



UNIVERSIDAD REGIONAL AMAZÓNICA IKIAM

Facultad de Ciencias de la Vida

Carrera de Ingeniería en Biotecnología

**Variación bioquímica y toxicológica de venenos de
Bothrops atrox en la Amazonía ecuatoriana:
implicaciones clínicas y terapéuticas**

Ricardo Sebastian Palma Patiño

26 de febrero de 2020, ciudad de Tena, Napo, Ecuador.

Declaración de derecho de autor, autenticidad y responsabilidad

Tena, 26 de febrero de 2020

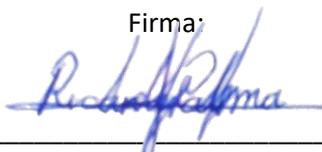
Yo, Ricardo Sebastian Palma Patiño con documento de identidad N° 1725111999, declaro que los resultados obtenidos en la investigación que presento en este documento final, previo a la obtención del título Ingeniero en Biotecnología son absolutamente inéditos, originales, auténticos y personales.

En virtud de lo cual, el contenido, criterios, opiniones, resultados, análisis, interpretaciones, conclusiones, recomendaciones y todos los demás aspectos vertidos en la presente investigación son de mi autoría y de mi absoluta responsabilidad.

Por la favorable atención a la presente, suscribo de usted,

Atentamente,

Firma:



Ricardo Sebastian Palma Patiño

Certificado de dirección de trabajo de integración curricular

Certifico que el trabajo de integración curricular titulado: “Variación bioquímica y toxicológica de venenos de *Bothrops atrox* en la Amazonía ecuatoriana: implicaciones clínicas y terapéuticas”, en la modalidad de: proyecto de investigación en formato tesis fue realizado por: Ricardo Sebastian Palma Patiño, bajo mi dirección.

El mismo ha sido revisado en su totalidad y analizado por la herramienta de verificación de similitud de contenido; por lo tanto, cumple con los requisitos teóricos, científicos, técnicos, metodológicos y legales establecidos por la Universidad Regional Amazónica Ikiam, para su entrega y defensa.

Tena, 26 de febrero de 2020

Firma:



José Rafael de Almeida

C.I: 1757448954

Firma:



David Salazar Valenzuela

C.I: 1711099604

APROBACIÓN DEL TRIBUNAL

AGRADECIMIENTOS

A José Rafael de Almeida, por todo el conocimiento y la experiencia que me ha compartido como docente, tutor y amigo. Por su confianza y las oportunidades brindadas que me han permitido crecer en el ámbito académico y más importante, como persona.

A David Salazar por la confianza depositada en nuestro grupo de investigación y su valioso aporte para ejecutar el presente proyecto.

A la fundación Global Snakebite Initiative por el financiamiento del presente proyecto, permitiéndonos generar información relevante para la sociedad.

Al hospital José María Velasco Ibarra por la apertura, la donación de reactivos utilizados en el estudio y la colaboración en el proceso de toma de datos.

A Joel Medina, por su acompañamiento en las primeras fases del proyecto y el conocimiento compartido.

A Nina Espinoza de los Monteros por el apoyo en las actividades realizadas en el Laboratorio de Biología Molecular y Bioquímica.

A Carolina Proaño, Caroline Bacquet y Yeimy Rojas, por sus valiosos comentarios y observaciones que han sido significativos en el proceso de finalización del presente trabajo.

Por último, pero no menos importante, a mi grupo de investigación por su constante apoyo durante la realización del presente proyecto.

DEDICATORIA

A mi madre por su esfuerzo y apoyo, aún en las situaciones más difíciles.

ÍNDICE GENERAL

CARÁTULA

| | |
|--|-----|
| DERECHO DE AUTOR | ii |
| CERTIFICADO DEL DIRECTOR | iii |
| APROBACIÓN DEL TRIBUNAL..... | iv |
| AGRADECIMIENTOS..... | v |
| DEDICATORIA..... | vi |
| ÍNDICE GENERAL..... | vii |
| ÍNDICE DE TABLAS..... | ix |
| ÍNDICE DE FIGURAS..... | x |
| RESUMEN..... | xi |
| ABSTRACT | xii |
| CAPÍTULO I: PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN | 1 |
| 1.1. Antecedentes | 1 |
| 1.2. Planteamiento del problema | 6 |
| 1.3. Justificación de la investigación | 6 |
| 1.4. Objetivos de la investigación | 8 |
| CAPÍTULO II: MARCO METODOLÓGICO..... | 9 |
| 2.1. Venenos | 9 |
| 2.2. Perfil bioquímico | 10 |
| 2.3. Caracterización de la actividad enzimática..... | 11 |
| 2.4. Caracterización de las actividades toxicológicas | 12 |
| 2.5. Ensayos de neutralización..... | 14 |
| 2.6. Análisis de datos epidemiológicos, caracterización de signos y síntomas en accidentes ofídicos con <i>B. atrox</i> y tratamiento | 15 |
| 2.7. Análisis estadístico | 15 |

| | |
|---|----|
| CAPÍTULO III: PRESENTACIÓN DE DATOS Y RESULTADOS | 16 |
| 3.1. Perfil bioquímico de los venenos de individuos de <i>B. atrox</i> | 20 |
| 3.2. Caracterización de la actividad enzimática de los venenos de individuos de <i>B. atrox</i> | 20 |
| 3.3. Caracterización toxicológica de los venenos de individuos de <i>B. atrox</i> | 21 |
| 3.4. Actividad letal de los venenos de individuos de <i>B. atrox</i> | 22 |
| 3.5. Neutralización de los efectos toxicológicos de los venenos de individuos de <i>B. atrox</i> | 24 |
| 3.6. Análisis de datos epidemiológicos, caracterización de signos y síntomas en accidentes ofídicos con <i>B. atrox</i> y tratamiento | 26 |
| CAPÍTULO IV: INTERPRETACIÓN Y DISCUSIÓN | 33 |
| CAPÍTULO V: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES | 47 |
| REFERENCIAS | 48 |

ÍNDICE DE TABLAS

| | |
|---|----|
| Tabla 1. Neutralización de los venenos de <i>B. atrox</i> con el antiveneno ICP, empleado en Ecuador..... | 25 |
| Tabla 2. Datos epidemiológicos de los 133 casos de ofidismo reportados en el hospital de Tena en el período 2015-2019.. | 28 |
| Tabla 3. Gravedad de envenenamiento y tiempo de hospitalización en accidentes con <i>B. atrox</i> | 29 |
| Tabla 4. Manifestaciones clínicas a nivel local de envenenamiento con <i>B. atrox</i> | 29 |
| Tabla 5. Manifestaciones clínicas a nivel sistémico de los pacientes de envenenamiento con <i>B. atrox</i> | 30 |
| Tabla 6. Datos sobre coagulación sanguínea en pacientes de envenenamiento con <i>B. atrox</i> .. | 31 |
| Tabla 7. Administración del antiveneno a pacientes de envenenamiento con <i>B. atrox</i> y complicaciones derivadas..... | 31 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1. Sitios de muestreo de individuos de <i>B. atrox</i> para recolección de muestras de veneno | 9 |
| Figura 2. Gel de electroforesis en poliacrilamida (SDS-PAGE) de los venenos totales de individuos de <i>B. atrox</i> | 16 |
| Figura 3. Perfil cromatográfico de los venenos de individuos de <i>B. atrox</i> | 19 |
| Figura 4. Caracterización enzimática de los venenos de individuos de <i>B. atrox</i> | 20 |
| Figura 5. Caracterización toxicológica de los venenos de individuos de <i>B. atrox</i> | 22 |
| Figura 6. Caracterización de la letalidad de los venenos de individuos de <i>B. atrox</i> | 23 |
| Figura 7. Efecto hemorrágico del veneno de <i>B. atrox</i> y su neutralización. | 24 |
| Figura 8. Número de casos de accidentes ofídicos e incidencia anual para cada 50000 habitantes. | 26 |
| Figura 9. Localidades reportadas en el hospital de Tena como lugares donde se suscitaron accidentes ofídicos. | 27 |
| Figura 10. Sitios de mordedura en paciente ingresados por accidente ofídico al hospital de Tena.. | 28 |

RESUMEN

Bothrops atrox es la especie de serpiente venenosa que ocasiona la mayor cantidad de accidentes ofídicos en la Amazonía ecuatoriana. Pese a su importancia clínica, la composición y actividades de su veneno han sido escasamente estudiadas en el país. Por otra parte, varios trabajos han documentado la presencia de variaciones bioquímicas a nivel interespecífico e intraespecífico en el veneno de *B. atrox*. Considerando las implicaciones clínicas que pueden derivar de la variación bioquímica y toxicológica, el presente trabajo tuvo como objetivo realizar la caracterización de venenos de individuos *B. atrox* de la Amazonía ecuatoriana. Los perfiles bioquímicos de los venenos obtenidos mediante RP-HPLC y electroforesis y la caracterización enzimática evidenciaron la presencia de diferencias a nivel poblacional e individual. En los ensayos toxicológicos se evidenciaron variaciones significativas al comparar las actividades de muestras colectadas en distintas localidades. El antiveneno polivalente tuvo una eficiencia satisfactoria ante los efectos hemorrágicos y letales, con excepción de dos venenos, para los que se requirieron dosis altas. Finalmente, el análisis de las características del envenenamiento de *B. atrox* en pacientes hospitalarios demostró la presencia de variaciones en los signos y síntomas reportados, así como algunas complicaciones derivadas del evento. En general, el tratamiento con antiveneno tuvo un desempeño satisfactorio y baja frecuencia de reacciones adversas. Sin embargo, la variabilidad en las manifestaciones clínicas y altas dosis de suero antiofídico requeridas, tanto en los datos de laboratorio como en pacientes hospitalarios, señalan la necesidad de realizar más estudios similares a este.

Palabras clave: *Bothrops atrox*, envenenamiento, antiveneno, variación, epidemiología, implicaciones clínicas.

ABSTRACT

Bothrops atrox is the species of venomous snake that causes the greatest number of snakebites in the Ecuadorian Amazon. Despite its clinical importance, the composition and activities of its venom have been scarcely studied in the country. On the other hand, several works have documented the presence of variations at an interspecific and intraspecific level in the *B. atrox* venom. Considering the clinical implications that may derive from biochemical and toxicological variation, the present work aimed to characterize venoms from *B. atrox* individuals in the Ecuadorian Amazon. The biochemical profiles of the venoms obtained by RP-HPLC and electrophoresis and the enzymatic characterization evidenced the presence of differences at the population and individual level. Significant variations were evidenced in the toxicological assays when comparing the activities of samples collected in different locations. The antivenom had a satisfactory efficiency against the hemorrhagic and lethal effects, with the exception of two samples, for which high doses were required. Finally, the analysis of the characteristics of *B. atrox* envenoming in hospital patients showed the presence of variations in the reported signs and symptoms, as well as some complications derived from the event. In general, the antivenom treatment had a satisfactory performance and low frequency of adverse reactions. However, the variability in the clinical manifestations and high doses of antivenom required, both in laboratory data and in hospital patients, indicate the need for more studies similar to this one.

Keywords: *Bothrops atrox*, envenoming, antivenom, variation, epidemiology, clinical outcomes.

CAPÍTULO I: PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

1.1. Antecedentes

Los venenos de serpientes son una mezcla compleja de proteínas, péptidos y moléculas orgánicas e inorgánicas con actividades biológicas. Han sido útiles para el desarrollo de fármacos y como herramientas moleculares para la comprensión de la evolución de este grupo de animales [1-4]. Se producen en glándulas exocrinas especializadas y se consideran una adaptación que permite a las serpientes venenosas utilizar un arsenal enzimático y molecular ante una presa [5-7]. Compuestos mayoritariamente por proteínas, su rol primordial es facilitar la captura de la presa, así como su digestión mediante la interacción con blancos celulares [8, 9]. Sus elementos principales desencadenan una variedad de efectos los cuales han sido evidenciados tanto en presas como en víctimas accidentales, como los humanos [4]. Un caso de envenenamiento se caracteriza principalmente por presentar efectos como daño a nivel local en el sitio de mordedura, miotoxicidad, cardiotoxicidad, neurotoxicidad, coagulopatía, hemorragia y daño renal [10, 11].

En la actualidad, los accidentes ofídicos representan un problema de salud pública, con gran impacto en países tropicales subdesarrollados. Se estima que anualmente se presentan más de 2,5 millones de envenenamientos ofídicos, con una mortalidad de entre 220 y 380 casos diarios [12]. Es muy probable que la cantidad de casos reportados oficialmente sea inferior a los reales, debido a la escasez de datos epidemiológicos completos y la limitada robustez de las bases de información de salud pública [13, 14]. Debido a la magnitud del impacto social y económico causado por el ofidismo y a la falta de acciones para remediarlo, en el 2017 fue categorizada como enfermedad tropical desatendida por la Organización Mundial de la Salud (OMS)[15]. Esta enfermedad afecta principalmente a comunidades de zonas rurales, en lugares con altos índices de pobreza, por lo cual muchas víctimas no tienen acceso al sistema de salud o buscan otras opciones alternas a los tratamientos médicos validados [16]. Por este motivo, se estima que una cantidad significativa de casos no son reportados [17].

Por sus características biogeográficas y socioeconómicas, Latinoamérica es una región con alta incidencia anual de envenenamientos por mordedura de serpiente. La tasa

anual es de 70000 accidentes por año, siendo los envenenamientos por víboras del género *Bothrops* los más representativos [18, 19]. En Ecuador se mantiene la misma tendencia, siendo *Bothrops atrox* y *Bothrops asper* las serpientes causantes de la mayor proporción de envenenamientos reportados en la región amazónica y costa del país respectivamente [20].

1.1.1. Tratamiento del envenenamiento ofídico

La caracterización del veneno de especies de serpientes de importancia clínica es una prioridad en la actualidad. El estudio de la composición y actividades biológicas y enzimáticas de venenos de ofidios permite la obtención de datos robustos para el diseño y desarrollo de estrategias terapéuticas [13]. Es así como se ha llegado a la producción de antivenenos actualmente aplicados a nivel clínico, los cuales están compuestos de inmunoglobulinas heterólogas aisladas del suero de animales. Los anticuerpos obtenidos neutralizan la acción de las toxinas del veneno y se producen a partir de la inmunización de animales como caballos u ovejas con un pool de venenos de una región geográfica delimitada [21]. La efectividad de esta inmunoterapia depende de algunos factores como el lapso de tiempo hasta su aplicación, la ruta de administración y el uso de dosis correctas [22]. En la actualidad, estos fármacos son el único tratamiento validado científicamente ante un caso de ofidismo [23].

Los antivenenos comerciales en su mayoría son fabricados con pools de venenos de varias especies clínicamente relevantes. Un ejemplo es el suero antiofídico polivalente manufacturado por el Instituto Clodomiro Picado (ICP) de la Universidad de Costa Rica, el cual se utiliza actualmente en el Ecuador [20]. Para su producción se inmunizan caballos con cantidades iguales de venenos colectados de *Bothrops asper*, *Crotalus simus* y *Lachesis stenophrys*. Al ser polivalente, puede aplicarse para neutralizar el envenenamiento de varias especies [21]. Sin embargo, la efectividad de la neutralización o especificidad puede verse comprometida debido a la variabilidad venómica como se ha reportado en algunos trabajos [24-26]. Por lo anteriormente expuesto, la definición de los inmunógenos constituye una etapa determinante para el éxito de la producción y aplicación clínica de este producto biológico.

1.1.2. Variación venómica a nivel individual

El estudio del proteoma de venenos o venómica, ha permitido evidenciar la presencia de variaciones a nivel interespecífico e intraespecífico. La variación de fenotipo en poblaciones de serpientes ha sido reportada en investigaciones a nivel regional [27, 28] y mundial [29, 30]. Los cambios en el fenotipo involucran diferencias significativas en la abundancia de familias de proteínas, lo que provoca variaciones en las actividades toxicológicas y enzimáticas del envenenamiento dificultando su tratamiento [7]. A nivel molecular, se ha evidenciado que los genes que codifican toxinas atraviesan procesos de duplicación de manera frecuente, seguido de una diversificación funcional y estructural [26]. La variación en la composición de los venenos se ha atribuido a procesos de fluctuación genómicos y postgenómicos, que pueden afectar a la eficiencia de los antivenenos [31].

Las diferencias proteómicas y toxicológicas se han asociado a múltiples factores como la distribución geográfica, edad, sexo y alimentación de los ofidios y se ha relacionado con su capacidad para adaptarse a diferentes entornos [32]. Este intrigante fenómeno es notorio en especies con una amplia distribución como es el caso de *B. atrox* y *B. asper*, que habitan en varias zonas de América Latina [18, 21]. La variación venómica a nivel de individuos también ha sido estudiada. Investigaciones como las realizadas por Oliveira et al. [33] y Aguiar et al. [34] han demostrado la existencia de diferencias individuales relevantes y críticas que originan cambios bioquímicos e inmunológicos en los envenenamientos.

1.1.3. Influencia de la variabilidad venómica en la eficiencia y seguridad de los antivenenos

Para la producción de antivenenos eficientes se requiere de ensayos que evalúen su potencial de neutralización, además de considerar datos bioquímicos, inmunológicos, clínicos y epidemiológicos [35]. Es así como se ha documentado ampliamente que la variación interespecífica e intraespecífica en la composición del veneno puede afectar la capacidad de neutralización de los antivenenos [26]. Es por esto que la caracterización del proteoma de venenos de serpiente es de gran importancia, puesto que permite la

generación de tratamientos efectivos ante un accidente ofídico, así como la descripción de los efectos causados en humanos [32]. Así mismo, en el diseño de un antiveneno se debe considerar la disminución de posibles reacciones hipersensibles ante su uso. Este tipo de reacciones puede originar complicaciones como erupciones cutáneas, vómitos, náuseas, hipotensión y shock anafiláctico [36].

Varios estudios han evaluado la capacidad de neutralización de antivenenos ante el veneno de varias especies [24, 37, 38]. Los sueros pueden mostrar reactividad cruzada y neutralizar los efectos tóxicos de venenos que no fueron incluidos en el pool para su producción [37]. Sin embargo, su eficiencia puede disminuir al ser probado en casos de ofidismos producidos por diferentes especies [39]. Incluso se ha podido evidenciar que algunos antivenenos tienen una baja eficiencia para neutralizar moléculas como las fosfolipasas A₂ (PLA₂) y metaloproteinasas clase III (PIII-SVMP), que son altamente conservadas en especies bothrópicas [18]. Esto indica que se pueden requerir altas dosis del biofármaco para neutralizar los efectos tóxicos del veneno. Esta variación en la potencia de neutralización de los antivenenos también se ha verificado mediante el análisis de datos epidemiológicos. Trabajos como el de Smalligan et al. [40] demuestran como la capacidad de neutralización de sueros antiofídicos manufacturados en diferentes países difiere en pacientes de ofidismo internados en la provincia de Pastaza. Así mismo se verificó que algunos de los antivenenos evaluados poseen una mayor probabilidad de generar reacciones alérgicas.

1.1.4. Ofidismo en Ecuador

Los accidentes bothrópicos son los más comunes en América Latina. Las serpientes de este género tienen una distribución que va desde la zona norte de México hasta Argentina, incluyendo zonas del Caribe [32]. Los miembros de *Bothrops* son diversos en su morfología e historia natural, y representan un grupo particularmente interesante debido a la amplia gama de tipos de hábitats donde han sido reportados, tales como bosques de tierras bajas, bosques montanos, sabanas y formaciones abiertas montanas [41]. Su envenenamiento se caracteriza por causar marcados efectos locales como edema y mionecrosis. Además, es común que genere alteraciones en la coagulación sanguínea y complicaciones como necrosis, infección bacteriana, falla renal y shock [18, 32].

En Ecuador, el género está representado por nueve especies [42], de las cuales dos son responsables por el 70% de accidentes ofídicos a nivel nacional: *B. asper* y *B. atrox*, ambas conocidas de manera común como equis [20]. En la actualidad, el antiveneno distribuido en el país es el fabricado en el ICP de Costa Rica, para envenenamientos con vipéridos. El Instituto Nacional de Salud Pública e Investigaciones (INSPI) de Ecuador, estuvo a cargo de la producción, hasta su cese en 2014 por factores relacionados con buenas prácticas de manufactura. Debido a la importancia de este problema en el país, se ha presentado un proyecto para retomar la fabricación del fármaco en el futuro [43]. González y Chippaux indicaron que entre 1998 y 2007 se notificaron 14720 accidentes ofídicos al Ministerio de Salud Pública [44], mientras que para 2015 y 2016 se registraron cerca de 4000 casos a nivel nacional [20]. Se estima que el 56% de envenenamientos ofídicos ocurren en la costa del país y 33% en la región oriental [45, 46].

1.1.5. Estudios del envenenamiento de *Bothrops atrox*

La distribución geográfica de la víbora amazónica *B. atrox* incluye países como Brasil, Venezuela, Bolivia, Perú y Ecuador. En Brasil, la especie está implicada en la mayor parte de casos de ofidismo registrados en la Amazonía. En el oriente peruano, la mayoría de accidentes está asociada a *B. atrox*, *B. bilineatus* y *B. brazili* [32]. En Ecuador, *B. atrox* ha sido reportada en todas las provincias orientales, con una distribución que va desde los 177 a los 1242 m.s.n.m. [45]. Debido a la importancia clínica de este reptil se han realizado varios estudios a escala regional a nivel proteómico y de las actividades de su veneno. Se han identificado importantes variaciones asociadas a la edad, sexo, dieta y ubicación de las poblaciones y de los individuos [18, 32, 47]. Incluso se ha observado que los individuos adultos tienen una mayor producción de veneno en comparación a los juveniles [48].

En el veneno de *B. atrox* las toxinas más comunes son las metaloproteinasas (SVMPs), fosfolipasas A₂ (PLA₂s) y serinproteasas (SVSPs) y la variación venómica no se refleja en la presencia o ausencia de estas familias de proteínas, sino en su abundancia en el veneno [49]. Además de estas variaciones en los perfiles proteómicos de los individuos, se han evidenciado diferencias en actividades toxicológicas como la actividad hemorrágica [50]. Los estudios del veneno de muestras de Ecuador han reportado características como la dosis letal (LD₅₀) y las principales actividades biológicas del veneno [51, 52]. También se

ha descrito la variación proteómica de una población ecuatoriana en relación a pools de Brasil, Colombia y Perú [32]. Incluso se han reportado diferencias en la eficiencia de neutralización de antivenenos manufacturados en diferentes países ante los efectos letales de una misma población de *B. atrox* del país [51]. Sin embargo, la información sobre variación bioquímica y toxicológica a nivel intraespecífico entre poblaciones e individuos de *B. atrox* provenientes de la región amazónica ecuatoriana es escasa [53, 54].

