 1974) es de 70 y 24%, respectivamente. Mientras que las 3 isoenzimas de Naja melanoleuca, muy semejantes entre sí, presentan de un 22 a un 28% de α -hélice, su estructura β fue muy pequeña o nula (JOUBERT y VAN DER WALT, 1975).

Estructura Primaria. La Fig. 1. muestra la secuencia de aminoácidos desde el amino terminal hasta la posición 30 de varias fosfolipasas A_2 : 2 de mamíferos, 4 de elápidos, una de vipéridos y 2 de crotálidos, en ese orden. El alto grado de homología entre ellas se observa en forma inmediata. HEINRIKSON et al (1977) han propuesto dos familias de fosfolipasas basados principalmente en la posición de los residuos de cisteínas. La primera de ellas comprende a las fosfolipasas de elápidos y mamíferos que en la posición 11, por ejemplo, presentan un residuo de cisteína, situación que no se da para la segunda familia, que incluye a las fosfolipasas de vipéridos y crotálidos. Es probable que esta clasificación sea modificada con el conocimiento de otras secuencias de fosfolipasas de otras especies.

Propiedades Enzimáticas. La mayor parte de las fosfolipasas A_2 presentan una actividad máxima entre pH de 7.5 y de 8.5, actividad que disminuye marcadamente a pHs por debajo de 6 o por arriba de 10. La temperatura óptima para estas enzimas varía con la especie de origen. Por ejemplo, para los venenos pertenecientes al género Naja es de 65°, en tanto que las fosfoli-

pasas de *Crotalus* son inactivas por arriba de 45° (NAIR et al., 1976). Las fosfolipasas A₂ requieren de Ca²⁺ para su funcionamiento; este ión interacciona con el extremo polar del fosfolípido dándole al carbón del carbonilo una carga parcial positiva que facilita el ataque nucleofílico necesario para la ruptura del éster (WELLS, 1972). El Ca²⁺ se une a la enzima previamente a la interacción de ésta con el sustrato (VILJOEN et al., 1975). Otros cationes divalentes pueden substituir parcialmente al ión calcio.

Las fosfolipasas A₂ son altamente específicas: hidrolizan la unión éter del carbono 2 de los fosfoglicéridos liberando ácidos grasos (generalmente insaturados en esta posición) y lisolípidos (1-acilglicerofosfátidos). La reacción se lleva a cabo por ruptura en el O del acilo, como ha sido demostrado por la hidrólisis de 1,2-dipalmitoilglicero-3-fosforilcolina en presencia de H₂¹⁸O (WELLS, 1971b):



El sustrato más común de estas enzimas es α -lecitina (fosfatidilcolina), la que puede ser hidrolizada tanto en forma libre (yema de huevo, suero) (TU et al., 1970; MARINETTI, 1961; CHINEN, 1972) o formando parte de lipoproteínas (PATTNAIK et al., 1976). VAN DEENEN y DE HAAS (1963) estudiaron en detalle la especificidad de la fosfolipasa A₂ de *Crotalus adamanteus*. Para esto utilizaron varios análogos modificados de fosfolípidos con lo que pudieron postular que la estructura mínima requerida como sustrato para esta enzima era la siguiente:

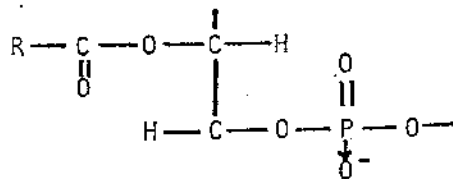


Fig. 1

Ppo	A	L	W	Q	F	R	S	M	I	K	C	A	I	P	G	S	H	P	L	M	D	F	N	N	Y	G	C	Y	C	G
peq	A	V	W	Q	F	R	S	M	I	Q	C	T	I	P	N	S	K	P	Y	L	G	F	N	D	Y	G	C	Y	C	G
Nme DE-I	N	L	Y	Q	F	K	N	M	I	H	C	T	V	P	N	-	R	P	W	W	H	F	A	N	Y	G	C	Y	C	G
Nme DE-II	N	L	Y	Q	F	K	N	M	I	Q	C	T	V	P	N	-	R	S	W	W	H	F	A	N	Y	G	C	Y	C	G
Nme DE-III	N	L	Y	Q	F	K	N	M	I	H	C	T	V	P	N	-	R	S	W	W	H	F	A	N	Y	G	C	Y	C	G
Hha DE-I	N	L	Y	Q	F	K	N	M	I	K	C	T	V	P	-	S	R	S	W	W	H	F	A	N	Y	G	C	Y	C	G
Bga	D	L	T	Q	F	G	N	M	I	N	K	M	G	Q	-	S	V	F	D	Y	I	Y	-	-	Y	G	C	Y	C	G
Cad	S	L	V	Q	F	E	T	L	I	M	K	V	A	K	R	S	G	L	L	W	-	Y	S	A	Y	G	C	Y	C	G
Aha A-II	S	L	M	Q	F	E	T	L	I	M	K	I	A	G	R	S	G	I							Y	G	S	Y	C	G

