



UNIVERSIDAD REGIONAL AMAZÓNICA IKIAM

FACULTAD DE CIENCIAS DE LA VIDA

CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

**CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA Y ACTIVIDAD
TOXICOLÓGICA DEL VENENO DE SERPIENTE
BOTHRIECHIS SCHLEGELII DE ECUADOR**

Proyecto de investigación previo a la obtención del título de grado:

INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA

AUTOR: EUGENIO SEBASTIÁN ANDRADE ROLDÁN

TUTOR: PhD. CAROLINA DEL CARMEN PROAÑO BOLAÑOS

Napo-Ecuador

2023

DECLARACIÓN DE DERECHO DE AUTOR, AUTENTICIDAD Y RESPONSABILIDAD

Tena, 19 de septiembre de 2023

Yo, Eugenio Sebastián Andrade Roldán con documento de identidad N° 0106489487, 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,



Eugenio Sebastián Andrade Roldán

CERTIFICADO DE DIRECCIÓN DE TRABAJO DE INTEGRACIÓN CURRICULAR

Certifico que el trabajo de integración curricular titulado: “Caracterización bioquímica y actividad toxicológica del veneno de serpiente *Bothriechis schlegelii* de Ecuador”, en la modalidad de: proyecto de investigación en formato tesis fue realizado por: Eugenio Sebastián Andrade Roldan, 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, 19 de septiembre de 2023



Carolina del Carmen Proaño Bolaños

C.I: 1757448954



Firmado electrónicamente
por:
**JOSE RAFAEL
DEALMEIDA**

.....

José Rafael de Almeida

C.I: 1711099604

AUTORIZACIÓN DE PUBLICACIÓN EN EL REPOSITORIO INSTITUCIONAL

Yo, Eugenio Sebastián Andrade Roldán, con documento de identidad N° 0106489487, en calidad de autor y titular de los derechos morales y patrimoniales del trabajo de titulación: Caracterización bioquímica y actividad toxicológica del veneno de serpiente *Bothriechis schlegelii* de Ecuador. De conformidad con el Art. 114 del CÓDIGO ORGÁNICO DE LA ECONOMÍA SOCIAL DE LOS CONOCIMIENTOS, CREATIVIDAD E INNOVACIÓN, reconozco a favor de la Universidad Regional Amazónica Ikiam una licencia gratuita, intransferible y no exclusiva para el uso no comercial de la obra, con fines estrictamente académicos.

Así mismo, autorizo a la Universidad Regional Amazónica Ikiam para que realice la publicación de este trabajo de titulación en el Repositorio Institucional de conformidad a lo dispuesto en el Art. 144 de la Ley Orgánica de Educación superior.

Tena, 19 de septiembre de 2023



Eugenio Sebastián Andrade Roldán

0106489487

AGRADECIMIENTOS

A PhD. José Rafael de Almeida, por todo el conocimiento y la experiencia que me ha compartido como docente, tutor y amigo durante todo este proyecto.

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

A la Dra. María Terán y al INSPI por abrir sus puertas para colaborar en esta investigación.

Por último, pero no menos importante, también quiero reconocer a mi grupo de investigación por su valioso apoyo y colaboración en este trabajo. Que gracias a su retroalimentación, motivación y trabajo en equipo nos permitió alcanzar nuestros objetivos.

DEDICATORIA

Dedico esta tesis a mi familia, especialmente a mi padre Edison Eugenio Andrade Coronel, madre Jenny Patricia Roldán Roldán y hermano Mateo Guillermo Andrade Roldán, por su amor y apoyo incondicional durante todo mi proceso de formación. A mis amigos y amigas, por compartir su compañía y alegría. A mis profesores, por su paciencia y sabiduría en el desarrollo de este trabajo. Así, como a todos aquellos que de una u otra manera, han contribuido en mi crecimiento personal y profesional.