1.2. Planteamiento del problema

El envenenamiento ofídico representa un problema de salud pública en países tropicales como Ecuador [55]. En la actualidad el país carece de información estandarizada sobre la variabilidad bioquímica y toxicológica en las especies de importancia clínica, como ocurre con *B. atrox*. Esta situación de escasez de datos también ocurre con la información epidemiológica y de las características clínicas de casos de ofidismo a nivel nacional y mundial [13]. Por otra parte, en el país no se produce antiveneno lo que deriva en la necesidad de importarlo [43]. Además, los estudios de evaluación de la eficiencia del fármaco importado para neutralizar el envenenamiento de serpientes de la Amazonia ecuatoriana son limitados [20, 43]. Finalmente, se debe considerar que el esquema actual de elección de inmunógenos para la producción en Costa Rica del antiveneno utilizado en el país no incluye el veneno de *B. atrox* [18].

1.3. Justificación de la investigación

A partir de la inclusión del envenenamiento ofídico en la lista de enfermedades tropicales desatendidas [56], desde la OMS se han propuesto una serie de acciones para disminuir el impacto de esta problemática. El establecimiento de venenos de referencia es un objetivo clave dentro de esta planificación [13]. Para esto se debe considerar prioritariamente a las especies de importancia clínica, como *B. atrox* en el oriente ecuatoriano [52]. Se ha observado en otros países que esta especie posee una alta variación venómica a nivel intraespecífico, lo que ha sido asociado, entre otros factores, a su amplia distribución [18, 32, 53, 54]. La variación en la composición del veneno puede ocasionar complicaciones en el manejo clínico de los accidentes ofídicos [45]. Además, varios estudios han demostrado que *B. atrox* es un buen modelo para estudiar la variación venómica [28, 47], así como la evaluación pre clínica de antivenenos [57, 58].

Los estudios de variación individual, han evidenciado que estas diferencias pueden tener implicaciones clínicas relevantes que deben ser consideradas en la etapa de preparación de inmunógenos para la producción de los antivenenos [33, 34]. Varias investigaciones relevantes sobre *B. atrox* han estudiado la venómica y antivenómica de distintas poblaciones [18], al igual que las manifestaciones clínicas causadas por cada población [39, 54], mas no se ha considerado el impacto de la variación individual.

Otra de las acciones clave establecidas por la OMS para mitigar los efectos de ofidismo es la evaluación pre clínica de los antivenenos en laboratorio [13]. Al ser el único fármaco aprobado para tratar las consecuencias del envenenamiento, su efectividad y seguridad es un factor determinante en la situación clínica del paciente. Su evaluación involucra comprobar la neutralización de los principales efectos del envenenamiento en modelos animales [59]. Por otra parte, dado que en Ecuador no existe la manufactura de un antiveneno propio para el territorio, el medicamento importado debe ser evaluado [20]. Además, el pool de venenos empleado para manufactura del antiveneno en Costa Rica y de referencia en Ecuador no involucra muestras de *B. atrox* [18]. Esto puede originar que se requieran altas dosis de antiveneno para neutralizar los efectos tóxicos del accidente ofídico, colocando al paciente en una situación de riesgo y llevando a un aumento en el costo del tratamiento. El uso de altas dosis del fármaco ha sido asociado a la generación de reacciones adversas en pacientes [60].

La disponibilidad de información epidemiológica de ofidismo es otro punto crucial para la OMS [13]. Este tipo de datos facilita la caracterización de signos y síntomas en pacientes ocasionados por una especie o género específico [17], incluyendo las complicaciones asociadas al accidente [61], siendo un paso clave para la generación de tratamientos. Además, posibilita el registro del desempeño de estos tratamientos, como en el caso del antiveneno, donde permite conocer su efectividad y frecuencia de reacciones adversas [40]. El análisis de esta información, junto con lo evidenciado en datos de investigación a nivel bioquímico y molecular, es vital para la generación de estrategias de control de la enfermedad [13].

1.4. Objetivos de la investigación

Caracterizar los perfiles bioquímicos y enzimáticos del veneno, así como la toxicología e implicaciones clínicas del envenenamiento de individuos de *Bothrops atrox* de diferentes áreas de la Amazonía ecuatoriana.

1.4.1. Objetivos específicos

- Determinar la composición bioquímica de los venenos de *Bothrops atrox*.
- Evaluar las actividades enzimáticas de los venenos de *Bothrops atrox*.
- Evaluar las actividades toxicológicas de los venenos de *Bothrops atrox*.
- Evaluar la eficacia de neutralización del antiveneno de referencia en los principales efectos del veneno de *Bothrops atrox*.
- Analizar los datos epidemiológicos de los accidentes ofídicos reportados en el hospital José María Velasco Ibarra.
- Caracterizar las manifestaciones clínicas de envenenamientos con *Bothrops atrox* con base en datos hospitalarios de la zona de Tena.

CAPÍTULO II: MARCO METODOLÓGICO

2.1. Venenos

Las muestras de veneno de *B. atrox* fueron obtenidas de serpientes adultas de tres diferentes localidades de la Amazonía ecuatoriana (Figura 1). Se colectaron muestras de veneno de cuatro individuos de Mera (Pastaza), un individuo de Puerto Misahuallí (Napo) y un individuo del Parque Nacional Yasuní (Orellana) bajo los permisos de investigación MAE-DNB-CM-2015-0017 y MAE-DNB-CM-2019-0115. La clasificación del estadio de vida de los individuos se basó en lo reportado por Guércio et al. [28]. Para obtener las muestras se siguió la metodología descrita por Salazar-Valenzuela [62] que consistió en asegurar a los reptiles utilizando un grupo de tubos telescópicos transparentes. Posterior a esto, se les indujo a morder la zona superior de un vaso de precipitación de vidrio cubierto con Parafilm®. La secreción colectada se pipeteó en un tubo de 1,5 ml y se deshidrató en un recipiente al vacío con calcio anhidro. Las seis muestras de veneno fueron almacenadas a $-35\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su uso.

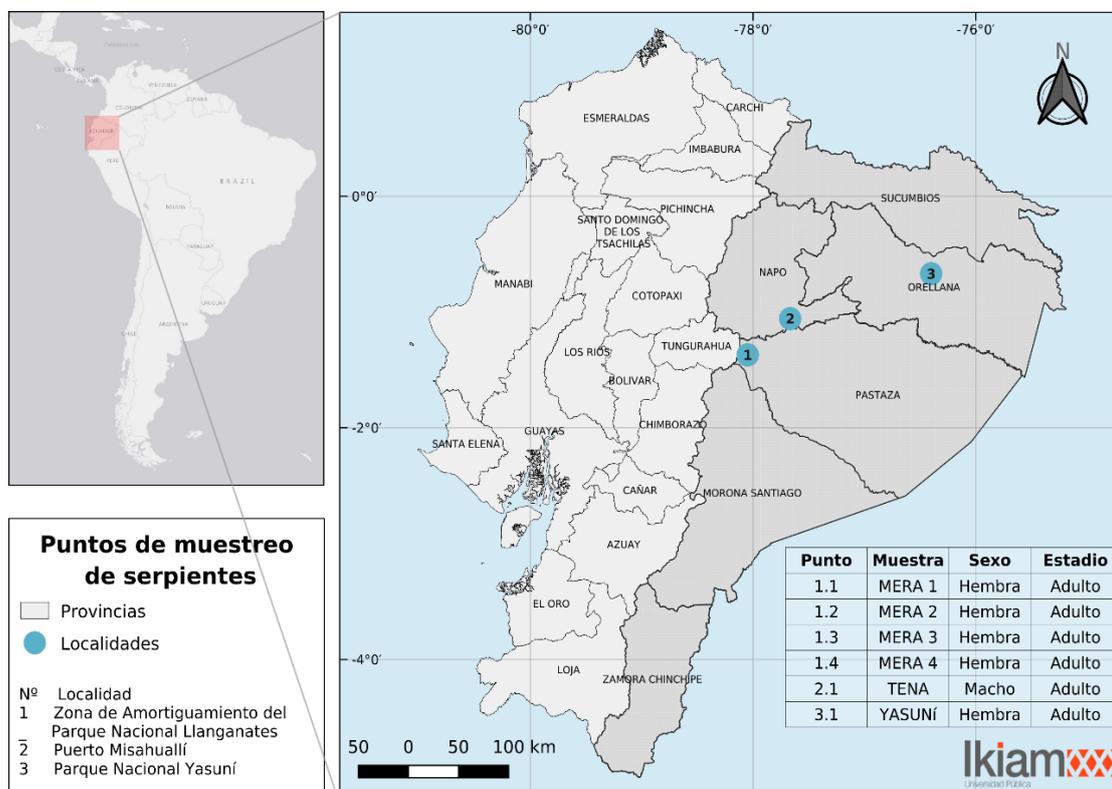


Figura 1. Sitios de muestreo de individuos de *B. atrox* para recolección de muestras de veneno. Se reportan los puntos geográficos en donde fueron hallados los individuos de los cuales se extrajeron las muestras de veneno a analizar en el estudio. El sexo y estadio de los individuos se encuentra detallado para cada uno de los venenos.

2.2. Perfil bioquímico

2.2.1. Fraccionamiento de los venenos

Para el fraccionamiento de proteínas de veneno, 0,5 mg de veneno desecado fue disuelto en 60 μ l de ácido trifluoroacético al 0,1% y 40 μ l de bicarbonato de amonio 1 M y homogenizado durante 2 minutos usando un vórtex. A continuación, se centrifugó la muestra durante 3 minutos a 8000 rpm y temperatura ambiente. Se colectaron 100 μ l de muestra para ser inyectada en el cromatógrafo. Para la separación, se utilizó una columna C18 (250 \times 4,6 mm, tamaño de partícula de 5 μ m) para cromatografía de alta eficiencia en fase reversa (RP-HPLC) eluyendo a 1 ml/min con un gradiente lineal de ácido trifluoroacético al 0,1% (solución A) y acetonitrilo y TFA 0.1% en una relación 66:34 (solución B). La separación se llevó a cabo por HPLC (PREP 150 LC, Waters) equipado con el detector 2489 UV/Vis, bombas e inyector 2545 y colector de fracciones III y fue monitoreada a 214 nm. Las fracciones fueron colectadas manualmente y liofilizadas (Benchtop Pro 9L, Omnitronics).

2.2.2. Electroforesis

La separación por electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE) se realizó acorde a la metodología de Laemmli [63], disolviendo 100 μ g de veneno desecado en 100 μ l de buffer de carga (0.075 M Tris-HCl, pH 6,8; 10% (v:v) glicerol, 4% (m:v) SDS, 0,001% (m:v) de azul de bromofenol). Las muestras fueron separadas en condiciones reductoras, utilizando un gel de apilamiento con concentración del 5% (bis-acrilamida (30:0,8) 5%; 0,06 M Tris-HCl, pH 6,8; 0,1 % (m:v) SDS; 0,15% (m:v) persulfato de amonio; 0,02 (v:v) TEMED) y el gel de corrida con concentración del 12,5% (bis-acrilamida (30:0,8) 12%; 0,5 M Tris-HCl, pH 8,8; 4 % (m:v) SDS; 0,05% (m:v) persulfato de amonio; 0,35% (v:v) TEMED). La electroforesis se realizó en una cámara vertical (P10DS-2, Thermo Scientific™) en condiciones reductoras (en presencia de DTT 1 M) a 120 V y temperatura de -4 °C en buffer de corrida 10x (0,025 M Tris-HCl, pH 8,3; 0,18 M glicina, 1% (m:v) SDS). Para la identificación de la masa molecular de las proteínas del veneno se emplearon marcadores moleculares (Rainbow™ Molecular Weight Markers, GE Healthcare). Para visualizar las bandas, el gel fue teñido con coloración de plata de acuerdo a lo descrito por Almeida et

al. [64]. Las fracciones obtenidas por RP-HPLC de cada una de las muestras fueron sometidas a la misma metodología, con el fin de identificar la familia de toxinas presentes en los principales picos de los cromatogramas generados. Las imágenes de los geles fueron digitalizadas para su posterior análisis.

2.3. Caracterización de la actividad enzimática

Los ensayos enzimáticos fueron realizados utilizando sustratos cromogénicos específicos para medir la actividad caseinolítica, serinproteasa y fosfolipasa A₂. La actividad fue monitoreada en la longitud de onda específica para la detección de la actividad sobre cada sustrato mediante el lector de microplacas (Glomax Discover System, Promega). Los resultados fueron expresados en porcentaje como la media \pm la desviación estándar, considerando al veneno con mayor actividad como la muestra con 100% de actividad. Se realizaron tres repeticiones por muestra en tres experimentos independientes.

2.3.1. Actividad proteolítica

La actividad proteolítica de los venenos de *B. atrox* fue evaluada utilizando azocaseína como sustrato cromogénico de acuerdo con la metodología de Lomonte y Gutierrez [65]. Para preparar la solución de sustrato, se diluyeron 5 mg de azocaseína (Sigma-Aldrich) en un 1 ml de buffer A (50 mM Tris-HCl, pH 8,0). Las muestras de veneno de los individuos fueron disueltas individualmente en el buffer 50 mM Tris-HCl, con una concentración de 1 mg/ml. Se inició la determinación de la actividad colocando 10 μ l de veneno con 90 μ l de solución de sustrato en tubos de 1,5 ml y se incubaron durante 90 minutos a 37 °C. Luego, se agregaron 200 μ l de ácido trifluoroacético al 5% a cada muestra y fueron centrifugadas durante 5 min a 8000 rpm. Se tomó el sobrenadante (150 μ l) de cada tubo y se lo colocó en una microplaca de 96 pocillos, donde se mezcló con 150 μ l de NaOH 0,5 M. La absorbancia fue medida a 440 nm en el lector de placas. Se utilizó un blanco con 10 μ l de buffer A en 90 μ l de sustrato siguiendo el mismo protocolo para corregir las absorbancias.

2.3.2. Actividad fosfolipasa A₂

La actividad fosfolipasa A₂ de las muestras de veneno se analizó empleando ácido 4-nitro-3 [octanoiloxi] benzoico (NOBA) como sustrato cromogénico de acuerdo a lo descrito por Holzer y Mackessy [66], con modificaciones de Resende et al. [67]. La solución de sustrato se preparó disolviendo 3,1 mg de NOBA en 1 ml de acetonitrilo y 10 ml de buffer B (10 mM Tris -HCl, 1 M CaCl₂, 10 mM NaCl, pH 7,8). Las muestras de veneno desecadas se disolvieron en buffer A de forma individual en una concentración de 1 mg/ml. A continuación, se mezclaron 220 µl de sustrato, 20 µl de veneno y 20 µl de agua destilada en una microplaca de 96 pocillos. Luego de 20 min de incubación a 37 °C se realizó la lectura de las absorbancias a 410 nm. Se utilizó como blanco 40 µl de agua destilada con 200 µl de solución de sustrato para realizar las correcciones de las absorbancias.

2.3.3. Actividad serinproteasa

La actividad serinproteasa se determinó empleando el sustrato sintético cromogénico benzoil-arginil-p-nitroanilida (L-BapNa) (Sigma-Aldrich) como se ha descrito previamente [68, 69]. La solución de sustrato se preparó disolviendo 2,18 mg de BapNa en 50 µl de dimetil sulfóxido y 5 ml en buffer B. Las muestras de veneno se disolvieron individualmente en buffer A en una concentración de 1 mg/ml. La medición de la reacción de hidrólisis se realizó mezclando 20 µl de veneno con 200 µl de sustrato y 50 µl de buffer A en una microplaca de 96 pocillos. La reacción fue monitoreada a 410 nm a 37 °C luego de 30 minutos de incubación. Un blanco con 70 µl de buffer B y 200 µl de solución de sustrato fue empleado para realizar las correcciones de las absorbancias.

2.4. Caracterización de las actividades toxicológicas

La actividad hemorrágica, inflamatoria, miotoxicidad, de letalidad y su neutralización fueron evaluadas empleando ratones CD-1 machos con un peso de entre 18 a 20 g, adquiridos en el Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública (INSPI). Para los ensayos de neutralización se utilizó el antiveneno polivalente liofilizado manufacturado por el Instituto Clodomiro Picado (LOTE: 5991117POLF, EXP: 11/2022), que fue donado por el hospital José María Velasco Ibarra de Tena. Los ensayos se realizaron de acuerdo a los protocolos de la Guía para el Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio [70], previa

autorización de la Coordinación de Investigación de la Universidad Ikiam. Los animales fueron mantenidos a una temperatura promedio de 23 °C, con alimento y agua *ad libitum*. Las dosis de veneno aplicadas en los diferentes ensayos fueron seleccionadas a partir del estudio de Laines et al. [39]. Los resultados de los ensayos de hemorragia, inflamación y miotoxicidad son expresados como la media \pm la desviación estándar.

2.4.1. Evaluación de la actividad hemorrágica

La evaluación de esta actividad se realizó de acuerdo a lo descrito por Kondo et al. [71] con modificaciones. Se emplearon grupos de 5 ratones CD-1 (18-20 g) que recibieron una inyección en la zona dorsal de 10 μ g de veneno disuelto en 50 μ l de PBS. Luego de 3 horas los ratones fueron sometidos a eutanasia para proceder con la remoción de la piel dorsal con el fin de observar el área de la hemorragia. Como resultado, el área (mm^2) se registró con fotografías que posteriormente fueron digitalizadas para su análisis con ImageJ. Como control se emplearon 3 ratones que recibieron una inyección de PBS en lugar de veneno.

2.4.2. Evaluación de la actividad inflamatoria

Se emplearon grupos de 5 ratones (18-20 g) para la evaluación de formación de edema siguiendo lo reportado por Lomonte et al. [72]. Los ratones fueron inyectados en la almohadilla de la pata izquierda trasera con 50 μ g de veneno disuelto en 50 μ l de PBS y en la pata trasera derecha con 50 μ l de PBS. El incremento de las dimensiones de la pata causado por la inflamación fue medido con un calibre digital (Truper) 1 h después de la inyección. La actividad inflamatoria fue cuantificada a partir de la diferencia entre las medidas de ambas patas inyectadas y expresada en porcentaje.

2.4.3. Evaluación de la actividad miotóxica

La actividad miotóxica fue evaluada siguiendo la metodología de Almeida et al. [52]. Se utilizaron grupos de 5 ratones, que fueron inyectados con 50 μ g de veneno disuelto en 50 μ l de PBS en el músculo gastrocnemio. El grupo control recibió una inyección en la misma zona de 50 μ l de PBS. Después de 3 h se colectaron muestras de sangre de la cola de los ratones en capilares con heparina que fueron centrifugados a 5000 rpm durante 3

minutos. Posteriormente se procedió a tomar el plasma sanguíneo para medir la actividad creatina quinasa. Esta enzima fue empleada como biomarcador de daño muscular, al medir su actividad en las muestras de plasma utilizando un kit de ensayo colorimétrico (CK-NAC, Wiener Lab). La actividad fue monitoreada a 320 nm en el lector de microplacas y definida como U/L (unidades internacionales por litro).

2.4.4. Evaluación de la actividad letal

Para los ensayos de letalidad se tomó como referencia la LD₅₀ reportada por Laines et al. [39] y lo estandarizado en el trabajo de Moretto Del-Rei [54] para *B. atrox* de Ecuador y Brasil, respectivamente. Para la inyección, se disolvieron 200 µg de veneno en 200 µl de PBS, que se administraron en la zona intraperitoneal de 6 ratones por muestra. A partir de la inyección, se monitoreó cada hora durante las primeras 6 h. Posteriormente se registraron los tiempos de muerte por intervalos a las 12, 24 y 48 h que fueron representados en una gráfica de curva de supervivencia. Se realizó un segundo ensayo de actividad letal con los ratones que superaron el primer desafío, siguiendo la misma metodología.

2.5. Ensayos de neutralización

Para la evaluación de la neutralización, las muestras de veneno se incubaron durante 30 minutos en una solución 1:1 (m:v) de antiveneno e inyectaron en las zonas descritas para la evaluación de actividad hemorrágica, inflamatoria y letal. Se emplearon grupos de 5 ratones para la neutralización de hemorragia y edema y grupos de 6 ratones para neutralización de actividad letal. Para la neutralización de la actividad hemorrágica, inflamatoria y letal, se utilizaron 10 µg, 50 µg y 200 µg de veneno por ratón respectivamente, con una proporción de 1 µL de antiveneno por µg de veneno. Los resultados de neutralización de hemorragia y edema se expresaron como porcentaje en relación a los ensayos donde se inyectó a los ratones con únicamente con veneno. Los datos de neutralización de letalidad se representaron como porcentaje considerando el número de animales muertos en el ensayo de letalidad. En el caso de no neutralización de las actividades tóxicas en la proporción inicial, los experimentos fueron repetidos con una cantidad más elevada de antiveneno. Adicionalmente se realizó un ensayo de

neutralización de letalidad sin incubación previa [73]. Se inyectaron 500 µL de antiveneno luego de 30 min de inyectar 200 µL de veneno.

2.6. Análisis de datos epidemiológicos, caracterización de signos y síntomas en accidentes ofídicos con *B. atrox* y tratamiento

Para la caracterización del envenenamiento con *B. atrox* y análisis de datos epidemiológicos se revisaron los historiales clínicos de los pacientes reportados en el hospital José María Velasco Ibarra de la ciudad del Tena de acuerdo a lo descrito por Otero et al. [61] y Sevilla–Sánchez [74]. Se consideraron los casos de ofidismo atendidos en la casa de salud en el período de 2015-2019. Los datos recopilados incluyeron la edad, sitio de mordedura, el tiempo entre el accidente y la seroterapia, signos y síntomas al ingreso, resultados de los exámenes sanguíneos y la dosis de antiveneno administrada. Para la identificación de la especie de serpiente involucrada en los accidentes se empleó la descripción proporcionada en los reportes, incluyendo nombres comunes y verificando si la especie ha sido reportada en la provincia de Napo. Los datos con información insuficiente o ambigua fueron clasificados como no especificados. También se tomaron en cuenta las complicaciones durante el tratamiento, incluyendo las ocasionadas por la administración del antiveneno. Para el análisis de datos se utilizaron medidas de frecuencia y porcentajes con el programa Excel®. Sobre la confidencialidad de los datos, se firmó un acuerdo previo al estudio con la institución de salud para garantizar el manejo adecuado de la información.