Comparación de las secuencias amino terminal de varias fosfolipasas A₂. (Ppo) Páncreas porcino (DE HAAS et al., 1970); (Peq) páncreas equino (EVENBERG et al., 1977); (Nme DE-I) Naja melanoleuca DE-I (Joubert, 1975c); (Nme DE-II) N. melanoleuca DE-II (Joubert, 1975c); (Nme DE-III) N. melanoleuca DE-III (Joubert, 1975b); (Hha DE-I) Haemachatus haemachatus DE-I (Joubert, 1975a); (Bga) Bitis gabonica (BOTES y VILJOEN, 1974a); (Cad) Crotalus adamanteus (HEINRIKSON et al., 1977); (Aha A-II) Akistrodon halys blomhoffi (SAMESJIMA, et al., 1974). Se utiliza la simbología de una letra para cada aminoácido. Se han dejado espacios (-) para alinear a los residuos de cisteína y obtener el máximo grado de homología. Los pares Glu-Gln y Asp-Asn se consideran equivalentes entre sí. Se han enmarcado los aminoácidos que se repiten con mayor frecuencia en cada posición. Los segmentos de secuencia para la fosfolipasa A-II del veneno de A. halys blomhoffi están ordenados en forma diferente a como fueron publicados originalmente, siguiendo las sugerencias de HEINRIKSON., et al (1977).

Wells, M.A., Hanahan, D.J.: Studies on phospholipase A₁. Isolation and characterization of two enzymes from Crotalus adamanteus venom. Biochemistry 8, 414-424 (1969)

Wu, T.W., Tinker, D.D.: Phospholipase A₂ from Crotalus atrox venom. I. Purification and some properties. Biochemistry 8, 1558-1568 (1969)

Zeller, E.A.: Enzymes of snake venoms and their biological significance. Ad. Enzymol. 8, 459-495 (1948)

Purification and Characterization of a Phospholipase A₂ from the Venom of the Coral Snake, *Micurus fulvius microgalbinus* (Brown and Smith)

By LOURIVAL D. POSSANI,* ALEJANDRO C. ALAGÓN,* PAUL L. FLETCHER, Jr.,†
MANUEL J. VARELA* and JORDI Z. JULIÀ‡

*Departamento de Biología Experimental, Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México, Apdo. Postal 70-600, México 20, D.F., México, †Section of Cell Biology, Yale University School of Medicine, New Haven, CT 06510, U.S.A., and ‡Instituto Nacional de Higiene, Secretaría de Salubridad y Asistencia, México 17, D.F., México

(Received 4 December 1978)

A phospholipase A₂ was purified from the Mexican coral snake *Micurus fulvius microgalbinus* (Brown and Smith). Gel filtration of the soluble crude venom on Sephadex G-50 resolved five fractions, of which fraction II had 98% of the total phospholipase activity. This fraction was rechromatographed on a CM-cellulose column that resolved eight fractions, four of which had an important phospholipase activity. The first fraction (II-1) was homogeneous by polyacrylamide-gel electrophoresis and displayed a phospholipase specific activity of 920 units/mg of protein. The apparent molecular weight as determined by sodium dodecyl sulphate polyacrylamide-gel electrophoresis was approx. 14000. The amino acid analysis revealed the presence of 119 amino acid residues, with 12 half-cystines. The N-terminal sequence was shown to be Ser-Leu-Leu-Asx-Phe-Lys-Asx-Met-Ile-Glu-Ser-Thr ..., which is homologous with that of phospholipases from other snake venoms.

Phospholipase A₂ (EC 3.1.1.4) catalyses the selective hydrolysis of the 2-acyl groups in 3-*sn*-phosphatidyl derivatives (de Haas & van Deenen, 1961) playing a central role in lipid metabolism, and has been applied in important research in several fields of investigation. The purification and primary-structure determination of phospholipases A₂ have been accomplished by many groups using material extracted from pig (de Haas *et al.*, 1970) and horse (Evenberg *et al.*, 1977) pancreas, from bee venom (Shipolini *et al.*, 1974) and especially from numerous snake venoms (reviewed in Heinrichson *et al.*, 1977).

Phospholipase A₂ has been found in all snake venoms thus far examined (Tu, 1977) and varies from approx. 10000 to about 36000 in molecular weight. The primary sequences determined for several of these phospholipases have extensive structural homology with each other as well as with the same enzyme from mammalian pancreas. Although purified phospholipase A₂ from snake venom does not appear to exert either lethal or toxic effects in live animals, cells incubated in the presence of the venom enzyme undergo radical alterations to the plasmalemma and mitochondria. The morphology of rat liver cells remains intact in the presence of low concentrations of enzyme, but the cell begins to lose intracellular proteins and mitochondrial respiration becomes uncoupled (Gallai-Hatchard & Gray, 1968). Erythrocytes are very slowly haemo-

lysed by purified phospholipase A₂, except when phosphatidylcholine is added as well. This apparently implicates lysophosphatidylcholine as the lytic agent (Roy, 1945).

The apparent ubiquitous presence of phospholipase A₂ in snake venom has interesting implications. Although its pathological effects appear to be indirect from the evidence thus far obtained, its role in the overall toxicity of these venoms is certain. Since the protein is ubiquitous in virtually all snake venoms its primary structure provides valuable information about the evolutionary origin and mutational history of these venomous reptiles.

The present paper describes the isolation and partial characterization of phospholipase A₂ from the venom of the coral snake *Micurus fulvius microgalbinus* (Brown and Smith), an elapid snake from Mexico (range, State of San Luis Potosí). An abstract of this work was presented during the meeting of the Mexican Society for Zoology (Possani *et al.*, 1978).