ÍNDICE GENERAL

PORTADA

DECLARACIÓN DE DERECHO DE AUTOR, AUTENTICIDAD Y RESPONSABILIDAD	ii
---	----

CERTIFICADO DE DIRECCIÓN DE TRABAJO DE INTEGRACIÓN CURRICULAR	iii
---	-----

AUTORIZACIÓN DE PUBLICACIÓN EN EL REPOSITORIO INSTITUCIONAL	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
-------------------------	---

1.1.1. Ofidismo de <i>B. schlegelii</i> en Ecuador	2
--	---

1.1.2. Descripción del género <i>Bothriechis</i>	3
--	---

1.1.3. Investigaciones relacionadas con venenos de <i>B. schlegelii</i>	4
---	---

1.1.4. Toxinas del género <i>Bothriechis</i>	5
--	---

1.1.5. Tratamiento del envenenamiento ofídico	5
---	---

1.2. Planteamiento del problema	6
---------------------------------------	---

1.3. Justificación de la investigación	6
--	---

1.4. Objetivos de la investigación	7
--	---

1.4.1. Objetivos específicos	7
------------------------------------	---

CAPÍTULO II: MARCO METODOLÓGICO	8
---------------------------------------	---

2.1. Venenos	8
--------------------	---

2.2. Animales	8
---------------------	---

2.3. Perfil bioquímico	8
------------------------------	---

2.3.2.	Electroforesis vertical SDS-PAGE	9
2.3.3.	Digestión de bandas de electroforesis en gel.....	10
2.3.4.	Digestión líquida.....	11
2.3.5.	Cromatografía Líquida de ultra eficiencia acoplada a Espectrometría de Masas en tándem LC-MS/MS	11
2.4.	Caracterización de la actividad enzimática.....	12
2.4.1.	Actividad proteolítica	12
2.4.2.	Actividad fosfolipasa A2	12
2.4.3.	Actividad serinproteasa	13
2.4.4.	Actividad L-aminooxidasa	13
2.5.	Caracterización de las actividades toxicológicas.....	14
2.5.1.	Evaluación de la actividad inflamatoria.....	14
2.5.2.	Evaluación de la actividad hemorrágica	14
2.5.3.	Evaluación de la actividad letal	14
2.6.	Análisis estadístico	15
CAPÍTULO III: PRESENTACIÓN DE DATOS Y RESULTADOS		16
3.1.	Perfil bioquímico de <i>B. schlegelii</i>	16
3.2.	Caracterización enzimática del veneno de <i>B. schlegelii</i>	24
3.3.	Caracterización toxicológica del veneno de <i>B. schlegelii</i>	26
3.4.	Actividad letal del veneno de <i>B. schlegelii</i>	29
CAPÍTULO IV: INTERPRETACIÓN Y DISCUSIÓN		30
CAPÍTULO V: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....		35
REFERENCIAS		36

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. <i>Asignación de las fracciones de RP-HPLC del veneno de B. schlegelii.....</i>	19
---	-----------

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Distribución de <i>Bothriechis schlegelii</i> en Ecuador.....	3
Figura 2. Perfil cromatográfico del veneno de <i>B. schlegelii</i> fraccionado por RP- HPLC.....	16
Figura 3. Fracciones de veneno de <i>B. schlegelii</i> separada por SDS-PAGE.....	18
Figura 4. Composición proteica general del veneno de <i>B. schlegelii</i>	24
Figura 5. Caracterización enzimática del veneno de <i>B. schlegelii</i> de Ecuador.....	25
Figura 6. Actividad hemorrágica inducida por el veneno de <i>B. schlegelii</i> de Ecuador.	27
Figura 7. Evolución temporal del porcentaje de edema inducido por el veneno de <i>B.</i> <i>schlegelii</i> de Ecuador.....	28
Figura 8. Caracterización de la letalidad del veneno de individuos de <i>B. schlegelii</i>	29