2.7. Análisis estadístico

Para el tratamiento de resultados se empleó el análisis de varianza (ANOVA) One-Way seguido del test Tukey (para comparaciones múltiples) y el nivel de significancia se estableció con $p \leq 0.05$, de acuerdo a lo seguido por Sousa et al. [53] para verificar si existieron diferencias significativas al comparar los resultados de las seis muestras. Para los análisis se empleó el programa OriginLab, mismo que fue utilizado para generar las gráficas.

CAPÍTULO III: PRESENTACIÓN DE DATOS Y RESULTADOS

3.1. Perfil bioquímico de los venenos de individuos de *B. atrox*

La caracterización del perfil bioquímico de los venenos de individuos de *B. atrox* por electroforesis unidimensional reveló diferencias relevantes entre algunas muestras analizadas. Esto puede observarse en el gel de electroforesis de los venenos totales (Figura 2), que fue realizado para obtener una visión general de la composición de proteínas en los venenos. La variación individual es evidente en las diferencias de las intensidades y presencia de bandas en el gel. Es clara la ausencia de bandas significativas en el rango de metaloproteínas tipo III (PIII-SVMPs) y L- amino oxidasas (LAOs) (40 a 60 kDa) en las muestras de Yasuní y Tena. Con respecto a los rangos de las otras familias de toxinas, se observan las principales bandas que son características de los venenos bothrópicos para todas las muestras. Estas familias son: serinproteasas (SVSPs) (35 kDa), metaloproteinasas tipo I (PI-SVMPs) (20-30 kDa) y fosfolipasas A₂ (PLA₂s) (13-17 kDa).

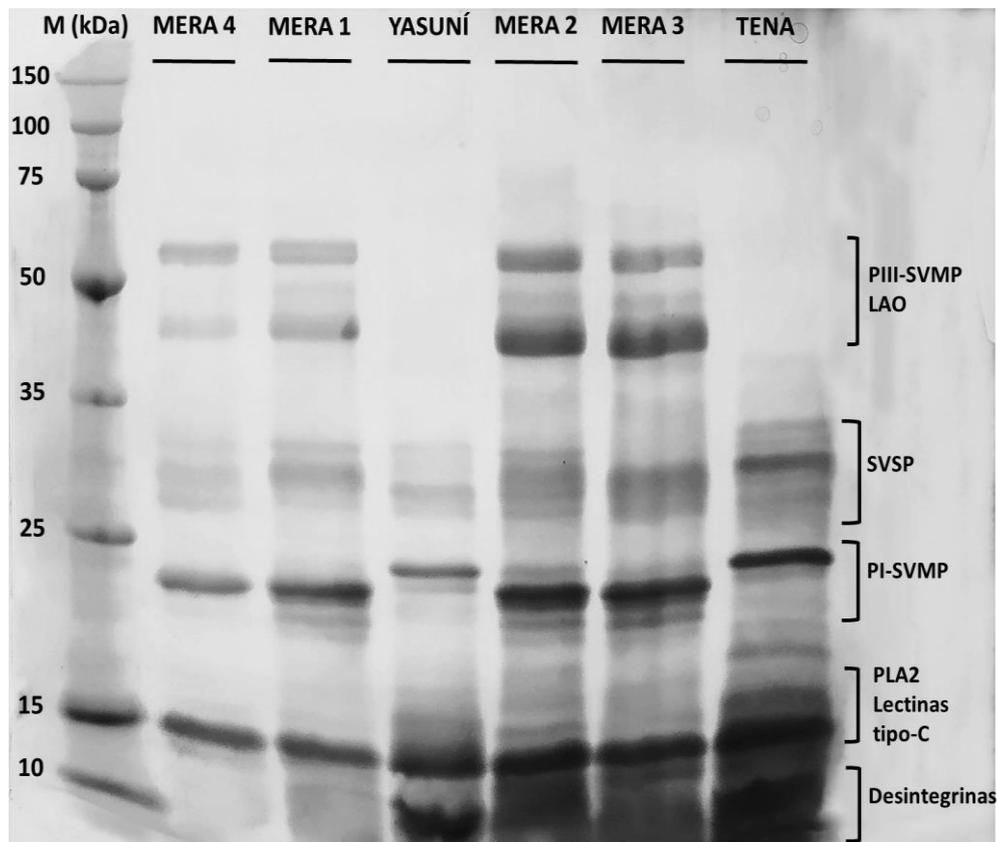


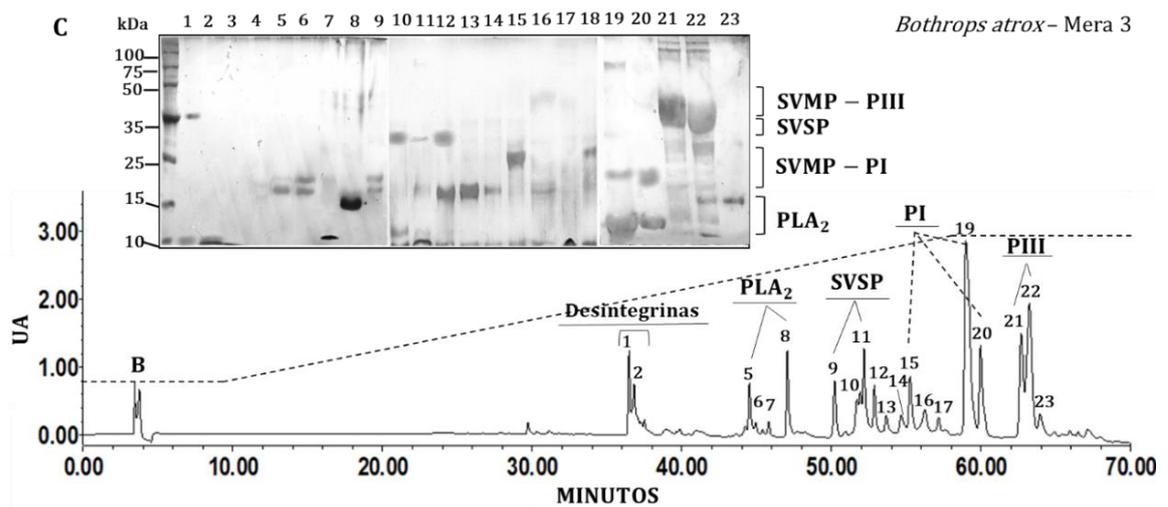
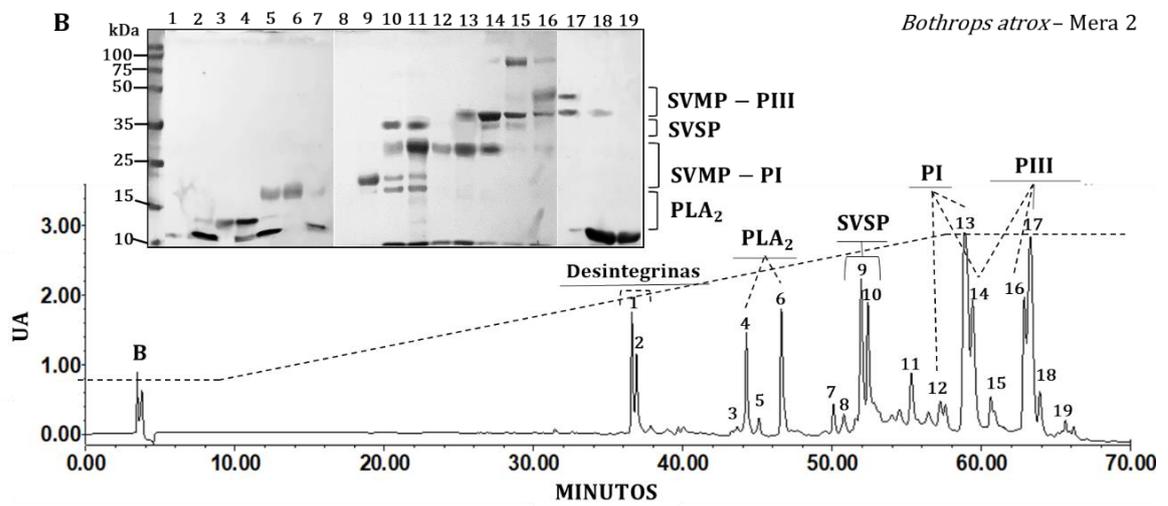
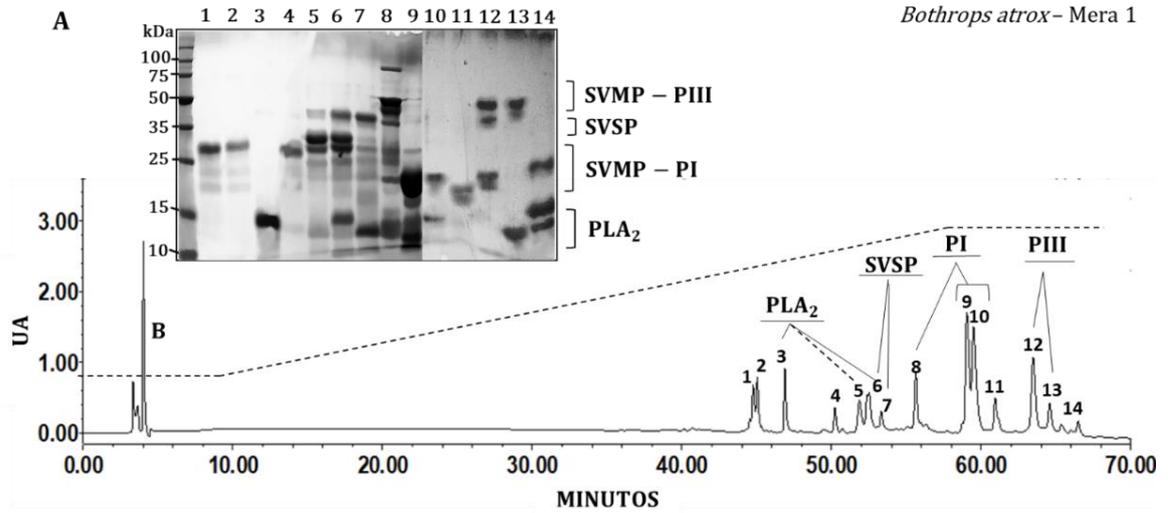
Figura 2. Gel de electroforesis en poliacrilamida (SDS-PAGE) de los venenos totales de individuos de *B. atrox*. Al lado derecho se muestran los marcadores moleculares. Al lado izquierdo se muestran rangos asociados a las familias de proteínas más abundantes en el veneno bothrópico.

En el caso de las muestras colectadas de individuos de Mera, se observan diferencias en las intensidades de las bandas al comparar las cuatro muestras. Sin embargo, es evidente que las cuatro muestras de Mera poseen perfiles semejantes, señalando que poseen un arsenal bioquímico común.

Similar información se pudo evidenciar a partir del fraccionamiento de los venenos mediante RP-HPLC. En los perfiles cromatográficos (Figura 3A-F) se muestran los picos asociados a las familias de toxinas más abundantes en el veneno de *Bothrops*. La identificación de estos picos se fundamentó principalmente en tres criterios: I) el tiempo de retención de cada familia, relacionado con su peso molecular, su hidrofobicidad y área bajo la curva; II) la presencia de bandas asociadas a su masa en el carril del gel correspondiente a la fracción analizada; y III) trabajos proteómicos desarrollados con venenos bothrópicos. La integración de la información de los perfiles cromatográficos y electroforéticos permitió identificar la presencia de desintegrinas, PLA₂s, SVMPs-PI y PIII y SVSPs, siendo notable la variación de abundancia entre algunas muestras.

Al igual que en el gel de venenos totales (Figura 2), las muestras colectadas de individuos de Mera muestran un perfil similar, con variaciones en las absorbancias de algunos de los picos. En el caso de Mera 1 se observa la ausencia de picos asociados a desintegrinas, proteínas presentes en los perfiles de los demás venenos. Los cromatogramas de Mera 2 y Mera 3 (Figura 3B y C) son los que muestran una mayor variedad de picos con altas absorbancias. De acuerdo a los cromatogramas, en las cuatro muestras, las SVMPs-PIII y PI son las proteínas más abundantes en los venenos. En el caso de Yasuní y Mera, las toxinas de mayor abundancia son las SVMPs-PI.

De manera similar a lo observado en el gel de electroforesis, la diferencia más notable es la baja concentración de SVMPs-PIII en las muestras de Tena y Yasuní (Figura 3E y F). Esto se puede identificar debido a la ausencia o débil presencia de picos asociados a estas toxinas en los cromatogramas de ambas muestras. Además, los datos de abundancia relativa indican que las SVMPs-PIII representan el ≈5% con respecto al total de su composición. En síntesis, los resultados indican que las metaloproteinasas son los componentes más abundantes de los venenos analizados, ya sean estas del tipo PI o PIII.



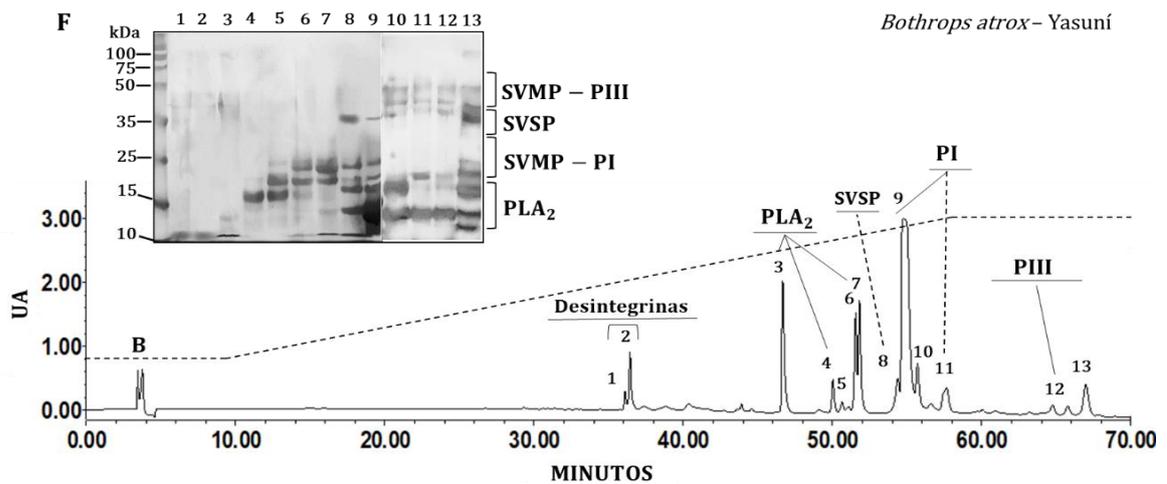
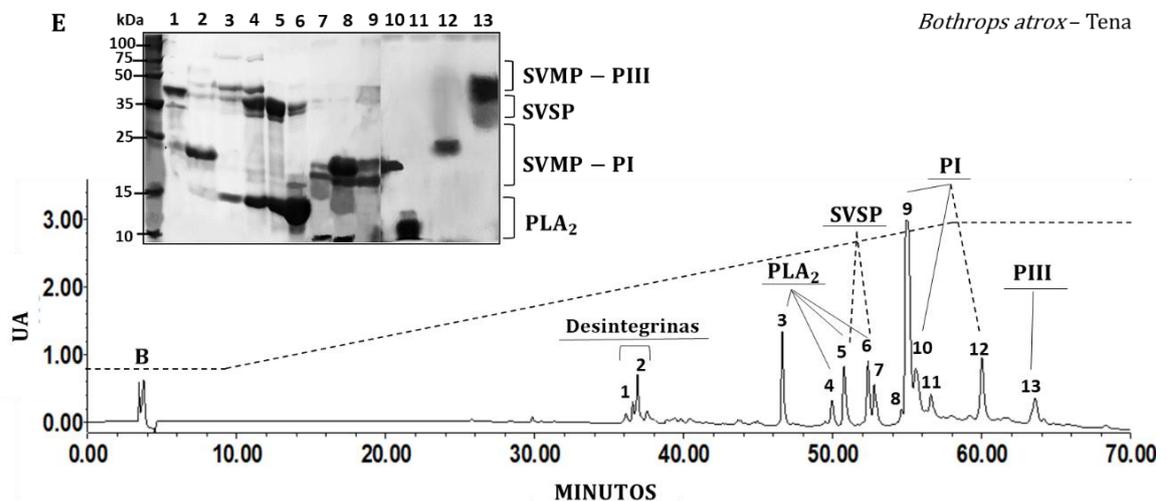
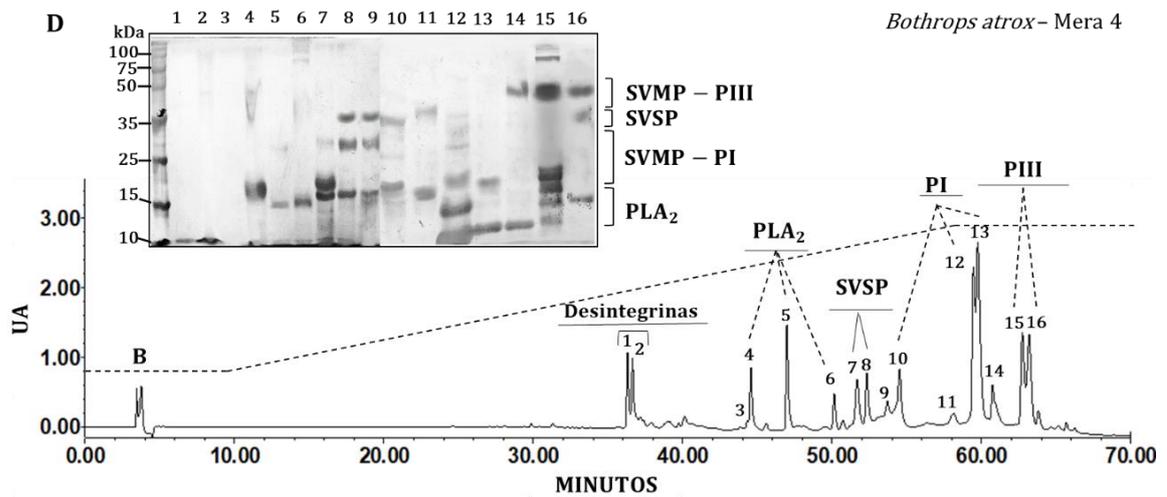


Figura 3. Perfil cromatográfico de los venenos de individuos de *B. atrox*. La procedencia se indica en la esquina superior derecha. La corrida fue monitoreada a 214 nm. Los geles de electroforesis en condiciones reductoras muestran las proteínas contenidas dentro de cada fracción numerada. Los marcadores moleculares (kDa) son mostrados al lado izquierdo de los geles. Se muestra el gradiente de solvente utilizado en el fraccionamiento con la línea discontinua.

3.2. Caracterización de la actividad enzimática de los venenos de individuos de *B. atrox*

Los resultados de los ensayos enzimáticos evidencian diferencias en las actividades evaluadas al realizar una comparación entre los venenos (Figura 4).

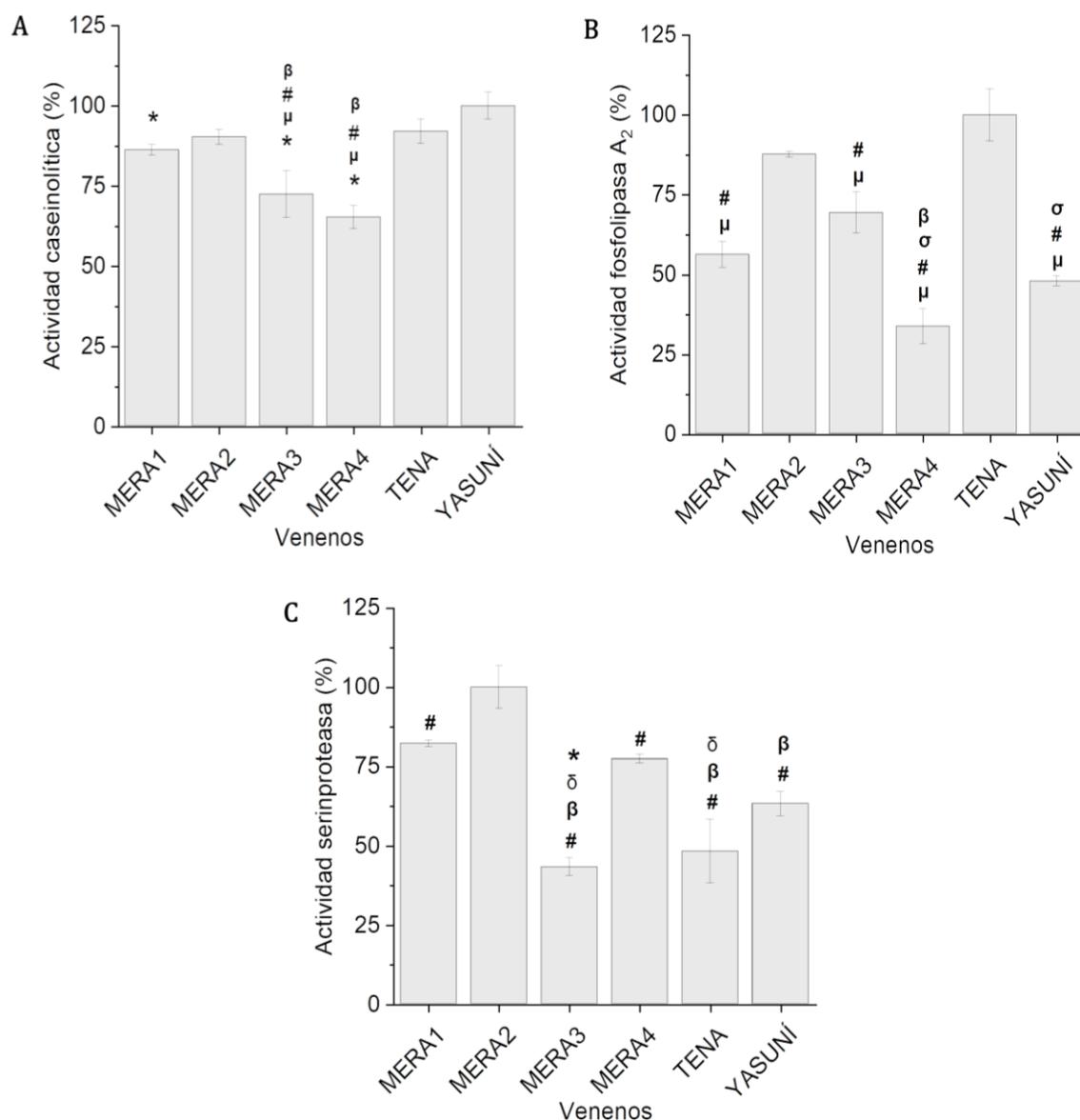


Figura 4. Caracterización enzimática de los venenos de individuos de *B. atrox*. La actividad caseinolítica (A), fosfolipasa (B) y serinproteasa (C) se evaluaron mediante métodos colorimétricos. Las diferencias estadísticas se determinaron con un $p < 0,05$ por el test de Tukey como significativas al comparar la actividad entre muestras que son indicadas para cada actividad. Las diferencias estadísticas significativas para todos los ensayos se señalan como: β (diferencia con Mera 1), # (diferencia con Mera 2), σ (diferencia con Mera 3), δ (diferencia con Mera 4), μ (diferencia con Tena), * (diferencia con Yasuni).