Materials and Methods

Only analytical-grade chemicals and solvents were used. The venom was obtained monthly from a single snake (73 cm in length). A 2 ml plastic spoon covered with polyester fabric was taken into the snake's mouth several times in the course of a single collection

Venom from the snake *Bothrops asper* Garman

PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF THREE PHOSPHOLIPASES A₂

Alejandro C. ALAGÓN,* Ricardo R. MOLINAR,* Lourival D. POSSANI,* Paul L. FLETCHER, Jr.,†
 John E. CRONAN, Jr.,† and Jordi Z. JULIA‡

*Departamento de Neurociencias, Centro de Investigaciones en Fisiología Celular and Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Apartado Postal 70-600, Universidad Nacional Autónoma de México, 20 D.F., México, †Section of Cell Biology and Department of Molecular Biophysics and Biochemistry, Yale University School of Medicine, New Haven, CT 06510, U.S.A., and ‡Instituto Nacional de Higiene, S.S.A. 7 D.F., México

(Received 23 August 1979)

The water-soluble venom of *Bothrops asper* Garman (San Juan Evangelista, Veracruz, México) showed 15 polypeptide bands on polyacrylamide-gel electrophoresis. This material exhibited phospholipase, hyaluronidase, *N*-benzoyl-L-arginine ethyl hydrolase, *N*-benzoyl-L-tyrosine ethyl hydrolase and phosphodiesterase activity, but no alkaline phosphatase or acid phosphatase activity. Fractionation on Sephadex G-75 afforded seven protein fractions, which were apparently less toxic than the whole venom ($LD_{50} = 4.3 \mu\text{g/g}$ mouse wt.). Subsequent separation of the phospholipase-positive fraction (II) on DEAE-cellulose with potassium phosphate buffers (pH 7.55) gave several fractions, two being phospholipase-positive (II.6 and II.8). These fractions were further purified on DEAE-cellulose columns with potassium phosphate buffers (pH 8.6). Fraction II.8.4 was rechromatographed in the same DEAE-cellulose column, giving a pure protein designated phospholipase 1. The fraction II.6.3 was further separated by gel disc electrophoresis yielding two more pure proteins designated phospholipase 2 and phospholipase 3. Analysis of phospholipids hydrolysed by these enzymes have shown that all three phospholipases belong to type A₂. Amino acid analysis has shown that phospholipase A₂ (type 1) has 97 residues with a calculated mol.wt. of 10978 ± 11 . Phospholipase A₂ (type 2) has 96 residues with a mol.wt. of 10959 ± 11 . Phospholipase A₂ (type 3) has 266 residues with 16 half-cysteine residues and a calculated mol.wt. of 29042 ± 31 . Automated Edman degradation showed the *N*-terminal sequence to be: Asx-Leu-Trp-Glx-Phe-Gly-Glx-Met-Met-Ser-Asx-Val-Met-Arg-Lys-Asx-Val-Val-Phe-Lys-Tyr-Leu- for phospholipase A₂ (type 2).

Phospholipase A₂ (EC 3.1.1.4) catalyses the selective hydrolysis of the 2-acyl groups in *sn*-3-phosphatidyl derivatives (de Haas & van Deenen, 1961). It is a heat-stable widely distributed enzyme playing a central role in lipid metabolism and having an important application in several fields of investigation (Dawson, 1973). The isolation and complete primary-structure determination of phospholipases A₂ have been accomplished by several laboratories from material extracted from pig (de Haas *et al.*, 1970) and horse (Evenberg *et al.*, 1977) pancreas, from bee venom (Shipolini *et al.*, 1971, 1974) and

especially from numerous snake venoms (Sotes & Viijoen, 1974; Samejima *et al.*, 1974; Joubert, 1975*a,b,c*; Eaker, 1975; Halpert & Eaker, 1975; Heinrichson *et al.*, 1977). The present paper describes the isolation and partial characterization of three phospholipases A₂ from the venom of the Mexican snake *Bothrops asper* Garman. An abstract of this work was presented during the meeting of the Mexican Society for Zoology (Alagón *et al.*, 1978).

Materials and Methods

The venom of the snake *B. asper* was collected from adult snakes, captured in San Juan Evan-

Abbreviations used: Bz-Arg-OEt, *N*-benzoyl-L-arginine-ethyl ester; Bz-Tyr-OEt, *N*-benzoyl-L-tyrosine-ethyl ester; SDS, sodium dodecyl sulphate.

PROPIEDADES HEMOLITICAS DE LOS VENENOS DE VEINTIDOS ESPECIES ANIMALES

PROPIEDADES HEMOLITICAS DE LOS VENENOS DE VEINTIDOS ESPECIES ANIMALES

HEMOLISIS Y VENENOS

Hemólisis es la ruptura de la membrana de eritrocitos con la consecuente difusión de la hemoglobina contenida en ellos hacia el medio externo. En general, los componentes de venenos que inducen hemólisis caen dentro de dos grandes grupos: (1) aquéllos que por sí mismos producen la lisis de los eritrocitos o factores hemolíticos directos (FHD) y, (2) los que a través de su acción catalítica sobre fosfolípidos producen lisoderivados que son los verdaderos agentes hemolíticos (ROY, 1955); éstos componentes con acción hemolítica indirecta han sido identificados como fosfolipasas A_2 .

Venenos de Especies Diferentes. Los venenos de los elápidos por lo común contienen tanto factores hemolíticos directo e indirecto (DE VRIES et al., 1962). La hemoglobinuria, manifestación in vivo de la hemólisis, es un hallazgo frecuente en envenenamiento por elápidos (KELLAWAY, 1929). Los venenos de los crotálicos carecen de FHD, por lo que su potencia hemolítica, generalmente, es menor que la de los elápidos (SAKHIBOV y DAVLATOV, 1969). Esto se explica por la acción sinérgica del FHD y la fosfolipasa A_2 .