RESUMEN

Bothriechis schlegelii es una serpiente venenosa muy poco estudiada en el Ecuador y ampliamente distribuida en América Central y el norte de Sudamérica. Además, de su amplia distribución geográfica se conoce que es una especie variable a nivel venómico. Debido a su hábito arborícola generalmente sus mordeduras se reportan en la cabeza, tronco y extremidades superiores, lo cual implica importantes complicaciones clínicas como dolor local, edema, hemorragia y hasta necrosis en casos graves. Dilucidar bioquímicamente el perfil proteómico y actividades toxicológicas del veneno de *B. schlegelii* de Ecuador genera un pronóstico clínico después del envenenamiento y proporciona una mejor guía para la producción de un antiveneno eficaz. Las proteínas detectadas en *B. schlegelii* podrían investigarse selectivamente en busca de potenciales moléculas terapéuticas. En el presente estudio, se identificó que el veneno está conformado en su mayoría principalmente por tres familias de proteínas: fosfolipasas PLA₂ en 34.7%, serin proteasas SVSP en 23.35% y metaloproteinasas SVMP en 19.95%. Los ensayos enzimáticos y toxicológicos corroboraron la presencia de varias de estas familias de proteínas detectadas. Curiosamente, mientras el veneno de *B. schlegelii* exhibió una actividad letal baja en ratones, mostró una alta actividad fosfolipasa, considerable para SVSP y L-aminoxidasas LAAO, y una actividad proteolítica relativamente baja. En particular, no se observó actividad hemorrágica, pero si una considerable actividad inflamatoria. Estos resultados muestran que el veneno de *B. schlegelii* Ecuador a pesar de tener una baja actividad letal sus actividades toxicológicas contribuyen con los síntomas del envenenamiento. Esta caracterización puede ser usada para comprender los efectos fisiopatológicos posteriores al envenenamiento por serpientes *B. schlegelii* de Ecuador y encaminar a un tratamiento específico. Para futuras investigaciones se recomienda realizar estudios exhaustivos que involucren todo el rango de distribución geográfica de esta especie que abarca América Central y el norte de América del Sur para obtener una comprensión completa de la venómica.

Palabras clave: *Bothriechis schlegelii*, envenenamiento, caracterización toxicológica, ensayos enzimáticos, proteómica.

ABSTRACT

Bothriechis schlegelii is a venomous snake that has been poorly studied in Ecuador and has a wide distribution in Central America and northern South America. In addition, due to its wide geographical distribution, it is a variable species at the venom level. Attributable to its arboreal habit, its bites generally occur mainly on the head, trunk and upper extremities, which implies important clinical complications such as local pain, edema, hemorrhage and even necrosis in severe cases. This study aims to biochemically elucidate the proteomic profile and toxicological activities of *B. schlegelii* venom from Ecuador to generate a clinical prognosis after snakebite envenomation and provide a better guide for the production of an effective antivenom. In addition, the proteins detected in *B. schlegelii* venom could be selectively investigated for potential therapeutic molecules. We identified that the venom is mainly composed of three families of proteins: phospholipases PLA₂ (34.7 %), serine proteases SVSP (23.35 %) and metalloproteinases SVMP (19.95%). Enzymatic and toxicological assays corroborated the presence of several of these detected protein families. Interestingly, while *B. schlegelii* venom exhibited low lethal activity in mice, it showed high phospholipase activity, considerable for SVSP and LAAO, and relatively low proteolytic activity. In particular, no hemorrhagic activity was observed, while if a considerable inflammatory activity. Generally, these results show that *B. schlegelii* Ecuador venom, despite having a low lethal activity, its toxicological activities contribute to the symptoms of poisoning. In addition, the characterization carried out in this study can be used to understand the pathophysiological effects after envenomation by *B. schlegelii* snakes from Ecuador and lead specific treatment. However, further investigations should focus on conduct comprehensive studies involving the entire geographic distribution range of this species spanning Central America and northern South America to obtain a thorough understanding of venomomics.

Keywords: *Bothriechis schlegelii*, envenoming, toxicological characterization, enzymatic assays, proteomics.