Existen diferencias estadísticamente significativas en los tres ensayos incluso al comparar las cuatro muestras colectadas en Mera, lo que demuestra la presencia de variaciones individuales importantes en las actividades enzimáticas dentro de la misma población. En el ensayo caseinolítico (Figura 4A), que evalúa la actividad proteolítica de las toxinas, se identificó que la muestra Yasuní posee la mayor acción, seguido de la muestra de Tena. Por otro lado, dos de las muestras de Mera (3 y 4) mostraron tener la menor actividad. La actividad PLA₂ (Figura 4B), evaluada con el sustrato NOBA, revela que el veneno de Tena junto con Mera 2 mostraron el mejor desempeño al escindir el sustrato sintético, al contrario de las muestras Mera 4 y Yasuní, que evidenciaron el resultado más bajo. Por último, los resultados del ensayo serinproteasa indican que dos de las muestras de Mera (1 y 2), son las que ejercieron mayor efecto sobre el sustrato sintético BapNa.

3.3. Caracterización toxicológica de los venenos de individuos de *B. atrox*

La evaluación de las actividades toxicológicas en modelos animales demostró que existen variaciones en las manifestaciones del envenenamiento en los venenos colectados en diferentes localidades (Figura 5). Se inició evaluando el efecto hemorrágico de las muestras, cuyos resultados revelaron que el veneno de Yasuní causó áreas de hemorragia mayores a lo generado por las otras muestras (Figura 5A). Los venenos de Mera mostraron en general similar capacidad hemorrágica, sin identificar diferencias estadísticas entre sus actividades. La muestra de Tena fue aquella que tuvo un menor efecto de hemorragia en la zona dorsal de los ratones de manera significativa. La formación de edema también fue evaluada (Figura 5B). En este ensayo no se identificaron diferencias significativas entre las muestras analizadas, por lo que se infiere que poseen una capacidad similar para ejercer provocar inflamación, a diferencia de la actividad miotóxica. Esta acción del veneno, que es medida por el nivel de actividad creatina kinasa (CK) en el suero de ratones, es variable entre las muestras estudiadas (Figura 5C). El veneno de Tena fue el que mostró un mayor daño muscular local, mientras que el veneno de Yasuní fue el que tuvo una acción menor. Al igual que en la inducción de hemorragia, las muestras de Mera tuvieron efectos sobre el músculo gastrocnemio de similar magnitud, sin diferencias estadísticas.

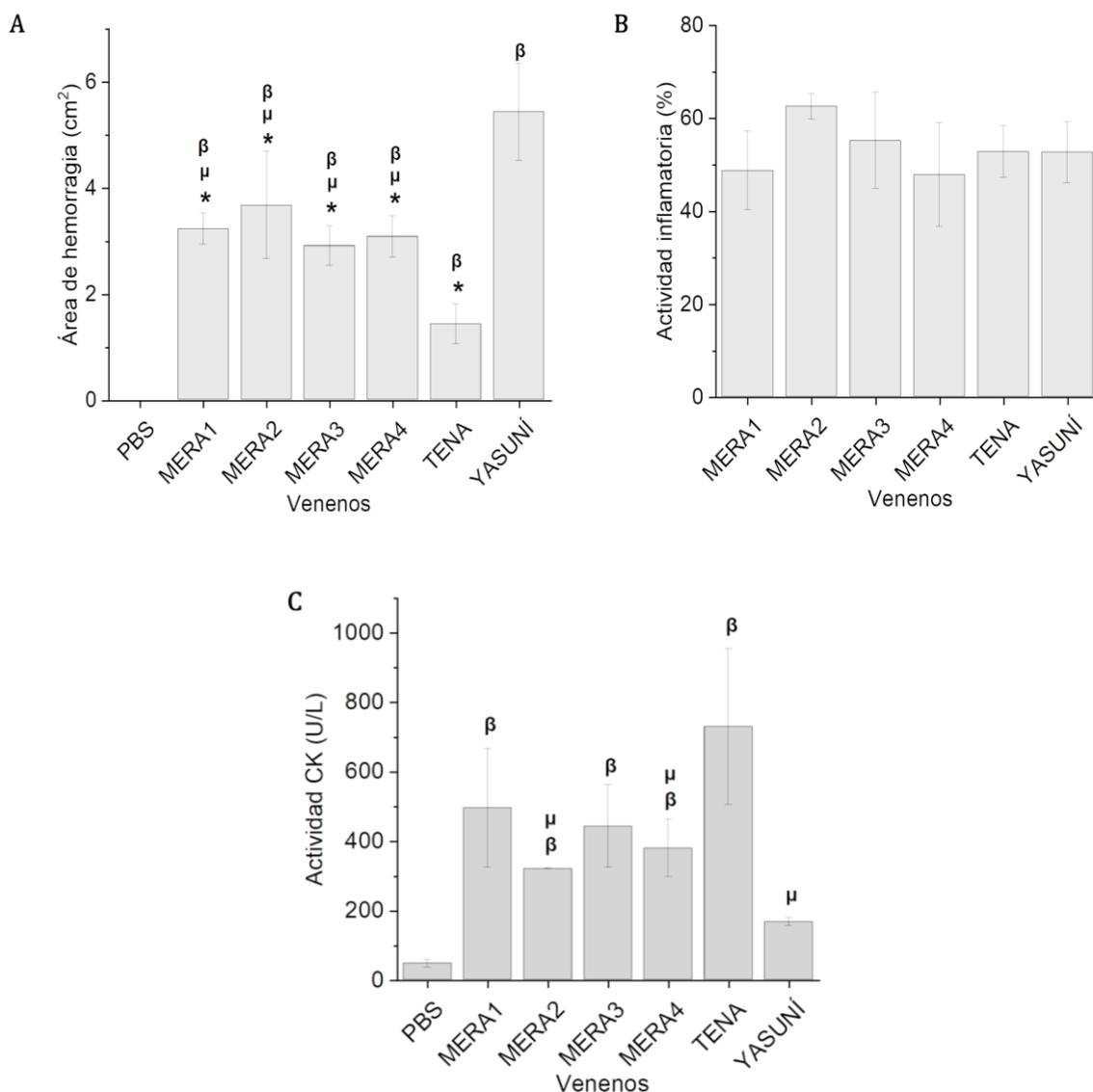


Figura 5. Caracterización toxicológica de los venenos de individuos de *B. atrox*. La actividad hemorrágica (A), inflamatoria (B) y miotóxica (C) se evaluaron en biomodelos CD-1 (18-20 g). Las diferencias estadísticas se determinaron con un $p < 0.05$ como significativas al comparar la actividad entre muestras que son indicadas para cada actividad mediante el test de Tukey. Las diferencias estadísticas significativas para todos los ensayos se señalan como: β (diferencia PBS), μ (diferencia con Tena), * (diferencia con Yasuní).

3.4. Actividad letal de los venenos de individuos de *B. atrox*

Los resultados del primer desafío de supervivencia (Figura 6A), demostraron que la muestra de Yasuní fue la más letal. Al final de las 48 h, aproximadamente el 16% de ratones inyectados en la zona intraperitoneal con veneno seguía con vida. De manera similar a otros ensayos, las muestras de Mera tuvieron una letalidad cercana, puesto que aproximadamente el 70% de los ratones desafiados con estos venenos sobrevivió en el período de 48 h. Para la muestra de Tena, la letalidad fue nula en el primer desafío, con un 100% de supervivencia, resultado igual a lo observado en ratones inyectados con PBS. Se

llevó a cabo un segundo desafío (Figura 6B), en el cual, se inyectó la misma dosis que en el primer ensayo de letalidad (200 µg de veneno/200 µl de PBS) en los ratones que superaron el primer desafío, registrando la tasa de supervivencia en 48 h nuevamente.

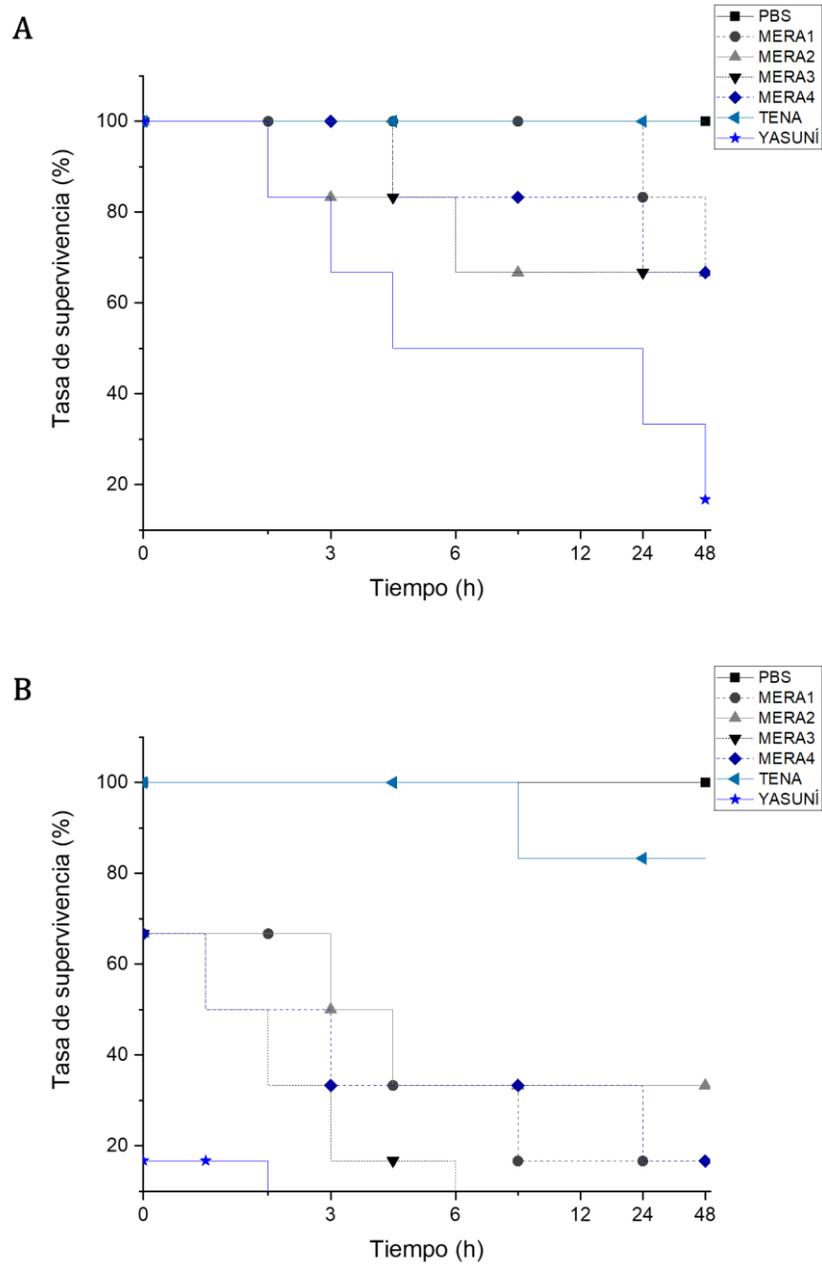


Figura 6. Caracterización de la letalidad de los venenos de individuos de *B. atrox*. Se representa (A) el % de supervivencia de los ratones en el primer desafío (primeras 48 h) y los resultados del segundo desafío de letalidad (B) en un período de 48 h, en donde los ratones fueron inyectados con la misma dosis.

En el rango de las primeras 3 h, todos los biomodelos inyectados con la muestra de Yasuní murieron. El veneno 3 de Mera ejerció el mismo efecto a las 6 horas del ensayo. En las muestras restantes de Mera, se registraron tasas de supervivencia de 16% (Mera 1, Mera 4) y del 30% (Mera 2). Para el veneno de Tena, la tasa de supervivencia fue del 83%, confirmando la baja letalidad del mismo observada en el primer ensayo.

3.5. Neutralización de los efectos toxicológicos de los venenos de individuos de *B. atrox*

Después de realizar la caracterización de los venenos bothrópicos ecuatorianos de la Amazonía ecuatoriana, se continuó con la evaluación de la neutralización del antiveneno polivalente ICP (Polival-ICP). Este es empleado para contrarrestar los efectos del envenenamiento de especies de *Bothrops*, *Crotalus* y *Lachesis*, siendo el fármaco de referencia en Ecuador para tratar las manifestaciones clínicas de accidentes ofídicos. El antiveneno evaluado demostró una alta eficiencia para neutralizar las actividades hemorrágicas de los venenos, siendo de 100% para 4 de las 6 muestras (Tabla 1). Para Mera 2 y Mera 4, la inducción de hemorragia se redujo en un 88% (Figura 7B). Sin embargo, se observó una reducción total de la hemorragia cuando estos venenos fueron incubados en una proporción 1:2 veneno/antiveneno (Figura 7C).

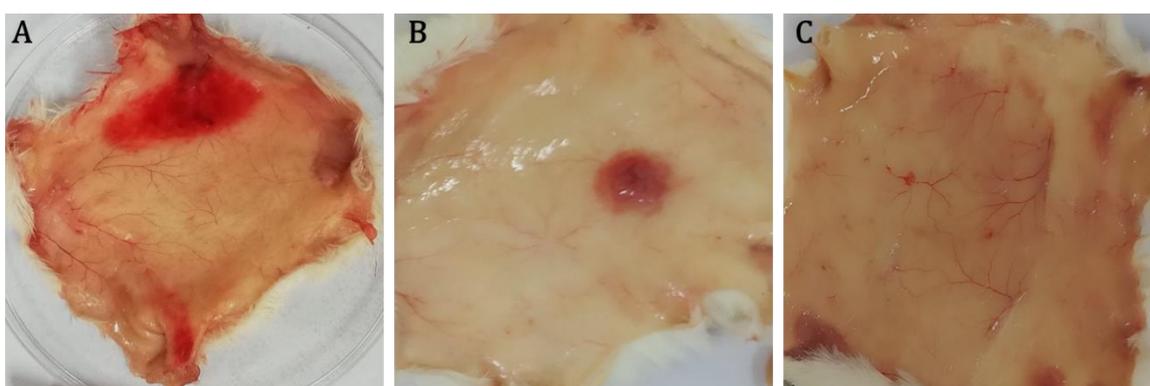


Figura 7. Efecto hemorrágico del veneno de *B. atrox* y su neutralización. Se muestran los resultados del veneno Mera 4 indicando en (A) área de hemorragia producida por el veneno en la caracterización de actividad toxicológica (B) neutralización de hemorragia en una relación 1:1 veneno/antiveneno y (C) neutralización de efecto hemorrágico con una proporción 1:2 veneno/antiveneno.

Con respecto a la formación de edema o actividad inflamatoria, el antiveneno tuvo una baja eficiencia para contrarrestar este efecto en todos los venenos, teniendo un máximo de eficacia del 28%. En el caso de la letalidad, el medicamento permitió que el

100% de los biomodelos superen este efecto del envenenamiento, excepto para la muestra Mera 4. Para este veneno se mantuvo la misma tasa de supervivencia que fue registrada al inyectar únicamente veneno, observando que el antiveneno no fue efectivo en esa dosis (relación 1:1) ante la letalidad de Mera 4. El experimento fue repetido para este veneno con una proporción de 1:2,5 veneno/antiveneno y los resultados evidenciaron que, en concentraciones más elevadas del fármaco, la letalidad es inhibida por completo. El segundo ensayo de neutralización de letalidad fue llevado a cabo mimetizando un accidente ofídico. En este experimento, se inyectó el antiofídico luego de 30 minutos de la inyección de veneno, utilizando 2,5 ml del antiveneno fármaco por cada mg de veneno. Como resultado se observó la supervivencia de todos los biomodelos empleados para el segundo experimento, confirmando la necesidad de alta concentraciones de antiofídico para tener una efectividad del 100% para todas las muestras de veneno.

Tabla 1. Neutralización de los venenos de *B. atrox* con el antiveneno ICP, empleado en Ecuador. Los resultados se muestran cómo % de neutralización, tomando como base a lo reportado en los ensayos toxicológicos.

| Muestra | Neutralización de hemorragia (%) | Neutralización de inflamación (%) | Neutralización de letalidad a 48 h (%) |
|---------|----------------------------------|-----------------------------------|--|
| MERA 1 | 100 | 16.20 | 100 |
| MERA 2 | 88.53 | 28.17 | 100 |
| MERA 3 | 100 | 27.13 | 100 |
| MERA 4 | 88.63 | 18.39 | 0 |
| TENA | 100 | 24.68 | 100 |
| YASUNÍ | 100 | 16.43 | 100 |

3.6. Análisis de datos epidemiológicos, caracterización de signos y síntomas en accidentes ofídicos con *B. atrox* y tratamiento

Se obtuvo información de 133 casos de ofidismo reportados en el hospital de Tena, accediendo a los datos epidemiológicos y clínicos de los accidentes para el período de 2015 hasta 2019. Al analizar esto, se identificó el número de reportes por año (Figura 8).

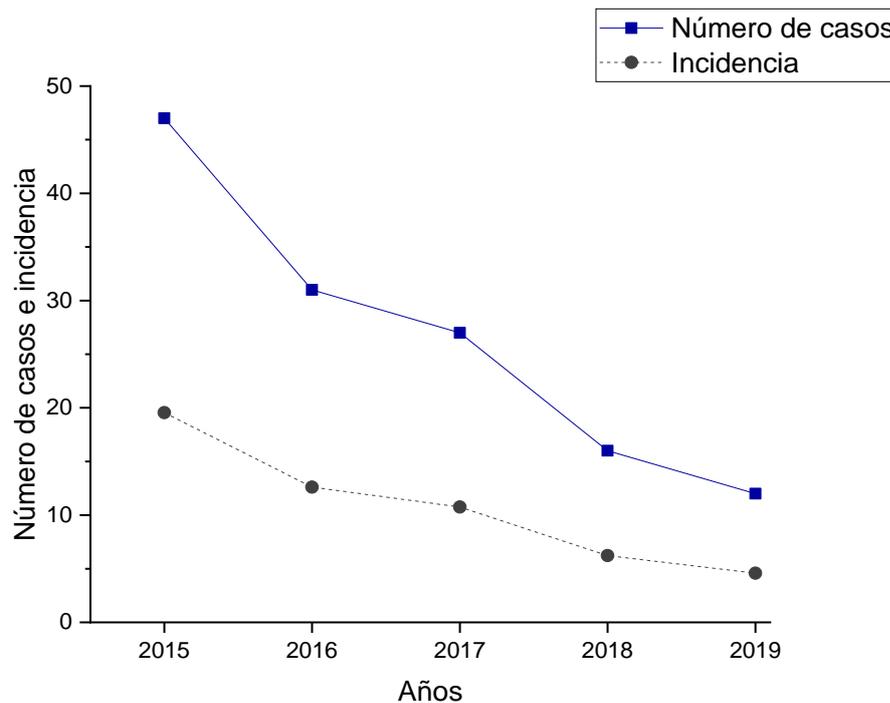


Figura 8. Número de casos de accidentes ofídicos e incidencia anual para cada 50000 habitantes. Distribución anual de los 133 casos analizados que fueron registrados en el Hospital José María Velasco Ibarra de la ciudad del Tena entre el 2015 al 2019.

Se puede observar que el número de casos registrados se reduce de manera paulatina cada año, iniciando con 47 en 2015 y llegando a 12 en el 2019. Esta tendencia se repite en los resultados de incidencia anual, que en 2015 fue de 20 casos y en 2019 de 4, ambos por cada 50000 habitantes. Para obtener este dato se consideraron únicamente los datos demográficos de Archidona, Carlos Julio Arosemena y Tena. La incidencia promedio para los 5 años fue de 11,6 por cada 50000 habitantes. Se identificó que de estos cantones provienen los pacientes atendidos en la casa de salud de Tena (Figura 9). La mayor cantidad de accidentes reportados ocurrieron en la zona rural (49%). En algunos registros de ingreso, no se halló información acerca del sitio del accidente (6,77%).