Eritrocitos de Especies Diferentes. Los eritrocitos de especies diferentes presentan susceptibilidad distinta a hemólisis por venenos (ROSENFELD et al., 1968; DASS et al 1970). CHOPRA y ROY (1936) observaron que el veneno de la serpiente Russell hemolisa eritrocitos humanos y de cobayo pero no ovinos. TURNER (1957) propone que las diferencias en sensibilidad a hemólisis de los eritrocitos de distintas especies se debe a la relación lecitina/esfingomielina de sus membranas; así, las especies con una relación alta son más lábiles que las que presentan una baja. SCHROETER et al (1972) reporta que los niveles de glutatión reductasa en los eritrocitos están relacionados con la ac-

tividad hemolítica del FHD: células con altos niveles de esta enzima son más sensibles a el FHD.

Hemólisis y Letalidad. La Hemólisis, es sin duda, uno de los muchos efectos tóxicos que los venenos, sobre todo de reptiles, producen. Sin embargo, no es el principal factor letal (CONDREA et al., 1969). Las neurotoxinas aisladas de veneno de cobra no son hemolíticas (IZARD et al., 1969). El factor hemolítico aislado del veneno de Naja oxiana tiene una DL₅₀ de 2.4 ug g-1 en ratones inyectados i.p. (YUKEL'SON et al., 1973) que es mayor (menos potente) que la del veneno o de la toxina purificada, lo que indica que si bien no es altamente tóxico no deja de ser de importancia. En otro estudio se comparó la potencia tóxica y hemolítica del veneno de 6 especies de serpientes y se concluyó que no existía correlación entre la toxicidad global de los venenos y su actividad hemolítica. (NEDYALKOV y MARCHEV, 1971).

FACTOR HEMOLITICO DIRECTO (FHD)

Acciones Biológicas. Debido a que el FHD lisa la membrana de los eritrocitos, su efecto sobre los componentes de membrana y sobre la permeabilidad de la misma ha sido estudiado intensamente. El FHD del veneno de Naja naja se une fuertemente a membranas de fantasmas de eritrocitos (SCHROETER et al., 1973; DAMERAU et al., 1974).

Tratamiento de eritrocitos con el factor hemolítico de Naja naja produjo un aumento en las actividades de gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, adenilato cinasa, 3-fosfoglicerato cinasa y aldolasa, pero no en la actividad de catalasa (FAJNHOLC et al., 1972). En eritrocitos humanos el FHD de Naja oxiana aumenta la permeabilidad al K⁺, así como la conductividad de membrana (YUKEL'SON et al., 1974). Algunos artrópodos poseen también péptidos hemolíticos, como la melitina del veneno de abeja, que por su estructura caracterís-

tica actúa como un potente detergente (HABERMAN, 1972).

Estructura. Todos ellos son péptidos, como el aislado del veneno de Haemachates haemachatus que es un péptido básico que consta de 57 residuos de aminoácidos (ALDOF-HIRSCH et al., 1968). Tiene un peso molecular de 7,000 y contiene 4 puentes disulfuro. Por la posición de éstos últimos los factores hemolíticos del veneno de cobras se clasifican dentro de los péptidos básicos no neurotóxicos, si bien estructuralmente están relacionados con las verdaderas neurotóxicas.

La melitina de abeja es un péptido corto que presenta un extremo altamente hidrofóbico y el otro con un contenido muy elevado de aminoácidos cargados. Esta doble naturaleza hace de él un buen detergente (HABERMAN, 1972).

PAPEL DE LAS FOSFOLIPASAS A₂ EN LA HEMOLISIS.

La lisolecitina, producto de la acción de las fosfolipasas A₂ sobre la fosfatidil colina, es uno de los agentes que puede producir hemólisis. La fosfolipasa A₂ pura, por sí misma, no produce hemólisis o tiene una actividad hemolítica muy baja (CONDREA et al., 1964). La fosfolipasa A₂ pura de Laticauda semifasciata tuvo una UH₅₀ (punto con 50% de hemólisis) de 16 µg, sin embargo, en presencia de 0.1 mg de lecitina, la UH₅₀ se redujo a 0.4 µg; es decir, la fosfolipasa A₂ pura tuvo sólo un 2.5% de la actividad hemolítica encontrada para una mezcla de la enzima con su sustrato (TU, et al., 1970; TU y PASSEY, 1971).

En condiciones hipotónicas la fosfolipasa A₂ puede hemolizar directamente; lo mismo sucede con los eritrocitos obtenidos de pacientes con esferocitosis (LANKISCH y VOGT; 1972). En los dos casos anteriores se postula hay un rearrreglo en la membrana que favorece la acción de la enzima sobre ella.

En algunos casos particulares las fosfolipasas A₂ pueden ser hemolíticas

por sí mismas. Esto se da cuando la enzima es altamente básica. Como fue mencionado previamente, Las fosfolipasas A₂ de venenos no siguen un patrón determinado en sus pIs: las hay ácidas, neutras y básicas. Así, la fosfolipasa A₂ del veneno de Agkistrodon halys blomhoffii que es básica puede lizar eritrocitos aún en ausencia de FHL o de fosfolípidos (MARTIN et al., 1975)

SINERGISMO ENTRE FHD y FOSFOLIPASA A₂

Cuando se usan en forma simultánea fosfolipasa A₂ y FHD la combinación resulta altamente hemolítica (CONDREA et al., 1971; OLDIGS et al., 1971; YUKELSON et al., 1975). Los venenos de Vipera palestinae y V. russelli poseen fosfolipasa A₂ pero no FHD, y ambos carecen de actividad hemolítica per se. Si otros agentes que pueden alterar la membrana se usan en lugar del FHD, las fosfolipasas A₂ producen hemólisis. Resulta claro, entonces, que la función del FHD es alterar la superficie membranal permitiendo a la fosfolipasa A₂ penetrar a la región hidrofóbica de la membrana. A su vez la enzima actúa sobre los fosfolípidos de membrana para producir lisoderivados, que ocasionan mayor destrucción de la membrana celular.