CAPÍTULO I: PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

1.1. Antecedentes

Los accidentes ofídicos son un problema de salud pública desatendido, especialmente en regiones tropicales con deficiente infraestructura en el ámbito de la salud, tales como África, Asia, Centro y Sud América [1,2]. A pesar de que el número de casos es elevado, posicionando esta enfermedad como una de las más letales, cabe recalcar que muchos de los accidentes ni siquiera son adecuadamente reportados y compilados en los registros públicos, por lo que la magnitud de esta problemática es incorrectamente dimensionada. A nivel epidemiológico, se estima que en el Ecuador ocurren cerca de 3 000 a 10 000 decesos anualmente a causa de accidentes ofídicos, de los cuales casi todos (99 %) son provocados por vipéridos [3]. Además, Ecuador alberga una gran diversidad de serpientes venenosas con 36 especies distribuidas en el territorio, que representan el 5 y el 19 % de biodiversidad del mundo y de América respectivamente [4]. En el territorio nacional habitan 17 especies de vipéridos distribuidos en cinco familias principalmente concentradas en la región costa en su mayoría [3]. A pesar de que la mayor contribución de accidentes esta dado por serpientes del género *Bothrops* y *Lachesis* también hay otros géneros de importancia médica en esta familia de serpientes [5]. Uno de ellos es *Bothriechis* el cual consta de 11 especies de serpientes arbóreas originarias de América Central, de las cuales algunas se extienden hasta América del Sur [6].

En las serpientes de las familias Viperidae y Elapidae, el veneno se genera en glándulas venenosas especializadas ubicadas en la mandíbula superior, ventral y posterior a los ojos [7]. *Bothriechis schlegelii*, comúnmente conocida como víbora de pestañas, es una especie de serpiente venenosa que habita en la zona occidental del Ecuador. Si bien estas serpientes son conocidas por sus prominencias encima de sus ojos similares a cuernos o pestañas y colores llamativos, pueden representar un riesgo para la salud humana en casos de accidentes ofídicos. Los venenos son un combinado de moléculas mortales compuestos de mezclas únicas de péptidos y proteínas principalmente, imprescindibles en la captura de presas o defensa [8]. Las toxinas del veneno, cuando son inyectadas en sistemas biológicos, desencadenan actividades enzimáticas, unión a receptores o canales de iones, alteraciones en los sistemas nerviosos central y periférico, los sistemas cardiovascular y neuromuscular, la coagulación sanguínea y la

homeostasis [9]. Basado en reportes clínicos y su tratamiento, el veneno de *B. schlegelii* es caracterizado como hemotóxico, lo que significa que ataca los vasos sanguíneos y compromete la homeostasis [10–12]. Esto puede causar una gran variedad de síntomas, que incluyen dolor, hinchazón, sangrado, desfibrilación, hematoma, necrosis e incluso la muerte en casos graves.

En América Central estudios de caracterización realizados en Costa Rica mostraron que el veneno de *Bothriechis schlegelii* posee una fuerte actividad mionecrótica y baja actividad proteolítica [13]. También, se ha aislado una miotoxina capaz de inducir alta mionecrosis y edema, aunque nula actividad de fosfolipasa [11]. En complemento, los estudios de proteómica muestran que las fosfolipasas A₂ (PLA₂) son la principal familia de toxinas presentes en el veneno, las cuales corresponden al 44 % de las proteínas totales [11]. Pero, también se puede encontrar péptidos potenciadores de bradiquinina (BPP), serin proteinasa (SVSP), l-aminoácido oxidasa (LAAO), proteína secretora rica en cisteína (CRISP), inhibidores de tipo Kazal y metaloproteinasa dependiente de Zn⁺² (SVMP) [9,11]. Por otro lado, estudios comparativos con especímenes de Centroamérica (Costa Rica) y Sudamérica (Colombia) muestran una actividad fosfolipasa similar [14]. Sin embargo, el veneno del espécimen centroamericano muestra ser más edematógeno y cuatro veces más hemorrágico que el sudamericano [10,14]. Curiosamente, se han encontrado perfiles electroforéticos y cromatográficos muy similares para los venenos de especímenes de *B. schlegelii* de Perú y Costa Rica a pesar de la gran distancia que los separa [15]. Estos hallazgos evidencian la variabilidad en la composición y actividades que pueden llegar a tener los venenos de los individuos de esta especie.