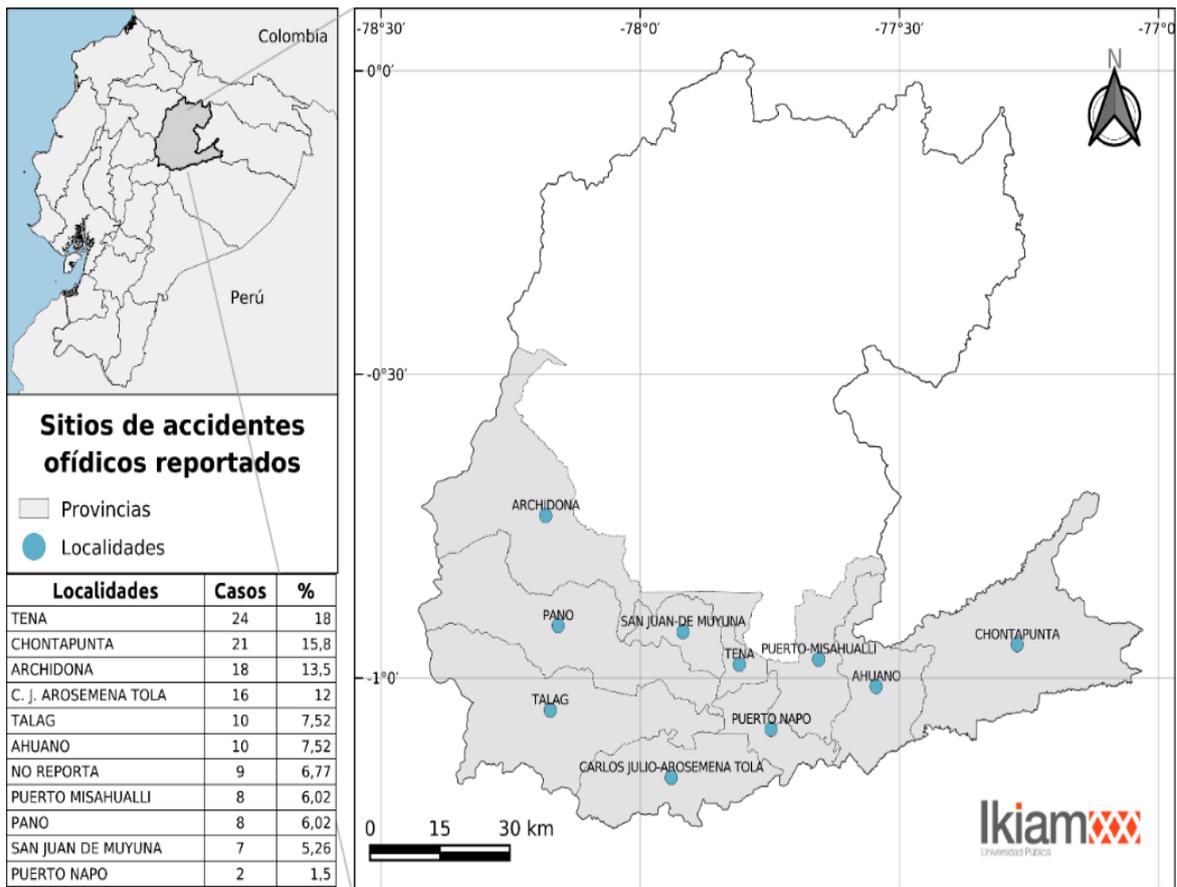


Figura 9. Localidades reportadas como lugares donde se suscitaron accidentes ofídicos. Se muestra delimitada la provincia de Napo, donde se ubica el Hospital José María Velasco Ibarra, sitio de colección de los datos. En gris se observan las zonas que fueron registradas como lugares de ofidismo en las historias clínicas analizadas. En la esquina inferior izquierda se detallan el número de casos y % por localización.

Los datos epidemiológicos de todos los accidentes reportados (Tabla 2) indican que el mayor porcentaje de afectados fueron pacientes masculinos, con un 60,1% del total de casos. En relación a la edad, el 32% de internados se encontraba en el rango de 0 a 15 años al momento del ingreso. La población entre 16 y 30 años fue la segunda más frecuente con 24% del total. De acuerdo a los reportes, el 41% de los accidentes sucedieron cuando los afectados realizaban alguna actividad relacionada con la agricultura. El 24% de incidentes se produjeron al caminar por senderos, incluyendo a los cercanos a maleza. El análisis también permitió conocer cuáles fueron las principales especies involucradas en estos sucesos. *B. atrox* fue la más descrita por los pacientes como la causante del envenenamiento en 56% de los casos. Para explicar esto, los pacientes se refirieron a la especie como “equis” o “pitalala”. *B. bilineata* y *B. taeniatus* le siguen en frecuencia, siendo reportadas como “orito”, “lorito” u “orito machacui” con el 12%.

Tabla 2. Datos epidemiológicos de los 133 casos reportados en el período 2015-2019. Se muestra el número de casos asociados a cada variable, así como el porcentaje, teniendo como base el total de los reportes.

| Variable | Casos | % |
|--|-------|-------|
| Sexo | | |
| Masculino | 81 | 60,9 |
| Femenino | 52 | 39,1 |
| Edad | | |
| 0-15 | 43 | 32,33 |
| 16-30 | 32 | 24,06 |
| 31-45 | 26 | 19,55 |
| 46-60 | 19 | 14,29 |
| 61 en adelante | 13 | 9,774 |
| Actividad al instante del accidente | | |
| Agricultura | 55 | 41,35 |
| En río | 7 | 5,26 |
| Caminando por sendero, matorral | 32 | 24,06 |
| En domicilio | 5 | 3,75 |
| Otros | 13 | 9,77 |
| No reporta | 21 | 15,79 |
| Especie involucrada | | |
| <i>Bothrops atrox</i> | 75 | 56,39 |
| <i>Bothrops bilineatus, Bothrops taeniatus</i> | 16 | 12,03 |
| No reporta | 42 | 31,58 |

De acuerdo a los reportes revisados, la mayor frecuencia de mordeduras se dio en extremidades inferiores (59%), especialmente a nivel del pie. En las extremidades superiores se infligieron el 38% de las mordeduras, principalmente en manos. También se detectó que el 1,5% de los afectados fue mordido en la región parietal o cabeza y el 0,8% en el tórax.

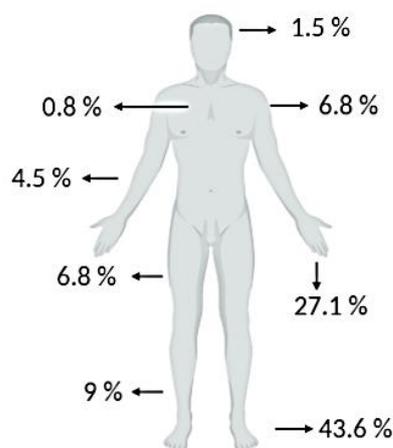


Figura 10. Sitios de mordedura en paciente ingresados por accidente ofídico al hospital de Tena. Se reporta la región anatómica de mordedura de acuerdo a los datos de los 133 casos analizados del periodo 2015-2019.

Con el fin de caracterizar las manifestaciones y detalles asociados al envenenamiento con *B. atrox*, el próximo paso fue analizar exclusivamente los casos en los que la especie fue relacionada en las historias clínicas. Como resultado se pudo observar que el 50% de accidentes fue clasificado como moderado. Los internados por ofidismo con la especie, en su mayoría fueron dados de alta en un rango de 1 a 6 días.

Tabla 3. Gravedad de envenenamiento y tiempo de hospitalización en accidentes con *B. atrox*. Diagnóstico del grado de envenenamiento y días de hospitalización de pacientes accidentes ofídicos con *B. atrox* reportados en el hospital de Tena en el período de 2015-2019.

| Variable | Casos | % |
|--------------------------------|-------|-------|
| Grado de envenenamiento | | |
| Leve | 16 | 21,33 |
| Moderado | 38 | 50,67 |
| Grave | 21 | 28 |
| Días de hospitalización | | |
| 1-6 días | 49 | 65,33 |
| 7-12 días | 15 | 20 |
| 13-15 días | 9 | 12 |
| No específica | 2 | 2,67 |

Acerca de los signos y síntomas, se obtuvieron datos de estos a nivel local y sistémico. Las manifestaciones más frecuentes en la zona de la mordedura (Tabla 4) fueron la presencia de edema, dolor y rubor generados por acción del veneno. Otros signos observados fueron la formación de hematomas o equimosis en baja frecuencia mionecrosis, linfadenitis y adenopatía. En un 21% de pacientes se diagnosticó infección en tejidos blandos, que tuvieron como consecuencia la formación de absceso en el 16% de casos y celulitis en el 5%.

Tabla 4. Manifestaciones clínicas a nivel local de envenenamiento con *B. atrox*. Signos y síntomas a nivel local reportados en los historiales de los pacientes reportados en el hospital de Tena en el período 2015-2019.

| Manifestación clínica local | Casos | % |
|-----------------------------|-------|-------|
| Absceso | 12 | 16 |
| Celulitis | 4 | 5,33 |
| Edema | 74 | 98,67 |
| Rubor | 39 | 52 |
| Dolor | 65 | 86,67 |
| Equimosis | 16 | 21,33 |
| Mionecrosis | 2 | 2,66 |
| Linfadenitis | 1 | 1,33 |
| Adenopatía | 1 | 1,33 |

Por otra parte, las manifestaciones sistémicas más frecuentes (Tabla 5) fueron hemorragia, gingivorragia y cefalea. También se identificó que varios pacientes presentaron fiebre y vómito. Los episodios de fiebre se presentaron tanto después del accidente, así como durante el tratamiento del paciente en el hospital. En menor frecuencia se evidenciaron afectaciones cardíacas (hipertensión y bradicardia), falla renal, sangre en la orina o hematuria y disminución en los niveles de plaquetas o trombocitopenia. Cuatro pacientes regresaron a la casa de salud por complicaciones derivadas del accidente. Los motivos para su reingreso fueron: I) infección, II) necrosis en la zona de mordedura y II) estrés postraumático, originado por el evento donde ocurrió la mordedura.

Tabla 5. Manifestaciones clínicas a nivel sistémico de los pacientes de envenenamiento con *B. atrox*. Signos y síntomas sistémicos reportados en los historiales de pacientes del hospital de Tena en el período 2015-2019.

| Manifestación clínica sistémica | Casos | % |
|--|--------------|----------|
| Hemorragia | 10 | 13,33 |
| Gingivorragia | 8 | 10,67 |
| Hematuria | 2 | 2,66 |
| Trombocitopenia | 1 | 1,33 |
| Síndrome compartimental | 2 | 2,66 |
| Falla renal | 3 | 4 |
| Cefalea | 11 | 14,67 |
| Bradicardia | 1 | 1,33 |
| Hipertensión | 4 | 5,33 |
| Vómito | 7 | 9,33 |
| Fiebre | 6 | 8 |
| Complicaciones luego de egreso | | |
| Infección | 2 | 2,66 |
| Necrosis | 1 | 1,33 |
| Estrés postraumático | 1 | 1,33 |

El tiempo de coagulación sanguínea es una característica a evaluar para conocer el grado de envenenamiento. En las historias clínicas analizadas se muestra que en el 88% de los casos, el ofidismo con *B. atrox* generó una alteración en el tiempo de coagulación (valor normal < 10 minutos). En el 73% de los accidentes, se detectó que la sangre se coaguló en un tiempo mayor a 20 minutos, por lo que se clasificó como incoagulable. También se obtuvo información acerca del tiempo que transcurrió desde la aplicación de la primera dosis de antiofídico hasta la restauración de los parámetros normales de coagulación. Los datos revelan que en el 38,67% de afectados, la normalización ocurrió entre las 6 y 12 h de

iniciado el tratamiento. En el 8% de los pacientes, la coagulación se regularizó luego de 36 h, siendo los casos más extremos.

Tabla 6. Datos sobre coagulación sanguínea en pacientes de envenenamiento con *B. atrox*. Se reporta el tiempo de coagulación determinado al momento de atención y el rango de tiempo en el que la coagulación volvió a los parámetros normales, tomando como tiempo cero al momento de administración del antiveneno.

| | Casos | % |
|---|-------|-------|
| Tiempo de coagulación | | |
| Incoagulable | 55 | 73,33 |
| > 10 min | 10 | 13,33 |
| < 10 min | 9 | 12 |
| Tiempo hasta restauración de parámetros normales | | |
| 1-6 h | 16 | 21,33 |
| 6-12 h | 29 | 38,67 |
| 12-24 h | 23 | 30,67 |
| 36 h o más | 6 | 8 |
| No específica | 1 | 1,33 |

El último paso del análisis de datos hospitalarios fue el estudio de la información relacionada a la administración del tratamiento antiofídico (Tabla 7). Para el 44,67% de los accidentes con *B. atrox* la dosis varió entre 9 y 24 viales.

Tabla 7. Administración del antiveneno a pacientes de envenenamiento con *B. atrox* y complicaciones derivadas. Datos de uso y tiempo de administración del antiveneno (Polival-ICP) y complicaciones generadas por su aplicación en los 133 casos analizados del período 2015-2019. NA: No aplica.

| | Casos | % |
|--|-------|-------|
| Número de viales | | |
| 1-8 | 27 | 43 |
| 9-24 | 27 | 44,67 |
| 24-36 | 5 | 6,667 |
| 36 en adelante | 2 | 2,67 |
| Tiempo hasta su aplicación | | |
| 1-3 h | 36 | 48 |
| 4-6 h | 16 | 21,33 |
| 7-12 h | 8 | 10,67 |
| 13-28 h | 5 | 6,67 |
| 30 h en adelante | 3 | 4 |
| No específica | 7 | 9,33 |
| Complicaciones por uso de suero | | |
| Fiebre | 1 | NA |
| Urticaria | 1 | |
| Rash generalizado | 11 | |
| Shock | 1 | |
| Hemólisis | 1 | |

En casos de menor severidad, que representan el 43%, se administraron dosis de entre 1 y 8 frascos. En el 6,67% de afectados se aplicaron dosis considerablemente altas, de entre 24 y 36 viales. Mientras que en dos casos se necesitaron de más de 36 dosis de antiveneno para neutralizar los efectos toxicológicos del envenenamiento. Finalmente se observó que en 12 de los 133 casos analizados se presentó alguna complicación derivada por el uso del suero antiofídico.

CAPÍTULO IV: INTERPRETACIÓN Y DISCUSIÓN

B. atrox es la especie con mayor incidencia en accidentes ofídicos en localidades amazónicas de América del Sur [75]. La variación intraespecífica del fenotipo venómico ha sido descrita para este reptil, variación que podría requerir de tratamientos médicos específicos ante envenenamientos provocados por la misma especie [18]. Se posee limitada información sobre la diversidad de estos fenotipos en el país y la influencia de la misma en las manifestaciones clínicas derivadas del envenenamiento con *B. atrox*. En este estudio, para mejorar estas limitaciones, se caracterizó el perfil bioquímico de venenos de individuos provenientes de diferentes localidades de la región amazónica ecuatoriana. Los resultados revelaron semejanzas en los perfiles de las muestras colectadas en la misma zona (Mera), y al mismo tiempo, diferencias notables con los venenos colectados en Tena y Yasuní. En los perfiles de electroforesis del veneno total de estos últimos, se evidencia la ausencia de bandas asociadas a SVMPs-PIII. Para los venenos de varias especies de género *Bothrops* ya caracterizadas, incluyendo a *B. atrox*, se ha identificado que los componentes más abundantes son las metaloproteinasas [27, 53, 76]. No obstante, la predominancia de un tipo u otro de toxinas de esta familia es versátil a nivel intraespecífico. Esto fue demostrado por Nuñez et al. [32], al determinar la venómica de pools obtenidos de poblaciones de *B. atrox* de Brasil, Colombia, Ecuador y Perú. Para el pool de la población de Colombia se halló que las SVMPs-PI representaban el mayor componente del veneno, mientras que, en los pools restantes, las SVMPs-PIII fueron las predominantes. Lo observado en este estudio previo se evidencia en las muestras de veneno de Mera.

La información de los cromatogramas confirma que, en las seis muestras analizadas en el presente estudio, las toxinas de mayor presencia son metaloproteinasas. En la separación de los componentes del veneno por fase reversa, estas proteínas eluyen por lo general en las últimas fracciones (con un tiempo de retención entre 60 y 70 minutos). En la zona intermedia, que en los perfiles de este estudio van de los 50 a los 60 minutos de corrida, las toxinas representadas en los picos son PLA_{2s} (Lys49), SVSPs y algunas isoformas de SVMPs-PI. En el rango de los 30 a 50 minutos, los primeros picos representan la presencia de desintegrinas, continuando con PLA_{2s} (Asp49) [34, 77]. Esta información, integrada con lo observado en la electroforesis, permite asociar a los componentes venómicos con determinados picos, en especial los de mayor absorbancia. Es así como, se

puede deducir que las SVMPs son las toxinas predominantes en los venenos de individuos estudiados, similar a los hallazgos de Nuñez et al.[32] y Moretto Del-Rei et al. [54], que analizaron los venenos de *B. atrox* de diferentes localidades de Suramérica.

Todas las muestras colectadas para este trabajo provinieron de adultos de *B. atrox*. En el caso de las muestras de Tena y Yasuní, su fraccionamiento corrobora lo observado en el perfil de electroforesis general, mostrando una baja absorbancia en picos asociados a SVMPs-PIII. Esto es característico de un fenotipo ontogénico, en donde existe mayor expresión de SVMPs-PI. Los perfiles ontogénicos están sujetos a cambios relacionados con la edad del individuo [18], esto significa que la composición venómica es diferente entre un juvenil y un adulto de la misma especie. Al contrario, en individuos con fenotipos paedomorficos, la expresión venómica se mantiene durante los distintos estadios de vida [78]. Las modificaciones ontogénicas estarían asociados a mudanzas en la dieta. Un estudio de la toxicidad del veneno de *Bothrops* con fenotipo ontogénico, mostró que las serpientes juveniles, presentaron un efecto letal más pronunciado en anfibios. El veneno de adultos ejerció mayor acción ante presas endotérmicas como los mamíferos [79].

Por otra parte, los perfiles cromatográficos de las muestras de Mera reflejan similitud a nivel bioquímico entre ellas, con la clara excepción de los picos asociados a desintegrinas, que están ausentes en Mera 1. Sin embargo, las alteraciones son más notables al comparar venenos de distintas zonas, lo que se observa al contrastar los perfiles de las muestras de Mera, con los de Tena y Yasuní [25]. Las modificaciones pueden estar asociadas al nicho ecológico de cada población de serpientes [80]. La variación en la concentración de componentes específicos, como las SVMPs-PIII, aportaría al alto grado de adaptación observado en *B. atrox* [53]. Esta tendencia se observa en los resultados de este estudio, puesto que lo que caracteriza a los venenos de cada zona muestreada es que difieren en la abundancia de metaloproteinasas PIII.

Anteriormente ya se ha descrito la presencia de variaciones a nivel individual en *Bothrops*, inclusive en venenos provenientes de la misma zona geográfica [81]. Estos cambios no deben pasar inadvertidos, puesto que pueden ocasionar diferencias funcionales. Los resultados de la caracterización enzimática son prueba de esto, ya que se observan diferencias significativas en las actividades incluso dentro de la misma población. Se inició evaluando la actividad caseinolítica, ejercida por las toxinas con acción proteolítica

[82]. En esta etapa, las muestras de Tena y Yasuní mostraron el porcentaje más alto de proteólisis, mientras que Mera 3 y 4 tuvieron la menor tasa de reacción. En el veneno bothrópico, las SVMPS y SVSPs son las toxinas que causan la degradación del sustrato usado en los ensayos [83]. Sin embargo, se debe considerar la presencia de isoformas de estas familias, que pueden presentar baja afinidad por el sustrato, aunque posean una alta actividad catalítica [34]. En la evaluación de hidrólisis del sustrato NOBA, se evidenciaron diferencias entre los venenos de Tena y Yasuní. La primera indujo la mayor actividad PLA_{2s}, mientras que la última, junto con Mera 4, tuvieron menor capacidad catalítica en el ensayo. Los resultados reflejan la acción de una fracción del total de PLA_{2s} de la secreción venenosa, debido a que existen isoformas inactivas enzimáticamente [84]. En las fosfolipasas con acción catalítica, un residuo de aspartato se ubica en la posición 49 de su secuencia. En las isoformas inactivas, generalmente un residuo de lisina se encuentra en tal posición. Esta modificación sería la responsable de la pérdida de actividad enzimática, puesto que el residuo de Asp es necesario para la coordinación de iones de calcio, un paso esencial en el mecanismo de hidrólisis de los fosfolípidos de membranas catalizado por este grupo de toxinas [85, 86]. La abundancia de isoformas sin capacidad hidrolítica puede llegar a ser significativa en venenos de vipéridos [33, 87]. Por ejemplo, Salazar-Valenzuela y colaboradores [62], identificaron que en *Bothrocophias campbelli* estas isoenzimas representan el 42% del venoma de la especie.

A continuación, se realizó la caracterización de actividad tipo trombina o serinproteasa. En este experimento, tres de los venenos de Mera (1,2 y 4) mostraron el mejor desempeño, al contrario de lo observado para Mera 3 y Tena. El sustrato cromogénico empleado en este ensayo, presenta una alta afinidad para SVSPs; sin embargo, no son las únicas enzimas que pueden participar en su degradación. Es el caso de varias isoformas de SVMPS con actividad tipo trombina [88]. En general, estas toxinas alteran las cascadas de señalización involucradas en los procesos de coagulación sanguínea por degradación proteolítica [88, 89].

El análisis de caracterización enzimática muestra que la acción de los venenos difiere significativamente en los distintos ensayos. Sin embargo, debido al sinergismo que existe entre los componentes del veneno para inducir los efectos tóxicos, es necesario conocer las consecuencias del envenenamiento en modelos animales para verificar si las

diferencias a nivel enzimático tienen relevancia a nivel biológico [35]. En esta línea, se procedió con la caracterización toxicológica de las muestras de veneno. Esta fase se inició con la evaluación de actividad hemorrágica en los ratones CD-1. Varios autores han descrito que las SVMPs cumplen un rol primordial en la generación de hemorragia [52, 53, 90]. Estas biomoléculas hidrolizan proteínas de la matriz extracelular (MEC) de los vasos capilares sanguíneos, causando como consecuencia la inducción de daño local y sistémico [91]. En los venenos bothrópicos se encuentran principalmente tres grupos de esta familia, SMVPs-PI, PII y PIII, aunque el segundo en general tiene baja abundancia, al contrario de los restantes [92].