BIBLIOGRAFIA:

- Aloof-Hirsch, S., De Vries, A., Berger, A.: The direct lytic factor of cobra venom: Purification and chemical characterization, *Biochim. Biophys. Acta*, 154, 53 (1969)
- Chopra, R.N., Roy, A.C.: The hemolysis caused by snake venoms: A preliminary report, *Indian Med. Gaz.*, 71, 21 (1936)
- Condrea, E., Barzilay, M., De Vries, A.: Study of hemolysis in the lethal effect of Naja naja venom in the mouse and guinea pig, *Toxicon*, 7, 95, (1969)
- Dass, B., Chatterjee, S.C., Devi, P.: Haemolytic activity of Russell's viper venom, *Indian J. Med. Res.*, 58, 399 (1970)
- De Vries, A., Kirschmann, C., Klibansky, C., Condrea, E., Gitter, S.: Hemolytic action of indirect lytic snake venom in vivo, *Toxicon*, 1, 19 (1962)
- Fajnhole, N.E., Condrea, E., De Vries, A.: Activation of enzymes in red blood cell membranes by a basic protein isolated from cobra venom, *Biochim. Biophys. Acta*, 255, 850 (1972)
- Haberman E.: Bee and wasp venoms. *Science*, N.Y. 177, 314 (1972)
- Izard, Y., Boquet, P., Golémi, E., Goupil, D.: La toxine y n'est pas le facteur lytique direct du venin de Naja nigrocollis, *C. R. Acad. Sci. Paris*, 269, 666 (1969)
- Kellaway, C.H.: A preliminary note on the venom of Pseudechis guttatus, *Med. J. Aust.*, 1, 372 (1929)

- 47
- Lankisch, P.G., Vogt, W.: Direct hemolytic activity of phospholipase A,
Biochim. Biophys. Acta, 270, 241 (1972)
- Martin, J.K., Luthra, M.A., Wells, M.A., Watts, R.P., Hanahan, D.J.: Phos-
pholipase A₂ as a probe of phospholipid distribution in erythrocyte
membranes: Factors influencing the apparent specificity of the reaction
Biochemistry, 14, 5400 (1975)
- Nedyalkov, S. Marchev, N.: Comparative biologic and immunochemical studies
on the viper (Vipera ammodytes ammodytes) venom of African poisonous
snake, Kongr. Mikrobiol. Mater. Kongr. Mikrobiol. Bulg., 2nd 1969, 1,
297 (1971)
- Oldings, H.D., Lege, L., Lankisch, P.G.: Vergleichende Hamolyseversuche an
Meerschweinchen und Rattenerthrocyten in vitro mit Phospholipase A und
Direkt-Lytischem-Faktor aus Cobragift (Naja naja), Naunyn-Schmiedebergs
Arch. Pathol., Pharmacol., 268, 27. (1971)
- Rosenfeld, G., Nahas, L., Kelen, E.M.: "Coagulant, proteolytic, and hemo-
lytic properties of some snake venoms," in W. Bucherl, E.E. Buckley, -
and V. Deulofeu, Eds., Venomous Animals and Their Venoms, Vol. 1, Aca-
demic, New York, pp. 229-274 (1968)
- Roy, A.C.: Lecithin and venom hemolysis, Nature, 155, 696. (1955)
- Sakhibov, D.N., Davlyatov, Y.: Comparative study of the direct hemolytic -
activity of the venom from Central Asian snake, Ref. Zh. Farmakol. Khibi-
mioter. Siedstva Toksikol., Abstract No. 254882 (1969)
- Schoroeter, R., Lankisch, P.G., Lege, L., Vogt, W.: Possible implication of

- glutathione reductase in hemolysis by the direct lytic factor of cobra venom (Naja naja), Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Exp. Pathol. Pharmacol., 275, 203. (1972)
- Schroeter, R., Damerau, B., Vogt, W.: Differences in binding of the direct lytic factor (DLF) of cobra venom (Naja naja) in intact red cells and ghosts, Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Exp. Pathol. Pharmacol., 280, 201. (1973)
- Tu, A.T., Passey, R.B.: "Phospholipase A from sea snake venom and its biological properties," in A. De Vries and E. Kochva, Eds., *Toxins of Animal and Plant Origin*, Gordon and Breach, New York, pp. 419-436 (1971)
- Tu, A.T., Passey, R.B., Toom, P.M.: Isolation and characterization of phospholipase A from sea snake, Laticauda semifasciata, venom, Arch. Biochem. Biophys., 140, 96. (1970)
- Turner, J.C.: Absence of lecithin from the stromata of the red cells of certain animals (ruminants.), and its relation to venom hemolysis. J. Exp. Med. 105, 189 (1957)
- Yukel'son, L.Y., Krasil'nikov, O.V., Isaev, P.L., Tashmukhamedov, B.A.: Effect of the direct hemolytic factor of cobra venom on the conductivity of bimolecular phospholipid membranes, Khim. Prir. Soedin., 5, 688. (1974)
- Yukel'son, L.Y., Sadykov, E., Sakhilov, D.N., Sorokin, V.M.: Effect of "direct" hemolytic factor and phospholipase A₂ Central-Asian cobra venom on erythrocytes, Biokhimiya, 40, 589. (1975)
- Yukel'son, L.Y., Sadykov, E.S., Sorokin, V.M.: Direct hemolytic factor of the venom of Naja oxiana, Uzb. Biol. Zh., 17, 12. (1973)

COMPARISON OF PHOSPHOLIPASE ACTIVITY WITH DIRECT AND INDIRECT LYTIC EFFECTS OF ANIMAL VENOMS UPON HUMAN RED CELLS*

BEATRIZ P. SOSA¹, ALEJANDRO C. ALMOGÓN¹, LUIS NIVAL D. PONSANI^{1,†}
AND JESÚS Z. JULIÁ

¹Departamento de Neurociencias, Centro de Investigaciones en Fisiología Celular and Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina, Apartado Postal 7-460, Universidad Nacional Autónoma de México, México 20 D.F., México and ²Instituto Nacional de Higiene, Secretaría de Salud y Asistencia, México 17, D.F., México

(Received 5 February 1979)

Abstract—1. The venoms of 22 species of arthropods, scorpions, vipers and crotalids were studied concerning the phospholipase activity and the presence of a direct and an indirect lytic effect upon human red cells.

2. The venoms from the spiders *Latrodectus* and "tarantula", and the venoms from the scorpions of the genus *Centruroides* are not haemolytic and do not have phospholipase activity.

3. Only the venoms of *Apis mellifera* and *Naja naja siamensis* have shown a direct lytic effect.

4. All other venoms studied have an indirect haemolytic effect associated to a phospholipase activity, but there is indication that other agents might be implicated in the haemolytic processes.

INTRODUCTION

For several decades it has been known that the venom of snakes preincubated with phospholipids may develop an important haemolytic effect on washed red cells (Roy, 1945). This effect, mediated by the presence of lysophosphatidic derivatives is attributed to the presence of an indirect lytic factor (ILF)†. The phospholipase activity of the venom from poisonous animals has been identified as the indirect lytic factor (Roy, 1945; De Vries *et al.*, 1962; Condrea *et al.*, 1964a,b; Klibanov *et al.*, 1966; Tu *et al.*, 1970). A similar effect was reported for a scorpion venom by Kurup (1966). It is also known that the venom of certain *Elapidae* snakes contains a direct lytic factor (DLF)‡ (revised by Tu, 1977). Alkof-Hirsch *et al.* (1968) reported the purification and characterization of a peptide from cobra venom which displays an important direct lytic effect. The arthropods venom may also contain a peptide, like melittin from the bee venom (Halberman, 1972), which can cause a lytic action on erythrocytes.

The study of such direct and indirect lytic agents as well as the study of phospholipases are important for the understanding of the haemolytic processes that can take place under intoxication by the bite of venomous animals. In this paper we have measured and compared the haemolytic effect of twenty two different venoms, belonging to nine families of arthropods,

scorpions and snakes, with the phospholipase activity of the same venoms measured by an independent method. For most of the species studied this is the first published report concerning the presence or absence of such components. These results might be useful in isolating a desired component from an appropriate venom (Mehs, 1970).

MATERIALS AND METHODS

Source of venoms

Most of the venoms were obtained from animals collected in the field (Mexico), except *Apis mellifera* (Sigma), *Naja naja siamensis* (Miami Serpenterium) and *Bothrops leucurus* (gift from the Instituto Butantan, São Paulo, Brazil). The place of collection is indicated after the name of the species: *Polistes* sp. (Cañón de Lobos, Morelos), *Centruroides elegans* (Charrala, Jalisco), *Centruroides limpidus limpidus* (Jiquila, Guerrero), *Centruroides maximus* (Panatón, Nayarit), *Vejovis parvulus parvulus* (Acación de Oyaric, Puebla), *Latrodectus mactans mactans* (Ciudad Sahagún, State of Mexico), *Heloderma horridum horridum* (Chumela, Jalisco), *Heloderma horridum aharezi* (Taxtla Gutiérrez, Chiapas), *Micruurus laticephalus maculirostris* and *Crotalus basiliscus basiliscus* (State of Colima), *Crotalus durissus durissus* (Zihuatanejo, Guerrero), *Crotalus molossus nigrescens* (Ciudad Universitaria, Mexico City), *Crotalus enyo enyo* (Baja California Sur), *Crotalus ruber ruber* (Baja California Norte), *Bothrops asper* (San Juan Evangelista, Veracruz), *Bothrops ichuanus* and *Bothrops dami* (La Ventosa, Oaxaca), *Bothrops nummifer nummifer* (Ocozocoautla, Chiapas) and finally an unknown spider from the family *Theraphosidae*, commonly named "tarantula" (Venustiano Carranza, Puebla)§.

The venoms of the arthropods were obtained by electrical stimulation of anaesthetized animals. The venoms from the vertebrates were obtained by mechanical stimulation. After extraction, all venoms were immediately centrifuged at 5000 *g* for 5 min and the supernatant (soluble venom) was frozen or lyophilized and kept at -20°C .

* An abstract of this paper was presented during the 21st National Congress of the Physiological Sciences, p. 143, Chihuahua, México (1978).

† To whom all correspondence should be addressed.

‡ Abbreviations used: ILF—indirect lytic factor; DLF—direct lytic factor.

§ We maintain several spiders alive in the laboratory; anybody wishing to work with the "tarantula" may refer to us.