Los resultados de esta actividad evidencian que el veneno de Yasuní generó en promedio los puntos de hemorragia de mayor área, difiriendo de manera significativa con lo obtenido para las muestras restantes. En contraste, la muestra Tena tuvo el rendimiento más bajo. Esta diferencia es intrigante, puesto que ambos venenos comparten un perfil similar, con una alta abundancia de SVMPs-PI, además de mostrar el mejor desempeño en el ensayo caseinolítico. En general, se ha descrito que las metaloproteinasas PIII son altamente hemorrágicas [93], mientras que las de la clase PI por lo general son débiles en relación a la misma actividad [92]. La alta concentración de SVMPs-PI, que a su vez implica la baja presencia de la clase PIII sería el motivo de la débil capacidad hemorrágica del veneno de Tena, concordando con lo propuesto por Alape-Girón et al. [25] y Nuñez et al. [32] en el estudio del veneno de *B. asper* y *B. atrox* respectivamente. Sin embargo, esto no se cumple en Yasuní, lo cual puede estar ligado a la existencia de isoformas de SVMPs-PI altamente hemorrágicas.

Un estudio de 2017 demostró precisamente esto, lo cual supone una excepción a la regla. Freitas-de-Sousa y sus colaboradores aislaron una SVMP tipo I denominada como Atroxlysin-Ia del veneno de *B. atrox*, que mostró una acción hemorrágica equiparable a lo observado en la clase III de estas toxinas [94]. El origen de la baja actividad hemorrágica para las proteínas PI se ha asociado a su estructura terciaria, que posee un solo dominio. El grupo PIII, además del dominio metaloproteinasa, contiene otros que permiten la unión a los capilares, clivando de manera eficiente los componentes de la MEC [90]. El mecanismo propuesto para la Atroxlysin-Ia, se basa en su alta capacidad catalítica. Además, en comparación con otras metaloproteinasas PI, la región cercana al centro activo de

Atroxlysin-Ia es más flexible y tiene un gran potencial electroestático, lo que favorecería la unión a sus dianas [94]. Esta isoforma ha sido identificada en el veneno *B. atrox* de Brasil mediante cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tandem (LC-MS/MS) [32]. Atroxlysin-Ia y otras isoformas similares, probablemente formen parte del veneno de Yasuní, siendo responsables de su marcada acción caseinolítica y hemorrágica. Para las muestras de Mera, en donde las SVMPs-PIII son abundantes, la inducción de hemorragia es similar entre ellas, produciendo áreas de hemorragia notables, como Mera 4, y sin diferencias estadísticas al ser comparadas.

Siguiendo la caracterización toxicológica de los venenos de individuos, se evaluó la formación de edema producida por cada muestra. Este efecto local es característico del envenenamiento bothrópico [95], que surge por la acción de varios componentes, incluyendo proteasas y miotoxinas [96]. El proceso inflamatorio que desencadena el envenenamiento involucra el aumento de células de respuesta inmunitaria, citoquinas e interleucinas y la activación proteolítica de componentes del complemento [95, 97]. En el presente trabajo, los venenos analizados produjeron una notable inflamación, pero que no varió significativamente entre muestras. Las variaciones en la abundancia de proteínas y de actividades enzimáticas no muestran influencia en la patogénesis de inflamación. En el estudio de Almeida et al. [52] sobre estabilidad de una colección de venenos ecuatorianos desecados de *Bothrops*, se constató la presencia de fluctuaciones bioquímicas y enzimáticas entre las muestras, que no derivaron en diferencias significativas en su capacidad de generar edema.

La miotoxicidad es otra característica que se debe evaluar en el envenenamiento bothrópico [98]. En este ensayo, la muestra de Tena tuvo un resultado estadísticamente sobresaliente en relación a las muestras de otras zonas. El perfil bioquímico de Tena muestra una gran abundancia de PLA₂s, incluyendo la zona donde también eluyen SVSPs. Esto evidenciaría una alta concentración de isoformas catalíticas y no catalíticas [77], que se ve reflejada en los ensayos enzimáticos, donde tuvo el porcentaje de actividad más alto. Las PLA₂s son las miotoxinas predominantes en la composición venómica, incluyendo a las Lys49, que no poseen actividad catalítica [99]. Varios estudios han descrito el rol de las Lys49 en la inducción de este efecto tóxico, siendo farmacológicamente activas en ensayos *in vitro* e *in vivo* [64, 100]. Debido a que su mecanismo es independiente de una reacción

de hidrólisis [84], su actividad y concentración total no puede ser determinada mediante ensayos enzimáticos. Esta sería la razón por la cual en la caracterización enzimática de PLA₂s, Yasuní tuvo un desempeño similar a varias muestras de Mera, mientras que en los modelos animales los venenos de Mera exhibieron un desempeño similar, sin diferencias estadísticas entre ellas y al mismo tiempo, superior a lo observado para Yasuní.

La letalidad de un veneno es considerada como la consecuencia final de su accionar en un organismo, con participación de todas las biomoléculas que lo componen. Por este motivo, es un componente clave y ensayo estándar para la evaluación pre-clínica de los antivenenos [35, 59]. A las 48 h del primer desafío, la tasa de supervivencia del veneno de Yasuní fue la más baja, mientras que la muestra de Tena no fue mortífera para los ratones. En todos los grupos de biomodelos desafiados con venenos de Mera, un tercio falleció. El segundo desafío se realizó de manera continua, confirmando la tendencia para los venenos de Tena y Yasuní. De los venenos de Mera, en este ensayo, la muestra 1 fue la más letal y la 2 la de mayor tasa de supervivencia. Diferentes trabajos han demostrado que los venenos con alta abundancia de SVMPS-PIII son aquellos con mayor letalidad [25, 32, 101]. Esta sería la razón por la cual los venenos de Mera mostraron un efecto mucho más notable que el de Tena. Por otra parte, la baja tasa de supervivencia en ratones inyectados con la muestra de Yasuní sería producto de su capacidad hemorrágica, debido a la presencia de isoformas particulares de metaloenzimas clase I, con elevada actividad catalítica [94]. El motivo por el que los venenos con altas concentraciones de SVMPS-PIII son más letales es que estas toxinas por lo general ejercen efectos hemorrágicos más pronunciados que las otras clases de enzimas [102], como se explicó anteriormente. Por este motivo, diversos estudios han correlacionado a la capacidad de un veneno para degradar componentes de la MEC con su letalidad [24, 52, 103]. Variaciones en la letalidad de pools de venenos de *B. atrox* fueron hallados por Moretto Del-Rei et al.[54] y Sousa et al. [53], en poblaciones de la Amazonía brasileña de diferentes localidades, lo que concuerda con lo evidenciado en el presente estudio.

Como producto de la caracterización bioquímica, enzimática y toxicológica de los venenos se pudo identificar que las diferencias en el perfil de proteínas y la actividad enzimática entre los venenos de Mera, no se reflejaron en los ensayos biológicos. Esto va en línea con lo aseverado anteriormente, que indica que los componentes venómicos están

sujetos a variaciones que contribuyen a la adaptación a un entorno particular [53]. Las muestras de Mera se destacaron por mostrar una notable capacidad hemorrágica y miotóxica. En contraste, los venenos de Tena y Yasuní, que comparten similitudes en su perfil bioquímico y en las actividades caseinolíticas y serinproteasa, presentaron diferencias en los efectos toxicológicos de su envenenamiento. Tena se caracterizó por su miotoxicidad, mientras que Yasuní lo hizo por su alta letalidad e inducción de hemorragia. Esta diversidad funcional ha sido documentada en especies bothrópicas [53, 104]. La muestra de Tena fue la única colectada de un individuo de sexo masculino. El trabajo de Furtado et al. [105] demostró que el veneno en hembras *B. jararaca* se destaca por ser letal y hemorrágico, mientras que, en machos, las actividades miotóxicas y de fosfolipasa son las predominantes, lo que concuerda con los resultados obtenidos para individuos de *B. atrox* en el presente estudio.

En cada evento de ofidismo está involucrada una serpiente diferente y se requiere el tratamiento de las características particulares de su envenenamiento. Es de interés clínico conocer si estas singularidades pueden afectar el desempeño del antiveneno [53]. Considerando esto, la siguiente etapa del presente estudio comprendió la neutralización de las principales actividades de los venenos bothrópicos empleando el antiofídico polivalente del ICP. En general, el fármaco mostró una respuesta eficiente en dos de los tres ensayos, con ciertas excepciones. En la formación de edema, la eficiencia de neutralización no superó el 30%. Se ha documentado que los antivenenos comerciales tienen una baja efectividad para contener el proceso inflamatorio y los daños locales [73, 106], lo que se corrobora en los resultados obtenidos en este estudio. Además, se ha evidenciado que, en algunos casos, el antiveneno puede aportar a la elevación de la inflamación, al contener biomoléculas diferentes a inmunoglobulinas [107].

En la neutralización de hemorragia y letalidad, Mera 2 y Mera 4 tuvieron resultados particulares. El antiveneno no pudo disminuir completamente la hemorragia generada por estas muestras, y la letalidad ejercida por Mera 4 en la proporción 1:1 veneno/antiveneno. La investigación de Laines y colaboradores con venenos bothrópicos ecuatorianos, incluyendo el de *B. atrox* concluyó que el antiofídico ICP es efectivo ante los efectos hemorrágicos y letales del veneno en ratones [39]. Sin embargo, se debe tener en cuenta que, en el trabajo descrito, se empleó un pool proveniente de serpientes en cautiverio y se

ha documentado que el veneno en individuos de *B. atrox* en esta condición, puede sufrir modificaciones a través de los años [47]. Otro dato a considerar es que, en el mismo estudio, la relación veneno/antiveneno aplicada fue de 3,8 mg/ml para letalidad y de 0,8 ml de antiveneno/mg de veneno para reducir a la mitad la hemorragia con *B. atrox*, lo que justifica la neutralización de las actividades. En el presente estudio, con una relación 1:1 veneno/antiveneno, se logró neutralizar la hemorragia generada por las muestras Mera 1 y 3, Tena y Yasuní. Estudios de antivenómica con *B. atrox* han demostrado que en venenos con un perfil bioquímico similar al de Mera 1 y 3, la inmunodepleción producida por el suero ICP es cercana al 100%, disminuyendo completamente también su actividad letal [18, 32].

En las muestras de Tena y Yasuní dos factores serían el motivo de su completa neutralización hemorrágica y letal. El primero, es la baja concentración de SVMPS-PIII en estos venenos, las principales toxinas hemorrágicas y letales [53, 101], lo que favorece su inmunodepleción. El segundo factor se relaciona a la variedad de isoformas de SVMPS-PI. Se ha verificado que el antiveneno ICP tiene poca reactividad ante algunas isoenzimas de esta clase, debido a la baja inmunogenicidad de las proteínas [18]. Sin embargo, en el perfil bioquímico de ambos venenos, se puede evidenciar la poca presencia de picos en la zona de elución de metaloenzimas, lo que implica una menor diversidad de isoformas en su composición. Esto podría facilitar el accionar del antiveneno, explicando los resultados obtenidos en este trabajo. De hecho, varios estudios han demostrado la existencia de una alta reactividad cruzada del Polival-ICP, siendo así efectivo ante el envenenamiento de algunas especies de vipéridos de Centro y Suramérica [108]. No obstante, se debe tener claro que, para tener tal desempeño, el promedio de dosis de neutralización puede variar a nivel inter e intraespecífico [21, 35, 58, 78]. Por este motivo, se incrementó la dosis de Polival-ICP para los venenos que no fueron neutralizados completamente. Se evitó la formación de puntos de hemorragia en la zona dorsal de los ratones con una relación 1:2 y (veneno/antiveneno) para Mera 2 y 4, y se neutralizó de manera total la letalidad de Mera 4 con una dosis de 2,5 ml de antiveneno/mg antiveneno. Para concluir esta etapa, se realizó otro ensayo de neutralización de letalidad, pero variando las condiciones. Inicialmente, se inyectaron 200 µg de veneno en la zona intraperitoneal, y luego de 30 minutos se administraron 500 µl de antiveneno, teniendo una relación final de 1:2,5 (veneno/

antiveneno). Al final de las 48 h no se registraron fallecidos. El fin de este procedimiento fue similar las condiciones reales de un accidente ofídico, en donde no existe una pre incubación con el antiofídico [73].

De acuerdo a lo descrito por el Ministerio de Salud Pública del Ecuador (MSP), el antiveneno de referencia en el país debería neutralizar los efectos tóxicos del envenenamiento al ser administrado en una concentración 1 veneno:1 antiveneno [20]. Al aplicar esta dosis, se neutralizaron las actividades hemorrágicas de cuatro muestras y la letalidad de cinco. Mera 4 fue la notable excepción, ya que en ambos ensayos se requirió no menos de una concentración 1 veneno:2 antiveneno para disminuir sus efectos toxicológicos. Estos resultados llevan a dos deducciones claras; la primera es que el veneno más letal (Yasuni) no necesariamente será el más difícil de neutralizar, ya que la acción del antiofídico está más relacionada con la composición del veneno [53] que con la intensidad de sus actividades enzimáticas y biológicas. La segunda deducción es que en algunos casos se puede llegar a requerir de mayores dosis de Polival-ICP en relación a lo estandarizado por el MSP [20]. Es por esto último que el monitoreo del desempeño de un antiveneno es requerido para conocer su eficiencia frente a diversas manifestaciones clínicas que se pueden generar en un evento de ofidismo [13]. Con este antecedente, la siguiente fase del estudio comprendió la revisión y análisis de las historias clínicas de pacientes ingresados por accidentes ofídicos al hospital José María Velasco Ibarra, de la ciudad de Tena.

El análisis inicial de las características epidemiológicas de todos los casos de ofidismo en el Tena indica que estos han disminuido desde el 2015 hasta el 2019. Es importante considerar que existe un subregistro en la notificación de esta enfermedad desatendida, no sólo en el país, también a nivel mundial [13]. Esto puede estar relacionado con la tendencia observada en los datos. Otro de los factores que podrían influir es la reducción de la población de serpientes. Un estudio recientemente publicado sugiere que este efecto en comunidades tropicales de estos reptiles se debe a alteraciones en la cadena trófica [109]. Esto junto a la fragmentación e invasión de su hábitat por diferentes actividades humanas y su matanza, han afectado gravemente a las poblaciones de ofidios [110, 111]. En un estudio retrospectivo sobre ofidismo en otra ciudad ecuatoriana, Sucúa, Morona Santiago, también se puede observar una disminución significativa de casos por año. Considerando que este fue realizado en 2003, para la fecha la incidencia era de 155

casos por 100 00 habitantes [112]. En un trabajo más reciente de Nariño, Colombia, la incidencia reportada fue 6,5 accidentes por cada 100 mil habitantes[74]. Esta cifra es 4 veces inferior en comparación a lo hallado en Tena, señalando el alto riesgo de ofidismo en la zona de estudio.

Sobre las características y localidades de accidentes ofídicos, se conoce que ocurren en su mayoría en zonas rurales, afectando principalmente a la población masculina de entre 15 a 40 años, que se dedica a labores agrícolas [13, 74]. Debido a las actividades desempeñadas por las víctimas de ofidismo, la mayoría de mordidas son infligidas a nivel de las extremidades, especialmente en pie y manos [49]. En baja frecuencia, se han reportado mordeduras en regiones anatómicas como tórax y cabeza, que, aunque son eventos menos comunes, pueden ocasionar complicaciones severas por la localización [113]. Toda esta información es similar a los datos de los accidentes ofídicos registrados en el hospital de la ciudad del Tena.

Un dato valioso identificado en las historias clínicas fue el de la especie que causó el envenenamiento. En cerca de 60% de los casos reportados, la especie identificada fue *B. atrox*, lo que concuerda con las investigaciones realizadas por varios autores en ciudades amazónicas [40, 46]. En los registros, la especie fue descrita generalmente por sus nombres comunes que son pitalala y equis [45]. Los juveniles de *B. atrox* son conocidos también como “shishi” [20], sin embargo, este nombre también se emplea para otras especies que tienen una distribución potencial en Napo como *B. taeniatus* y *B. bilineatus*, las cuales comparten otros nombres comunes [45]. Por esto, los accidentes asociados a la serpiente “shishi” se clasificaron como no especificados. El nombre equis también es empleado para *B. brazili*. De hecho, el estudio realizado en Sucúa indica que esta serpiente fue la causante de una cantidad significativa de eventos de ofidismo en esa zona [112]. Sin embargo, su distribución potencial no incluye a Napo y de hecho, *B. brazili* es poco común en Ecuador [45].

Después de corroborar que una gran parte de los accidentes ofídicos en Tena están asociados a *B. atrox*, se procedió a analizar las características clínicas del ofidismo de esta especie. En la mitad de los pacientes, los signos y síntomas llevaron a diagnosticar al envenenamiento como moderado. Las manifestaciones comunes para todos los grados son edema, eritema y dolor. Lo que caracteriza al accidente moderado es la presencia de

sangrado local, edema en más de un segmento anatómico y que la sangre del paciente no coagula. En casos categorizados como graves, además de lo detallado anteriormente, el afectado puede sufrir de hemorragias graves, falla renal, síndrome compartimental y fallas multiorgánicas [20, 114]. Cuando la mordedura se da en cabeza o cuello se clasifica directamente como grave, que representan el 28% de ingresos al hospital de Tena. Los datos concuerdan a lo observado en el trabajo de Brenes-Chacón y colaboradores, en el que el 72,5 % de pacientes fueron clasificados con envenenamiento moderado. En la zona geográfica en la que se desarrolló el trabajo, *B. asper* es la especie de mayor importancia médica [17].

Con respecto a las manifestaciones clínicas, las más comunes a nivel local fueron edema, rubor y dolor, que son consecuencia de eventos de la cascada de la inflamación [95]. Las proteínas del veneno presentan la capacidad de actuar como antígenos, además de interferir en algunos procesos de señalización que terminan amplificando la actividad inmune [115], por lo que la inflamación es una respuesta ubicua en todos los grados de envenenamiento. En modelos animales, la inducción de edema se da incluso en bajas dosis de veneno [116]. La inducción de equimosis y de infecciones a nivel local se identificaron en cerca del 20% de internados. La equimosis se produce por la actividad hemorrágica del veneno, mientras que las infecciones se derivan de la actividad proteolítica, causando muerte en tejidos que son invadidos por bacterias que provienen de la microflora oral de la serpiente y en algunos casos de la manipulación de la herida [117]. La aplicación de torniquetes, por ejemplo, ha sido correlacionada con la formación de abscesos [118], que para ser tratados requieren de intervención quirúrgica [119]. Casos de mionecrosis, y adenopatías son reportados en bajos porcentajes (<3%). Las manifestaciones locales descritas fueron notificadas en porcentajes similares para accidentes ofídicos en Colombia [61], Costa Rica [17] y Ecuador [40, 112].

A nivel sistémico, se identificó que la cefalea y los desórdenes de hemostasia fueron los más comunes. Los efectos sistémicos son causados por la acción de diferentes hemorraginas, necrotoxinas y nefrotoxinas presentes en el veneno de vipéridos [120]. En algunos casos se desarrolla una respuesta inflamatoria sistémica que involucra fluctuaciones en los niveles de células sanguíneas, como la trombocitopenia [121]. La injuria renal es otra complicación registrada, está causada por una variedad de factores,

tales como la actividad citotóxica del veneno sobre los túbulos y la acumulación de fibrina en estructuras renales, derivando en otra manifestación detectada, la hematuria [122, 123]. Sobre las hemorragias sistemáticas, existen varias causas, como la activación o inhibición de factores de coagulación y alteraciones hemodinámicas [124]. Los casos de síndrome compartimental también suponen un problema en el tratamiento del ofidismo. Tienen poca frecuencia en envenenamientos bothrópicos, como se observa en el presente trabajo, pero su manejo no se encuentra estandarizado pudiendo derivar en fasciotomía. El síndrome sería consecuencia de la acción del veneno sobre tejidos, lo que altera el flujo sanguíneo [125]. El envenenamiento bothrópico se caracteriza por marcados efectos locales [61], siendo las manifestaciones sistémicas, como las reportadas en este estudio, menos comunes.

La prolongación del tiempo de coagulación sanguínea es otra característica del envenenamiento bothrópico. La medición de los tiempos de coagulación se aplica para el diagnóstico inicial del paciente [20]. En el 73% de los accidentes ofídicos con *B. atrox* reportados en el hospital de Tena no hubo coagulación dentro de los 20 minutos de la prueba. El origen de esta alteración sistémica está en la actividad de las SVSPs y de algunas isoformas de SVMPS, que intervienen en las cascadas de coagulación [80]. Al igual que en el estudio de Oliveira y colaboradores [126], en la mayoría de afectados, los parámetros normales de coagulación se restauraron luego de 12 h de aplicación del antiveneno, aunque en un porcentaje importante de internados (30%), esto tomó más 12 h e incluso en varios casos (8%) más de 36 h. Durante el tratamiento de los pacientes, la prueba de coagulación se realiza cada 6 a 12 h. En el caso de encontrar nuevamente tiempos prolongados, se deben administrar dosis adicionales de antiofídico [20]. Por esto, la restauración de los valores estándar depende de la acción y eficiencia del antiveneno.

La gran variación de manifestaciones clínicas evidenciadas en los pacientes de envenenamiento corrobora los resultados de la caracterización de los venenos. Esta variación en los signos locales y sistémicos deben ser consideradas en la producción de los antivenenos [25]. De acuerdo a los datos hospitalarios, el antiofídico es eficiente, debido a que no se reportaron muertes en el período de análisis. Sin embargo, las dosis para alcanzar tal eficiencia en algunos casos son altas. En cuatro pacientes, se administraron más de 24 viales durante el tratamiento, siendo un valor superior en comparación del estudio de

Brenes-Chacón et al. [17] en el cual se indica que en cuatro pacientes se administraron más de 21 viales. Mientras que la investigación de Silva de Oliveira et al. [126] señala que para neutralizar el envenenamiento de serpientes de la Amazonía brasileña, las dosis no superaron los 13 viales. La aplicación de altas concentraciones de antiveneno puede colocar al afectado en una situación de riesgo, debido a los efectos secundarios que pueden presentarse [60].

En el 9% de los 133 casos analizados se presentaron reacciones adversas a la administración del antiofídico, siendo el rash cutáneo la manifestación más común. En uno de los pacientes adicionalmente, hubo shock anafiláctico, que tuvo que ser tratado con adrenalina. Estas cifras son inferiores a los descrito en otros estudios, como el de Smalligan et al. [40], en donde las reacciones al antiveneno llegaron al 73%. En el trabajo de Otero y colaboradores, el porcentaje más bajo de reacciones fue del 23,5%. Brenes-Chacón por su parte, indicó que el 16,3% de pacientes atendidos con antiofídicos del ICP tuvieron alguna complicación relacionada por su uso. Los datos expuestos demuestran que, aunque se requieran dosis altas en algunos casos, el riesgo de situaciones adversas es bajo para el Polival-ICP, al compararlo con otros antiofídicos. No obstante, el hecho de que se tenga que usar una alta cantidad de viales en cada caso de envenenamiento, deja en desventaja a otros pacientes que puedan necesitar este medicamento esencial [127]. Esto es particularmente importante en un país que no posee una producción local de suero antiofídico como Ecuador, el cual depende de los niveles de su manufacturación que se producen en el exterior [43].

Un factor importante en el desarrollo de complicaciones derivadas del envenenamiento, es el tiempo que transcurrió desde el accidente hasta la administración de la terapia [13]. Lo documentado en este trabajo señala que el 70% de pacientes recibieron el tratamiento dentro de las primeras seis horas del accidente, siendo un excelente resultado en comparación de lo registrado en un hospital de Medellín, donde el 71% de afectados recibieron el antiofídico luego de seis horas del accidente. Esto sería una posible razón por la cual el reporte de víctimas mortales es nulo y la incidencia de complicaciones y secuelas posteriores al egreso es baja [13].

La información obtenida en el análisis del uso del antiveneno indica la alta eficiencia del fármaco importado. Sin embargo, el número de dosis se debe considerar especialmente

debido a las implicaciones clínicas y económicas. Esta situación puede ser solventada al modificar el esquema de elección de inmunógenos para la producción del antiveneno [35], por ejemplo incluyendo en la mezcla el veneno de *B. atrox*. Otro punto a considerar es que para la producción del Polival-ICP, el veneno de *Crotalus simus* es incluido en el pool empleado para la inmunización en caballos [18]. La incorporación de muestras de esta especie es relevante en Costa Rica, en donde se considera de importancia clínica [78]. Sin embargo, ninguna especie del género *Crotalus* ha sido reportada en Ecuador [45]. Además, una investigación de Arroyo et al. [128] demostró que la adición de inmunógenos provenientes de *C. simus* no aportan en la reactividad y eficiencia ante un envenenamiento bothrópico. Esto sugiere que incluir el veneno crotálico en la etapa de inmunogenización no sería crucial, en relación a la eficiencia de las inmunoglobulinas heterólogas en casos de ofidismo en la Amazonía ecuatoriana. Esta información debe ser considerada y evaluada en el caso de retomar la producción de antiveneno en Ecuador en el futuro.

CAPÍTULO V: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

La caracterización de venenos de individuos de *B. atrox* de la Amazonía ecuatoriana evidenció la presencia de variaciones intraespecíficas e individuales relevantes. A nivel bioquímico, se identificó que las SVMs son las enzimas de mayor concentración en todos los venenos. La principal diferencia entre las muestras fue la abundancia de isoformas de estas toxinas, especialmente al comparar su presencia entre diferentes localidades. En los ensayos enzimáticos, se identificaron variaciones a nivel individual, incluso en los venenos colectados en la misma zona. Sin embargo, estas fluctuaciones en las actividades biológicas fueron notables solamente al compararlas con respecto a las localidades, señalando la presencia de adaptaciones funcionales al hábitat de las serpientes. Por otra parte, se identificó que el Polival-ICP es efectivo en ensayos de laboratorio y en el tratamiento para víctimas humanas de envenenamiento. La diferencia de actividades toxicológicas en modelos animales es consecuente con las variaciones en las manifestaciones clínicas en pacientes de ofidismo por *B. atrox*. Sin embargo, se requieren de altas dosis del fármaco, lo que podría ser mejorado al incluir el veneno de *B. atrox* en la mezcla de inmunógenos empleada para su producción.

A futuro será importante llevar a cabo la identificación de las fracciones colectadas por LC-MS/MS con el fin de caracterizar la composición y porcentaje de las principales familias de toxinas en los venenos estudiados para complementar la información que se obtuvo en el presente trabajo. Además, se podría ampliar el estudio incluyendo muestras de veneno tomadas en las provincias de la Amazonía que no fueron incluidas en la recolección. Debido a la importancia clínica de los resultados hallados en este trabajo, es necesario continuar con la caracterización de venenos de relevancia y la verificación de datos epidemiológicos para así aportar a la mitigación de los problemas de salud, sociales y económicos generados por el ofidismo, una enfermedad tropical desatendida.

REFERENCIAS

1. Markland FS. Snake venoms. *Drugs*. 1997;54(3):1-10. doi: 10.2165/00003495-199700543-00003.
2. Lu Q, Clemetson JM, Clemetson KJ. Snake venoms and hemostasis. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 2005;3(8):1791-9. doi: 10.1111/j.1538-7836.2005.01358.x.
3. Almeida JR, Resende LM, Watanabe RK, Carregari VC, Huancahuire-Vega S, da SCCA, et al. Snake venom peptides and low mass proteins: molecular tools and therapeutic agents. *Current Medicinal Chemistry*. 2017;24(30):3254-82. Epub 2016/11/03. doi: 10.2174/0929867323666161028155611. PubMed PMID: 27804880.
4. Chippaux J-P, Williams V, White J. Snake venom variability: methods of study, results and interpretation. *Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology*. 1991;29(11):1279-303.
5. Casewell NR, Wüster W, Vonk FJ, Harrison RA, Fry BG. Complex cocktails: the evolutionary novelty of venoms. *Trends in Ecology & Evolution*. 2013;28(4):219-29. doi: <https://doi.org/10.1016/j.tree.2012.10.020>.
6. Fry BG, Roelants K, Champagne DE, Scheib H, Tyndall JD, King GF, et al. The toxicogenomic multiverse: convergent recruitment of proteins into animal venoms. *Annual review of genomics and human genetics*. 2009;10:483-511. Epub 2009/07/31. doi: 10.1146/annurev.genom.9.081307.164356. PubMed PMID: 19640225.
7. Calvete JJ. Proteomic tools against the neglected pathology of snake bite envenoming. *Expert review of proteomics*. 2011;8(6):739-58. Epub 2011/11/18. doi: 10.1586/epr.11.61. PubMed PMID: 22087658.
8. Fry BG, Vidal N, Norman JA, Vonk FJ, Scheib H, Ramjan SFR, et al. Early evolution of the venom system in lizards and snakes. *Nature*. 2006;439(7076):584-8. doi: 10.1038/nature04328.
9. Vonk FJ, Admiraal JF, Jackson K, Reshef R, de Bakker MAG, Vanderschoot K, et al. Evolutionary origin and development of snake fangs. *Nature*. 2008;454(7204):630-3. doi: 10.1038/nature07178.
10. White J. Snake venoms and coagulopathy. *Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology*. 2005;45(8):951-67. doi: [10.1016/j.toxicon.2005.02.030](https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2005.02.030).

11. Montecucco C, Gutiérrez JM, Lomonte B. Cellular pathology induced by snake venom phospholipase A₂ myotoxins and neurotoxins: common aspects of their mechanisms of action. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2008;65(18):2897-912. doi: 10.1007/s00018-008-8113-3.
12. Gutiérrez JM, Calvete JJ, Habib AG, Harrison RA, Williams DJ, Warrell DA. Snakebite envenoming. *Nature Reviews Disease Primers*. 2017;3(1):17063. doi: 10.1038/nrdp.2017.63.
13. Williams DJ, Faiz MA, Abela-Ridder B, Ainsworth S, Bulfone TC, Nickerson AD, et al. Strategy for a globally coordinated response to a priority neglected tropical disease: Snakebite envenoming. *PLOS Neglected Tropical Diseases*. 2019;13(2):e0007059. doi: 10.1371/journal.pntd.0007059.
14. Chaves LF, Chuang T-W, Sasa M, Gutiérrez JM. Snakebites are associated with poverty, weather fluctuations, and El Niño. *Science Advances*. 2015;1(8):e1500249. doi: 10.1126/sciadv.1500249.
15. Chippaux J-P. Snakebite envenomation turns again into a neglected tropical disease! *Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases*. 2017;23(1):38. doi: 10.1186/s40409-017-0127-6.
16. Harrison RA, Hargreaves A, Wagstaff SC, Faragher B, Laloo DG. Snake envenoming: a disease of poverty. *PLoS neglected tropical diseases*. 2009;3(12):e569-e. doi: 10.1371/journal.pntd.0000569. PubMed PMID: 20027216.
17. Brenes-Chacón H, Gutiérrez JM, Camacho-Badilla K, Soriano-Fallas A, Ulloa-Gutierrez R, Valverde-Muñoz K, et al. Snakebite envenoming in children: A neglected tropical disease in a Costa Rican pediatric tertiary care center. *Acta Tropica*. 2019;200:105176. doi: <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2019.105176>.
18. Calvete JJ, Sanz L, Perez A, Borges A, Vargas AM, Lomonte B, et al. Snake population venomomics and antivenomics of *Bothrops atrox*: Paedomorphism along its transamazonian dispersal and implications of geographic venom variability on snakebite management. *Journal of proteomics*. 2011;74(4):510-27. Epub 2011/02/01. doi: 10.1016/j.jprot.2011.01.003. PubMed PMID: 21278006.
19. Gutiérrez JM. Snakebite Envenoming in Latin America and the Caribbean. In: Vogel C-W, Seifert SA, Tambourgi DV, editors. *Clinical Toxinology in Australia, Europe, and Americas*. Dordrecht: Springer Netherlands; 2018. p. 51-72.

20. Ministerio de Salud Pública. Manejo clínico de pacientes con mordeduras de serpientes venenosas y picaduras de escorpiones. Protocolo basado en la evidencia. Primera ed. Quito: Dirección Nacional de Prevención y Control y Dirección de Normatización; 2017.
21. Gutierrez JM, Sanz L, Flores-Diaz M, Figueroa L, Madrigal M, Herrera M, et al. Impact of regional variation in *Bothrops asper* snake venom on the design of antivenoms: integrating antivenomics and neutralization approaches. *Journal of proteome research*. 2010;9(1):564-77. Epub 2009/11/17. doi: 10.1021/pr9009518. PubMed PMID: 19911849.
22. Dart RC, McNally J. Efficacy, safety, and use of snake antivenoms in the United States. *Annals of Emergency Medicine*. 2001;37(2):181-8. doi: [10.1067/mem.2001.113372](https://doi.org/10.1067/mem.2001.113372).
23. Habib AG, Brown NI. The snakebite problem and antivenom crisis from a health-economic perspective. *Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology*. 2018;150:115-23. doi: <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2018.05.009>.
24. Queiroz GP, Pessoa LA, Portaro FC, Furtado M. de F, Tambourgi DV. Interspecific variation in venom composition and toxicity of Brazilian snakes from *Bothrops* genus. *Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology*. 2008;52(8):842-51. Epub 2008/11/06. doi: 10.1016/j.toxicon.2008.10.002. PubMed PMID: 18983867.
25. Alape-Giron A, Sanz L, Escolano J, Flores-Diaz M, Madrigal M, Sasa M, et al. Snake venomomics of the lancehead pitviper *Bothrops asper*: geographic, individual, and ontogenetic variations. *Journal of proteome research*. 2008;7(8):3556-71. Epub 2008/06/19. doi: 10.1021/pr800332p. PubMed PMID: 18557640.
26. Fry BG, Winkel KD, Wickramaratna JC, Hodgson WC, Wüster W. Effectiveness of snake antivenom: species and regional venom variation and its clinical impact. *Journal of Toxicology: Toxin Reviews*. 2003;22(1):23-34. doi: 10.1081/TXR-120019018.
27. Alape-Giron A, Flores-Diaz M, Sanz L, Madrigal M, Escolano J, Sasa M, et al. Studies on the venom proteome of *Bothrops asper*: perspectives and applications. *Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology*. 2009;54(7):938-48. Epub 2009/06/23. doi: 10.1016/j.toxicon.2009.06.011. PubMed PMID: 19539636.
28. Guercio RA, Shevchenko A, Shevchenko A, Lopez-Lozano JL, Paba J, Sousa MV, et al. Ontogenetic variations in the venom proteome of the Amazonian snake *Bothrops atrox*. *Proteome science*. 2006;4:11. Epub 2006/05/13. doi: 10.1186/1477-5956-4-11. PubMed PMID: 16689994; PubMed Central PMCID: PMC1483819.

29. Chang HC, Tsai TS, Tsai IH. Functional proteomic approach to discover geographic variations of king cobra venoms from Southeast Asia and China. *Journal of proteomics*. 2013;89:141-53. Epub 2013/06/26. doi: 10.1016/j.jprot.2013.06.012. PubMed PMID: 23796489.
30. Gibbs HL, Sanz L, Sovic MG, Calvete JJ. Phylogeny-Based Comparative Analysis of Venom Proteome Variation in a Clade of Rattlesnakes (*Sistrurus* sp.). *PLOS ONE*. 2013;8(6):e67220. doi: 10.1371/journal.pone.0067220.
31. Casewell NR, Wagstaff SC, Wüster W, Cook DAN, Bolton FMS, King SI, et al. Medically important differences in snake venom composition are dictated by distinct postgenomic mechanisms. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2014;111(25):9205-10. doi: 10.1073/pnas.1405484111.
32. Nunez V, Cid P, Sanz L, De La Torre P, Angulo Y, Lomonte B, et al. Snake venomomics and antivenomics of *Bothrops atrox* venoms from Colombia and the Amazon regions of Brazil, Peru and Ecuador suggest the occurrence of geographic variation of venom phenotype by a trend towards paedomorphism. *Journal of proteomics*. 2009;73(1):57-78. Epub 2009/08/12. doi: 10.1016/j.jprot.2009.07.013. PubMed PMID: 19665598.
33. Oliveira IS, Cardoso IA, Bordon KCF, Carone SEI, Boldrini-Franca J, Pucca MB, et al. Global proteomic and functional analysis of *Crotalus durissus collilineatus* individual venom variation and its impact on envenoming. *Journal of proteomics*. 2019;191:153-65. Epub 2018/02/21. doi: 10.1016/j.jprot.2018.02.020. PubMed PMID: 29462664.
34. Aguiar WdS, Galizio NdC, Serino-Silva C, Sant'Anna SS, Grego KF, Tashima AK, et al. Comparative compositional and functional analyses of *Bothrops moojeni* specimens reveal several individual variations. *PLOS ONE*. 2019;14(9):e0222206. doi: 10.1371/journal.pone.0222206.
35. Gutiérrez JM, León G, Burnouf T. Antivenoms for the treatment of snakebite envenomings: The road ahead. *Biologicals*. 2011;39(3):129-42. doi: <https://doi.org/10.1016/j.biologicals.2011.02.005>.
36. Khobrani M, Huckleberry Y, Boesen KJ, Aljabri A, Alharthi M, Patanwala AE. Incidence of allergic reactions to Crotalidae polyvalent immune Fab. *Clinical Toxicology*. 2019;57(3):164-7. doi: 10.1080/15563650.2018.1504956.
37. Furtado Mde F, Cardoso ST, Soares OE, Pereira AP, Fernandes DS, Tambourgi DV, et al. Antigenic cross-reactivity and immunogenicity of *Bothrops* venoms from snakes of the

Amazon region. *Toxicon* : official journal of the International Society on Toxinology. 2010;55(4):881-7. Epub 2009/12/29. doi: 10.1016/j.toxicon.2009.12.014. PubMed PMID: 20036275.

38. Ainsworth S, Slagboom J, Alomran N, Pla D, Alhamdi Y, King SI, et al. The paraspecific neutralisation of snake venom induced coagulopathy by antivenoms. *Communications Biology*. 2018;1(1):34. doi: 10.1038/s42003-018-0039-1.

39. Laines J, Segura A, Villalta M, Herrera M, Vargas M, Alvarez G, et al. Toxicity of *Bothrops sp* snake venoms from Ecuador and preclinical assessment of the neutralizing efficacy of a polyspecific antivenom from Costa Rica. *Toxicon* : official journal of the International Society on Toxinology. 2014;88:34-7. Epub 2014/06/21. doi: 10.1016/j.toxicon.2014.06.008. PubMed PMID: 24950051.

40. Smalligan R, Cole J, Brito N, Laing GD, Mertz BL, Manock S, et al. Crotaline snake bite in the Ecuadorian Amazon: randomised double blind comparative trial of three South American polyspecific antivenoms. *BMJ*. 2004;329(7475):1129-. doi: 10.1136/bmj.329.7475.1129. PubMed PMID: 15539665.

41. Campbell JA, Lamar WW, Brodie ED. *The venomous reptiles of the Western Hemisphere*: Comstock Pub. Associates Ithaca [NY]; 2004.

42. Torres-Carvajal O, Pazmiño-Otamendi G, Salazar-Valenzuela D. Reptiles of Ecuador: a resource-rich portal, with a dynamic checklist and photographic guides. *Amphibian & Reptile Conservation*. 2019;13(1):209-29.

43. Fan HW, Natal Vigilato MA, Augusto Pompei JC, Gutiérrez JM, en representación de la Red de Laboratorios Públicos Productores de Antivenenos de América L. Situation of public laboratories manufacturing antivenoms in Latin America. *Rev Panam Salud Publica*. 2019;43:e92-e. doi: 10.26633/RPSP.2019.92. PubMed PMID: 31772565.

44. Gonzalez-Andrade F, Chippaux JP. Snake bite envenomation in Ecuador. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 2010;104(9):588-91. Epub 2010/08/17. doi: 10.1016/j.trstmh.2010.05.006. PubMed PMID: 20708124.

45. Valencia JH, Garzón-Tello K, Barragán-Paladines ME, Oxford P. *Serpientes venenosas del Ecuador: sistemática, taxonomía, historia natural, conservación, envenenamiento y aspectos antropológicos*: Fundación Herpetológica Gustavo Orcés; 2016.

46. Yañez-Arenas C, Díaz-Gamboa L, Patrón-Rivero C, López-Reyes K, Chiappa-Carrara X. Estimating geographic patterns of ophidism risk in Ecuador. *Neotropical Biodiversity*. 2018;4(1):55-61. doi: 10.1080/23766808.2018.1454762.
47. Amazonas DR, Freitas-de-Sousa LA, Orefice DP, Sousa LFd, Martinez MG, Mourão RHV, et al. Evidence for snake venom plasticity in a long-term study with individual captive *Bothrops atrox*. *Toxins (Basel)*. 2019;11(5):294. doi: 10.3390/toxins11050294. PubMed PMID: 31137619.
48. Lopez-Lozano JL, de Sousa MV, Ricart CA, Chavez-Olortegui C, Flores Sanchez E, Muniz EG, et al. Ontogenetic variation of metalloproteinases and plasma coagulant activity in venoms of wild *Bothrops atrox* specimens from Amazonian rain forest. *Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology*. 2002;40(7):997-1006. Epub 2002/06/22. doi: 10.1016/s0041-0101(02)00096-x. PubMed PMID: 12076654.
49. Bernal JCC, Bisneto PF, Pereira JPT, Ibiapina H, Sarraff LKS, Monteiro-Junior C, et al. "Bad things come in small packages": predicting venom-induced coagulopathy in *Bothrops atrox* bites using snake ontogenetic parameters. *Clinical toxicology (Philadelphia, Pa)*. 2019:1-9. Epub 2019/08/08. doi: 10.1080/15563650.2019.1648817. PubMed PMID: 31387401.
50. Salazar AM, Rodriguez-Acosta A, Giron ME, Aguilar I, Guerrero B. A comparative analysis of the clotting and fibrinolytic activities of the snake venom (*Bothrops atrox*) from different geographical areas in Venezuela. *Thrombosis research*. 2007;120(1):95-104. Epub 2006/10/19. doi: 10.1016/j.thromres.2006.07.004. PubMed PMID: 17045631.
51. Theakston RD, Laing GD, Fielding CM, Lascano AF, Touzet JM, Vallejo F, et al. Treatment of snake bites by *Bothrops* species and *Lachesis muta* in Ecuador: laboratory screening of candidate antivenoms. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 1995;89(5):550-4. Epub 1995/09/01. doi: 10.1016/0035-9203(95)90105-1. PubMed PMID: 8560538.
52. Almeida JR, Mendes B, Patiño RSP, Pico J, Laines J, Terán M, et al. Assessing the stability of historical and desiccated snake venoms from a medically important Ecuadorian collection. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*. 2020;230:108702. doi: <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2020.108702>.
53. Sousa LF, Portes-Junior JA, Nicolau CA, Bernardoni JL, Nishiyama MY, Jr., Amazonas DR, et al. Functional proteomic analyses of *Bothrops atrox* venom reveals phenotypes

associated with habitat variation in the Amazon. *Journal of proteomics*. 2017;159:32-46. Epub 2017/03/10. doi: 10.1016/j.jprot.2017.03.003. PubMed PMID: 28274896.

54. Moretto Del-Rei TH, Sousa LF, Rocha MMT, Freitas-de-Sousa LA, Travaglia-Cardoso SR, Grego K, et al. Functional variability of *Bothrops atrox* venoms from three distinct areas across the Brazilian Amazon and consequences for human envenomings. *Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology*. 2019;164:61-70. Epub 2019/04/17. doi: 10.1016/j.toxicon.2019.04.001. PubMed PMID: 30991062.

55. Chippaux JP. Incidence and mortality due to snakebite in the Americas. *PLoS Negl Trop Dis*. 2017;11(6):e0005662. Epub 2017/06/22. doi: 10.1371/journal.pntd.0005662. PubMed PMID: 28636631; PubMed Central PMCID: PMC5495519.

56. The Lancet. Snake-bite envenoming: a priority neglected tropical disease. *The Lancet*. 2017;390(10089):2. doi: 10.1016/S0140-6736(17)31751-8.

57. Santos Barreto GNL, de Oliveira SS, dos Anjos IV, Chalkidis HdM, Mourão RHV, Moura-da-Silva AM, et al. Experimental *Bothrops atrox* envenomation: Efficacy of antivenom therapy and the combination of *Bothrops* antivenom with dexamethasone. *PLOS Neglected Tropical Diseases*. 2017;11(3):e0005458. doi: 10.1371/journal.pntd.0005458.