BIBLIOGRAFIA

- Botes, D.P., Viljoen, C.C.: Bitis gavanica venom. The amino acid sequence of phospholipase A. *J. Biol. Chem.* 249, 3827-3835 (1974 a)
- Botes, D.P., Viljoen, C.C.: Purification of phospholipase A from Bitis gavanica venom. *Toxicon* 12, 611-619 (1974 b)
- Breithaupt, H.: Enzymatic characteristic of Crotalus phospholipase A₂ and the crotoxin complex. *Toxicon* 14, 221-233 (1976)
- Chinen, I.: Phospholipase A activity of habu snake venom by using chicken serum as a substrate. *Ryuku Daigaku Nogakubu Gakujutsu Hokoku* 19, 259 (1972)
- Currie, B.T., Oakley, D.E., Broomfield, C.A.: Crystalline phospholipase A associated with a cobra venom toxin. *Nature (Lond.)* 220, 371 (1968)
- Delori, P.: Purification et Propriétés physico-chimiques et biologiques d'une phospholipase A₂ toxique isolée d'un venin de serpent Viperidae: Vipera berus. *Biochimie* 55, 1031-1045 (1973)
- Deuth, H.F., Diniz, C.R.: Some proteolytic activities of snake venoms. *J. Biol. Chem.* 216, 17-26 (1955)
- De Haas, G.H., Slotboom, A.J., Bensen, P.P.M., Van Deenen, L.L.M., Maroux, S., Puigserver, A., and Desnuelle, P. Studies on phospholipase A and to zymogen from porcine pancreas. I. The complete aminoacid sequence. *Biochem. Biophys. Acta.* 221, 31-53
- Evenberg, A., Myer, H., Gaastra, W., Verhey, H.M., and de Haas, G.H.: Amino acid sequence of phospholipase A₂ from pancreas. *J. Biol. Chem.* 252, 1189-1196 (1977)
- Hachimimori, Y., Wells, M., Hanahan, D.J.: Observations on the phospholipase

- Hachimimori, Y., Wells, M., Hanahan, D.J.: Observations on the phospholipase A₂ of Crotalus atrox: Molecular weight and other properties. *Biochemistry* 10, 4084-4089 (1971)
- Heinrickson, R.L., Krueger, E.T., y Keim, P.S.: Amino acid sequence of phospholipase A₂ - from the venom of Crotalus adamanteus, *J. Biol. Chem.* 252, 4913-4921 (1977)
- Iwanaga, S., Kawauchi, S.: Studies on snake venoms V. Column chromatography of lecithinase A in Japanese Mamushi venom (Agkistrodom halys blomhoffii BOIE). *J. Pharm. Soc. Jpn.* 79, 582-586 (1959)
- Iwanaga, S., Suzudi, T.: Enzymes en snake venom. En Lee, C.Y. (Ed.): Snake Venoms. Handbook of Experimental Pharmacology, vol. 52, pp. 61-158, Springer Verlag, Berlin-Heidelberg-New York 1979
- Iwanaga, S., Yang, C.C., Kawachi, S.: Some observations on the column chromatography of Formosan cobra venom. *J. Pharm. Soc. Jpn.* 78, 791-794 (1958)
- Joubert, F.J. Hemachatus Haemachatus (Ringhals) venom. Purification, some properties and amino-acid sequence of phospholipase A (Fraction DE-I). *Eur. J. Biochem.* 52, 539-554 (1975 a)
- Joubert, F.J.: Naja melanoleuca (Forest cobra) venom. The amino-acid of phospholipase A, fractions DE-I and DE-II, *Biochem Biophys Acta.*, 379, 345-359. (1975 b)
- Joubert, F.J. Van der Walt, S.J.: Naja melanoleuca (Forest cobra) venom. Purification and some properties of phospholipase A. *Biochim. Biophys. Acta. (Amst.)* 379, 317-328 (1975 c)

- Kaiser, D., Michel, H.: Die Biochemie der tierischen Gifte. Wien: Franz Deuticke 1958
- Kawauchi, S., Iwanaha, S., Samejima, Y., Suzuki, T.: Isolation and characterization of two phospholipase A's from the venom of Agkistrodon halys blomhoffii. *Biochim. Biophys. Acta (Amst)* 236, 142-160 (1971 A)
- Laskowski, M.: Exonuclease (phosphodiesterase) and other nucleolytic enzymes from venom. In: Cantoni, G.L., Davies, D.R. (Eds.): *Procedures in Nucleic acid Research*, Vol. 1, pp: 154 - 187, New York-Evanston-London: Harper-Row 1966
- Marinetti, G.V.: In vitro lipid transformation in serum. *Biochim. Biophys. Acta (Amst.)* 46, 468-478 (1961)
- Meaume, J.: Les venins des serpents agents modificateurs de la coagulation sanguine. *Toxicon* 4, 25-58 (1966).
- Mebs, D.: Preliminary studies on small molecular toxic components of Elapid venoms. *Toxicom* 6, 247-253 (1969)
- Mebs, D.: A comparative study of enzyme activities in snake venoms. *Int. J. Biochem.* 1, 335-342 (1970)
- Meister, A.: *Biochemistry of Amino Acid*. New York-London: Academic Press 1965
- Meldrum, B.S.: The actions of snake venom on nerve and muscle. The pharmacology of phospholipase A and polypeptide toxins. *Pharmacol. Rev.* 17, 398-445 (1965)
- Mella, K., Volz, M., Pfeleider, G.: Application of Grotalus atrox venom protease for amino acid sequence determination. *Anal. Biochem.* 21, 219-226 (1967)

- Minton, S.A.: Venom Diseases. Springfield (Ill): Charles C. Thomas 1974
- Nair, B.C., Nair, C., Elliott, W.B.: Temperature stability of phospholipase A activity. II. Variations in optimum temperature of phospholipase A₂ from various snake venoms. *Toxicon* 14, 43-47 (1976)
- Pattnaik, M.M., Kezdy, F.I., Scanu, A.M.: Kinetic study of the action of snake venom phospholipase A₂ on human serum high density lipoprotein 3. *J. Biol. Chem.* 251, 1984-1990 (1976)
- Raudonat, H.W., Rocha e Silva, M.: Separation of the bradykinin releasing enzyme from the clotting factor in venom from Bothrops Jararaca. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmacol.* 243, 232-236 (1962)
- Rock, C.O., Snyder, F.: Rapid purification of phospholipase A₂ from Crotalus Adamanteus venom by affinity chromatography. *J. Biol. Chem.* 250, 6564-6566 (1975)
- Russell, F.E., Eventov, R.: Lethality of crude and lyophilized Crotalus venom. *Toxicon* 2, 81-82 (1964)
- Salach, J.I., Turini, P., Seng, R., Hauber, J., Singer, T.P.: Phospholipase A of snake venoms. I. Isolations and molecular properties of isoenzymes from Naja naja and Vipera russellii venoms. *J. Biol. Chem.* 246, 331-339 (1971)
- Samejima, Y., Iwanaga, S., Suzuki, T. Amino acid sequence of snake venom phospholipase A. *FEBS Lett.* 47, 348-351 (1974).
- Shiloah, J., Klibansky, C., de Vries, A., Berger, A.: Phospholipase B activity of a purified phospholipase A from Vipera palestinae. *J. Lipid Res.* 14, 267-278 (1973 c)
- Singer, S.J.: The molecular organization of biological membranes, In: Roth-

- field, L.I. (Ed.): Structure and Function of Biological Membranes, pp. 146-222. New York-London: Academic Press 1971
- Slotta, K.: Chemistry and biochemistry of snake venoms. Prog. Chem. Org. Nat. Prod. 12, 406-465 (1955)
- Smith, M.A., Hindle, E.: Experiments with the venom of Laticauda, Pseudechis and Trimeresurus species. Trans. roy. Soc. trop. Med. Hyg. 25, 115-120 (1931)
- Suzuki, T., Iwanaga, S.: Snake venoms. In: Erdos, E.G. (Ed.): Bradykinin, Kallidin, and Kallikrein. Handbook of Experimental Pharmacology, Vol. 25, pp. 193-212, Springer, Berlin-Heidelberg-New York: Springer 1970
- Tsao, F.C., Keim, P.S., Henrikson: Crotalus adamanteus phospholipase A₂-x: Subunit structure, NH₂-terminal sequence, and homology with other phospholipases. Arch. Biochem. Biophys. 167, 706-717 (1975)
- Tu, A.T.: Venoms. Chemistry and Molecular Biology, pp. 23-63. New York-London-Sydney
- Tu, A.T., Passey, R.B., Toom, P.M.: Isolation and characterization of phospholipase A from sea snake, Laticauda semifasciata venom. Arch. Biochem. Biophys. 140, 96-106 (1970)
- Uwatoko-Setoguchi, Y., Ohno, F. Studies on sea snake venom. V. Some properties of phospholipase A in Laticauda semifasciata venom. Acta. Med. Univ. Kagoshima. 11, 139-143 (1969)
- Van Deenen, L.L.M., de Haas, G.H.: The substrate specificity of phospholipase A. Biochim. Biophys. Acta (Amst.) 70, 538-553 (1963)

- Van Deenen, L.L.M., de Haas, G.H.: Phosphoglycerides and phospholipases
Ann. Rev. Biochem. 35, 157-194 (1966)
- Van der Walt, S.J., Joubert, F.J.: Studies on puff adder (Bitis arietans)
venom II. Specificity of protease A. Toxicon 10, 341-349 (1972)
- Vidal, C.A., Cattaneo, P., Stoppani, A.O.M.: Some characteristic of phospholipase A₂ from Bothrops neuwiedii venom. Arch. Biochem. Biophys. 151, 168-179 (1972)
- Vidal, J.C., Stoppani, A.O.M.: Isolation and purification of two phospholipase A from Bothrops venoms. Arch. Biochem. Biophys. 145, 543-556 (1971)
- Viljoen, C.C., Botes, D.P., Schabert, J.C.: Spectral properties of Bitis gavanica venom phospholipase A, in the presence of divalent metal ion, substrate and hydrolysis products. Toxicon 13, 343-351 (1975)
- Wahlstrom, A.: Purification and characterization of phospholipase A from the venom of Naja nigricollis. Toxicon 9, 45-56 (1971)
- Wells, M.A.: Evidence that the phospholipases A₂ of Crotalus adamanteus are dimer. Biochemistry 10, 4074-4078 (1971 a)
- Wells, M.A.: Evidence for O-acyl cleavage during hydrolysis of 1,2-diacyl-sn-glycero-3-phosphorylcholine by the phospholipase A₂ of Crotalus adamanteus venom, Biochim. Biophys. Acta (Amst.) 248, 80-86 (1971 b)
- Wells, M.A.: A kinetic study of the phospholipase A₂ (Crotalus adamanteus) catalyzed hydrolysis of 1,2-dibutyryl-sn-glycero-3-phosphorylcholine. Biochemistry 11, 1030-1041 (1972)