58. Resiere D, Villalta M, Arias AS, Kallel H, Nèvière R, Vidal N, et al. Snakebite envenoming in French Guiana: Assessment of the preclinical efficacy against the venom of *Bothrops atrox* of two polyspecific antivenoms. *Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology*. 2020;173:1-4. doi: <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2019.11.001>.

59. Gutiérrez JM, Solano G, Pla D, Herrera M, Segura Á, Villalta M, et al. Assessing the preclinical efficacy of antivenoms: From the lethality neutralization assay to antivenomics. *Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology*. 2013;69:168-79. doi: <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2012.11.016>.

60. Chuang P-C, Chang K-W, Cheng F-J, Wu M-H, Tsai M-T, Li C-J. Risk factors associated with snake antivenom reaction and the role of skin test. *Acta Tropica*. 2020;203:105293. doi: <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2019.105293>.

61. Otero R, Gutiérrez J, Beatriz Mesa M, Duque E, Rodríguez O, Luis Arango J, et al. Complications of *Bothrops*, *Porthidium*, and *Bothriechis* snakebites in Colombia. A clinical and epidemiological study of 39 cases attended in a university hospital. *Toxicon : official*

journal of the International Society on Toxinology. 2002;40(8):1107-14. doi: 10.1016/s0041-0101(02)00104-6. PubMed PMID: 12165312.

62. Salazar-Valenzuela D, Mora-Obando D, Fernandez ML, Loaiza-Lange A, Gibbs HL, Lomonte B. Proteomic and toxicological profiling of the venom of *Bothrocophias campbelli*, a pitviper species from Ecuador and Colombia. *Toxicon* : official journal of the International Society on Toxinology. 2014;90:15-25. Epub 2014/08/06. doi: 10.1016/j.toxicon.2014.07.012. PubMed PMID: 25091349.

63. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970;227(5259):680-5. Epub 1970/08/15. doi: 10.1038/227680a0. PubMed PMID: 5432063.

64. Almeida JR, Lancellotti M, Soares AM, Calderon LA, Ramírez D, González W, et al. CoaTx-II, a new dimeric Lys49 phospholipase A₂ from *Crotalus oreganus abyssus* snake venom with bactericidal potential: Insights into its structure and biological roles. *Toxicon* : official journal of the International Society on Toxinology. 2016;120:147-58. doi: <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2016.08.007>.

65. Lomonte B, Gutiérrez JM. Proteolytic activity of snake venoms of Costa Rica on casein. *Rev Biol Trop*. 1983;31(1):37-40. PubMed PMID: 6364267.

66. Holzer M, Mackessy SP. An aqueous endpoint assay of snake venom phospholipase A₂. *Toxicon* : official journal of the International Society on Toxinology. 1996;34(10):1149-55. Epub 1996/10/01. doi: 10.1016/0041-0101(96)00057-8. PubMed PMID: 8931255.

67. Resende LM, Almeida JR, Schezaro-Ramos R, Collaço RCO, Simioni LR, Ramírez D, et al. Exploring and understanding the functional role, and biochemical and structural characteristics of an acidic phospholipase A₂, AplTx-I, purified from *Agkistrodon piscivorus leucostoma* snake venom. *Toxicon* : official journal of the International Society on Toxinology. 2017;127:22-36. doi: <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2017.01.002>.

68. Munekiyo SM, Mackessy SP. Effects of temperature and storage conditions on the electrophoretic, toxic and enzymatic stability of venom components. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*. 1998;119(1):119-27. doi: [https://doi.org/10.1016/S0305-0491\(97\)00294-0](https://doi.org/10.1016/S0305-0491(97)00294-0).

69. Ghorbanpur M, Zare Mirakabadi A, Zokae F, Zolfagarrian H. Identification and partial purification of an anticoagulant factor from the venom of the Iranian snake

Agkistrodon halys. Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases. 2010;16:96-106.

70. National Research Council Committee for the Update of the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. The National Academies Collection: Reports funded by National Institutes of Health. In: *th*, editor. Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. Washington (DC): National Academies Press (US) National Academy of Sciences.; 2011.

71. Kondo H, Kondo S, Ikezawa H, Murata R. Studies on the quantitative method for determination of hemorrhagic activity of Habu snake venom. Japanese journal of medical science & biology. 1960;13:43-52. Epub 1960/01/01. doi: 10.7883/yoken1952.13.43. PubMed PMID: 13853435.

72. Lomonte B, Tarkowski A, Hanson LA. Host response to *Bothrops asper* snake venom. Analysis of edema formation, inflammatory cells, and cytokine release in a mouse model. Inflammation. 1993;17(2):93-105. Epub 1993/04/01. doi: 10.1007/bf00916097. PubMed PMID: 8491517.

73. León G, Valverde JM, Rojas G, Lomonte B, Gutiérrez JMa. Comparative study on the ability of IgG and Fab sheep antivenoms to neutralize local hemorrhage, edema and myonecrosis induced by *Bothrops asper* (terciopelo) snake venom. Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology. 2000;38(2):233-44. doi: [https://doi.org/10.1016/S0041-0101\(99\)00152-X](https://doi.org/10.1016/S0041-0101(99)00152-X).

74. María José S-S, Diana M-O, Jhon Jairo C, Jimmy Alexander G-V, Santiago A-G. Accidente ofídico en el departamento de Nariño, Colombia: análisis retrospectivo, 2008-2017. Biomédica. 2019;39(4). doi: 10.7705/biomedica.4830.

75. Sant'Ana Malaque CM, Gutiérrez JM. Snakebite envenomation in Central and South America. In: Brent J, Burkhart K, Dargan P, Hatten B, Megarbane B, Palmer R, editors. Critical Care Toxicology. Cham: Springer International Publishing; 2016. p. 1-22.

76. Mora-Obando D, Guerrero-Vargas JA, Prieto-Sánchez R, Beltrán J, Rucavado A, Sasa M, et al. Proteomic and functional profiling of the venom of *Bothrops ayerbei* from Cauca, Colombia, reveals striking interspecific variation with *Bothrops asper* venom. Journal of proteomics. 2014;96:159-72. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2013.11.005>.

77. Lomonte B, Calvete JJ. Strategies in 'snake venomomics' aiming at an integrative view of compositional, functional, and immunological characteristics of venoms. J Venom Anim

Toxins Incl Trop Dis. 2017;23:26-. doi: 10.1186/s40409-017-0117-8. PubMed PMID: 28465677.

78. Calvete JJ, Sanz L, Cid P, de la Torre P, Flores-Díaz M, Dos Santos MC, et al. Snake venomomics of the Central American Rattlesnake *Crotalus simus* and the South American *Crotalus durissus* complex points to neurotoxicity as an adaptive paedomorphic trend along *Crotalus* dispersal in South America. *Journal of Proteome Research*. 2010;9(1):528-44. doi: 10.1021/pr9008749.

79. Andrade DV, Abe AS. Relationship of venom ontogeny and diet in *Bothrops*. *Herpetologica*. 1999;55(2):200-4.

80. Sousa LF, Zdenek CN, Dobson JS, Op den Brouw B, Coimbra FCP, Gillett A, et al. Coagulotoxicity of *Bothrops* (Lancehead Pit-Vipers) venoms from Brazil: Differential biochemistry and antivenom efficacy resulting from prey-driven venom variation. *Toxins (Basel)*. 2018;10(10):411. PubMed PMID: doi:10.3390/toxins10100411.

81. Taborska E, Kornalik F, editors. Individual variability of *Bothrops asper* venom. *Toxicon* : official journal of the International Society on Toxinology; 1985: Pergamon-Elsevier Science Ltd The Boulevard, Langford Lane, Kidlington

82. Matsui T, Fujimura Y, Titani K. Snake venom proteases affecting hemostasis and thrombosis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology*. 2000;1477(1):146-56. doi: [https://doi.org/10.1016/S0167-4838\(99\)00268-X](https://doi.org/10.1016/S0167-4838(99)00268-X).

83. Sousa JRF, Monteiro RQ, Castro HC, Zingali RB. Proteolytic action of *Bothrops jararaca* venom upon its own constituents. *Toxicon* : official journal of the International Society on Toxinology. 2001;39(6):787-92. doi: [https://doi.org/10.1016/S0041-0101\(00\)00208-7](https://doi.org/10.1016/S0041-0101(00)00208-7).

84. Almeida JR, Palacios ALV, Patino RSP, Mendes B, Teixeira CAS, Gomes P, et al. Harnessing snake venom phospholipases A₂ to novel approaches for overcoming antibiotic resistance. *Drug development research*. 2019;80(1):68-85. Epub 2018/09/27. doi: 10.1002/ddr.21456. PubMed PMID: 30255943.

85. Lomonte B, Angulo Y, Moreno E. Synthetic peptides derived from the C-terminal region of Lys49 phospholipase A₂ homologues from viperidae snake venoms: Biomimetic activities and potential applications. *Current Pharmaceutical Design*. 2010;16(28):3224-30. doi: 10.2174/138161210793292456.

86. Manjunatha Kini R. Excitement ahead: structure, function and mechanism of snake venom phospholipase A₂ enzymes. *Toxicon* : official journal of the International Society on Toxinology. 2003;42(8):827-40. doi: <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2003.11.002>.
87. Gutiérrez JM, Lomonte B, León G, Alape-Girón A, Flores-Díaz M, Sanz L, et al. Snake venomomics and antivenomics: Proteomic tools in the design and control of antivenoms for the treatment of snakebite envenoming. *Journal of proteomics*. 2009;72(2):165-82. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2009.01.008>.
88. Macêdo JKA, Fox JW. Biological activities and assays of the snake venom metalloproteinases (SVMPs). In: Gopalakrishnakone P, Calvete JJ, editors. *Venom Genomics and Proteomics*. Dordrecht: Springer Netherlands; 2016. p. 211-38.
89. Serrano SMT, Maroun RC. Snake venom serine proteinases: sequence homology vs. substrate specificity, a paradox to be solved. *Toxicon* : official journal of the International Society on Toxinology. 2005;45(8):1115-32. doi: [10.1016/j.toxicon.2005.02.020](https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2005.02.020).
90. Herrera C, Escalante T, Rucavado A, Gutiérrez JM. Hemorrhagic and procoagulant P-III snake venom metalloproteinases differ in their binding to the microvasculature of mouse cremaster muscle. *Toxicon* : official journal of the International Society on Toxinology. 2020;178:1-3. doi: <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2020.02.011>.
91. Preciado LM, Pereañez JA, Comer J. Potential of matrix metalloproteinase inhibitors for the treatment of local tissue damage induced by a type P-I snake venom metalloproteinase. *Toxins (Basel)*. 2019;12(1):8. PubMed PMID: doi:10.3390/toxins12010008.
92. Baldo C, Tanjoni I, León IR, Batista IFC, Della-Casa MS, Clissa PB, et al. BnP1, a novel P-I metalloproteinase from *Bothrops neuwiedi* venom: Biological effects benchmarking relatively to jararhagin, a P-III SVMP. *Toxicon* : official journal of the International Society on Toxinology. 2008;51(1):54-65. doi: <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2007.08.005>.
93. Herrera C, Escalante T, Voisin M-B, Rucavado A, Morazán D, Macêdo JKA, et al. Tissue localization and extracellular matrix degradation by PI, PII and PIII snake venom metalloproteinases: clues on the mechanisms of venom-induced hemorrhage. *PLoS neglected tropical diseases*. 2015;9(4):e0003731-e. doi: 10.1371/journal.pntd.0003731. PubMed PMID: 25909592.
94. Freitas-de-Sousa LA, Colombini M, Lopes-Ferreira M, Serrano SMT, Moura-da-Silva AM. Insights into the mechanisms involved in strong hemorrhage and dermonecrosis

Induced by Atroxlysin-Ia, a PI-Class snake venom metalloproteinase. *Toxins (Basel)*. 2017;9(8):239. PubMed PMID: doi:10.3390/toxins9080239.

95. Echeverría S, Leiguez E, Guijas C, do Nascimento NG, Acosta O, Teixeira C, et al. Evaluation of pro-inflammatory events induced by *Bothrops alternatus* snake venom. *Chemico-Biological Interactions*. 2018;281:24-31. doi: [10.1016/j.cbi.2017.12.022](https://doi.org/10.1016/j.cbi.2017.12.022).

96. Ibiapina HNS, Costa AG, Sachett JAG, Silva IM, Tarragô AM, Neves JCF, et al. An Immunological stairway to severe tissue complication assembly in *Bothrops atrox* snakebites. *Frontiers in Immunology*. 2019;10(1882). doi: 10.3389/fimmu.2019.01882.

97. Menaldo DL, Bernardes CP, Jacob-Ferreira AL, Nogueira-Santos CG, Casare-Ogasawara TM, Pereira-Crott LS, et al. Effects of *Bothrops atrox* venom and two isolated toxins on the human complement system: Modulation of pathways and generation of anaphylatoxins. *Molecular immunology*. 2016;80:91-100. Epub 2016/11/16. doi: 10.1016/j.molimm.2016.10.015. PubMed PMID: 27846429.

98. Gutierrez JM, Solano G, Pla D, Herrera M, Segura A, Vargas M, et al. Preclinical evaluation of the efficacy of antivenoms for snakebite envenoming: State-of-the-Art and challenges ahead. *Toxins (Basel)*. 2017;9(5). Epub 2017/05/16. doi: 10.3390/toxins9050163. PubMed PMID: 28505100; PubMed Central PMCID: PMC5450711.

99. Gutiérrez JM, Alberto Ponce-Soto L, Marangoni S, Lomonte B. Systemic and local myotoxicity induced by snake venom group II phospholipases A₂: Comparison between crotoxin, crotoxin B and a Lys49 PLA₂ homologue. *Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology*. 2008;51(1):80-92. doi: <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2007.08.007>.

100. Gutiérrez JMa, Ownby CL. Skeletal muscle degeneration induced by venom phospholipases A₂: insights into the mechanisms of local and systemic myotoxicity. *Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology*. 2003;42(8):915-31. doi: <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2003.11.005>.

101. Chacon F, Oviedo A, Escalante T, Solano G, Rucavado A, Gutierrez JM. The lethality test used for estimating the potency of antivenoms against *Bothrops asper* snake venom: pathophysiological mechanisms, prophylactic analgesia, and a surrogate in vitro assay. *Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology*. 2015;93:41-50. Epub 2014/12/03. doi: 10.1016/j.toxicon.2014.11.223. PubMed PMID: 25447772.

102. Rucavado A, Escalante T, Gutiérrez JMa. Effect of the metalloproteinase inhibitor batimastat in the systemic toxicity induced by *Bothrops asper* snake venom: understanding the role of metalloproteinases in envenomation. *Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology*. 2004;43(4):417-24. doi: [10.1016/j.toxicon.2004.01.016](https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2004.01.016).
103. Ferreira ML, Moura-da-Silva AM, Franca F, Cardoso J, Mota I. Toxic activities of venoms from nine *Bothrops* species and their correlation with lethality and necrosis. *Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology*. 1992;30(12):1603-8.
104. Bernardoni JL, Sousa LF, Wermelinger LS, Lopes AS, Prezoto BC, Serrano SMT, et al. Functional variability of snake venom metalloproteinases: adaptive advantages in targeting different prey and implications for human envenomation. *PloS one*. 2014;9(10):e109651-e. doi: 10.1371/journal.pone.0109651. PubMed PMID: 25313513.
105. Furtado MFD, Travaglia-Cardoso SR, Rocha MMT. Sexual dimorphism in venom of *Bothrops jararaca* (Serpentes: Viperidae). *Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology*. 2006;48(4):401-10. doi: [10.1016/j.toxicon.2006.06.005](https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2006.06.005).
106. Pico G, Chacur M, Gutiérrez JM, Teixeira CFP, Cury Y. Evaluation of antivenoms in the neutralization of hyperalgesia and edema induced by *Bothrops jararaca* and *Bothrops asper* snake venoms. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 2002;35:1221-8.
107. Instituto Clodomiro Picado. Determinación de actividades tóxicas de venenos de serpientes y su neutralización por antivenenos: manual de métodos de laboratorio. Instituto Clodomiro Picado San José; 2008.
108. Gutierrez JM, Lomonte B, Sanz L, Calvete JJ, Pla D. Immunological profile of antivenoms: preclinical analysis of the efficacy of a polyspecific antivenom through antivenomics and neutralization assays. *Journal of proteomics*. 2014;105:340-50. Epub 2014/03/04. doi: 10.1016/j.jprot.2014.02.021. PubMed PMID: 24583507.
109. Zipkin EF, DiRenzo GV, Ray JM, Rossman S, Lips KR. Tropical snake diversity collapses after widespread amphibian loss. *Science*. 2020;367(6479):814-6. doi: 10.1126/science.aay5733.
110. Andrade-Díaz MS, Sarquis JA, Loisele BA, Giraudo AR, Díaz-Gómez JM. Expansion of the agricultural frontier in the largest South American Dry Forest: Identifying priority conservation areas for snakes before everything is lost. *PloS one*. 2019;14(9):e0221901-e. doi: 10.1371/journal.pone.0221901. PubMed PMID: 31504037.

111. Rincón-Aranguri M, Urbina-Cardona N, Galeano SP, Bock BC, Páez VP. Road kill of snakes on a highway in an Orinoco ecosystem: Landscape factors and species traits related to their mortality. *Tropical Conservation Science*. 2019;12:1940082919830832. doi: 10.1177/1940082919830832.
112. Praba-Egge AD, Cone SW, Araim O, Freire I, Paida G, Escalante J, et al. Snakebites in the rainforests of Ecuador. *World journal of surgery*. 2003;27(2):234-40. Epub 2003/03/05. doi: 10.1007/s00268-002-6552-9. PubMed PMID: 12616443.
113. Bucarety F, Hyslop S, Mello SM, Vieira RJ. *Bothrops* snakebite on the head: case report and review of the literature. *Annals of Tropical Medicine & Parasitology*. 2007;101(8):733-43. doi: 10.1179/136485907X241370.
114. Otero-Patiño R. Snake bites in Colombia. *Clin Toxinol*. 2014:41-2.
115. Dias da Silva W, V. Tambourgi D. The humoral immune response induced by snake venom toxins. *Inflammation & Allergy - Drug Targets (Formerly Current Drug Targets - Inflammation & Allergy)*. 2011;10(5):343-57. doi: 10.2174/187152811797200623.
116. Chaves F, Barboza M, Gutiérrez J. Pharmacological study of edema induced by venom of the snake *Bothrops asper* (terciopelo) in mice. *Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology*. 1995;33(1):31-9. doi: [https://doi.org/10.1016/0041-0101\(94\)00135-U](https://doi.org/10.1016/0041-0101(94)00135-U).
117. Atul G, Sujatha S, Jaya G, Acharya NS, Subhash Chandra P. Wound infections secondary to snakebite. *The Journal of Infection in Developing Countries*. 2009;3(03). doi: 10.3855/jidc.39.
118. Jorge MT, Ribeiro LA, Da Silva MLR, Kusano EJU, de Mendonça JS. Microbiological studies of abscesses complicating *Bothrops* snakebite in humans: A prospective study. *Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology*. 1994;32(6):743-8. doi: [https://doi.org/10.1016/0041-0101\(94\)90343-3](https://doi.org/10.1016/0041-0101(94)90343-3).
119. Kerrigan KR. Bacteriology of Snakebite Abscess. *Tropical Doctor*. 1992;22(4):158-60. doi: 10.1177/004947559202200405.
120. Canas CA. Brainstem ischemic stroke after to *Bothrops atrox* snakebite. *Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology*. 2016;120:124-7. Epub 2016/08/17. doi: 10.1016/j.toxicon.2016.08.005. PubMed PMID: 27527269.

121. Voronov E, Apte M, Sofer S. The systemic inflammatory response syndrome related to the release of cytokines following severe envenomation. *Journal of Venomous Animals and Toxins*. 1999;5:5-33.
122. Albuquerque P, N. Jacinto C, Silva Junior GB, Lima JB, Veras MdSB, Daher EF. Acute kidney injury caused by crotalus and *Bothrops* snake venom: a review of epidemiology, clinical manifestations and treatment. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*. 2013;55:295-301.
123. Alves EC, Sachett JdAG, Sampaio VS, Sousa JDdB, Oliveira SSd, Nascimento EFd, et al. Predicting acute renal failure in *Bothrops* snakebite patients in a tertiary reference center, Western Brazilian Amazon. *PloS one*. 2018;13(8):e0202361-e. doi: 10.1371/journal.pone.0202361. PubMed PMID: 30118505.
124. Oliveira SS, Alves EC, Santos AS, Pereira JPT, Sarraff LKS, Nascimento EF, et al. Factors associated with systemic bleeding in *Bothrops* envenomation in a tertiary hospital in the Brazilian Amazon. *Toxins (Basel)*. 2019;11(1):22. PubMed PMID: doi:10.3390/toxins11010022.
125. Bucarechi F, Capitani Emd, Hyslop S, Mello SM, Madureira PR, Zanardi V, et al. Compartment syndrome after *Bothrops jararaca* snakebite: monitoring, treatment, and outcome. *Clinical Toxicology*. 2010;48(1):57-60. doi: 10.3109/15563650903356201.
126. Silva de Oliveira S, Campos Alves E, dos Santos Santos A, Freitas Nascimento E, Tavares Pereira JP, Mendonça da Silva I, et al. *Bothrops* snakebites in the Amazon: recovery from hemostatic disorders after Brazilian antivenom therapy. *Clinical Toxicology*. 2020;58(4):266-74. doi: 10.1080/15563650.2019.1634273.
127. Gutiérrez JM. Improving antivenom availability and accessibility: Science, technology, and beyond. *Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology*. 2012;60(4):676-87. doi: <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2012.02.008>.
128. Arroyo C, Solano S, Segura A, Herrera M, Estrada R, Villalta M, et al. Cross-reactivity and cross-immunomodulation between venoms of the snakes *Bothrops asper*, *Crotalus simus* and *Lachesis stenophrys*, and its effect in the production of polyspecific antivenom for Central America. *Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology*. 2017;138:43-8. Epub 2017/08/15. doi: 10.1016/j.toxicon.2017.08.009. PubMed PMID: 28803057.