1.1.1. Ofidismo de *B. schlegelii* en Ecuador

En el Ecuador se reportan varios avistamientos de *B. schlegelii* en la zona occidental de la región litoral, especialmente en el noreste del país (**Figura 1**). Esta serpiente habita entre los 0 y 2500 msnm. Sin embargo, se desconoce a ciencia cierta sobre su incidencia ofídica en la población. Simplemente, se conoce de avistamientos en las provincias de Azuay, Cotopaxi, Esmeraldas, Manabí, Guayas, El Oro, Imbabura, Pichincha, Santo Domingo de los Tsáchilas y Los Ríos [16,17]. Dentro de los casos de accidentes ofídicos reportados por Centros Hospitalarios Públicos *Bothrops asper* es la víbora más involucrada en la mayoría de los casos, pero también hay reportes de accidentes ofídicos por *Bothriechis schlegelii* en la provincia de Manabí [18]. Estadísticas de

Colombia apuntan que *B. schlegelii* es responsable por el 5–10 % de los accidentes ofídicos reportados [19]. Para especímenes del Ecuador no se conoce a profundidad acerca de su actividad toxicológica. A partir investigaciones fundamentales se conoce que el veneno de *B. schlegelii* no es hemorrágico, poco coagulante y moderadamente letal (LD₅₀ de 130 µg/animal) [10]. Este vacío de conocimiento en la caracterización proteómica y actividades toxicológicas representa un verdadero problema al momento de abordar esquemas de terapia antiveneno.

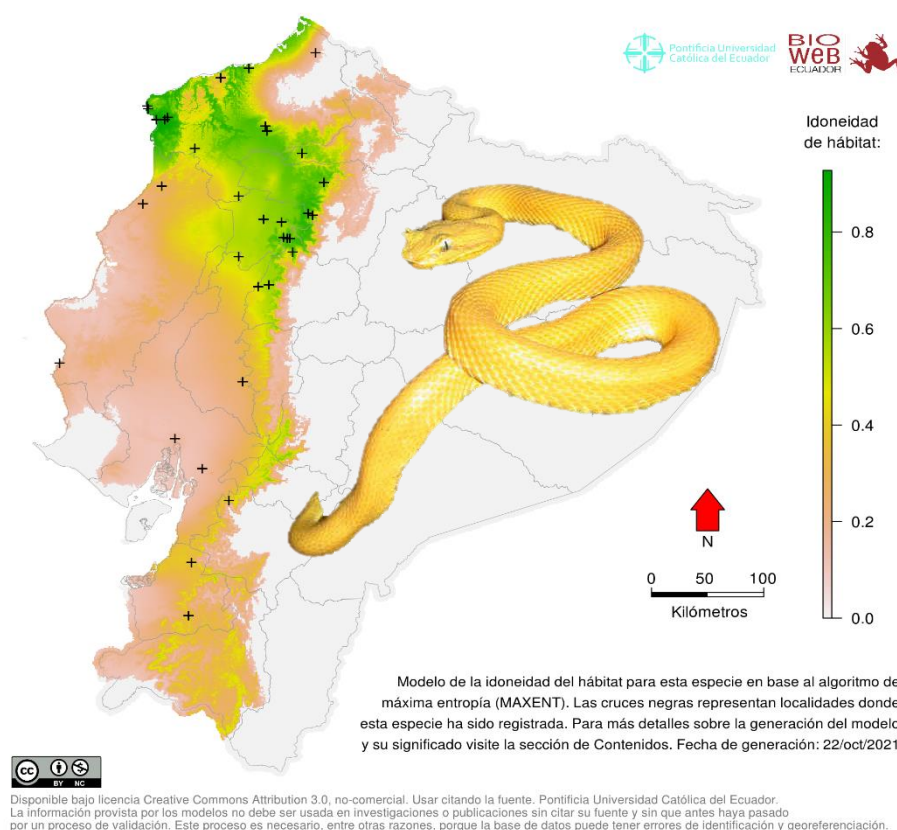


Figura 1. Distribución de *Bothriechis schlegelii* en Ecuador.

Fuente: Rodríguez-Guerra, A. 2020; Foto © 2006 Shawn Mallan-BIOWEB, <https://bioweb.bio>.

1.1.2. Descripción del género *Bothriechis*

El género *Bothriechis* está conformado por 11 serpientes arbóreas originarias de América Central, de las cuales algunas se extendieron a América del sur [6]. El grupo está conformado por *Bothriechis aurifer*, *Bothriechis bicolor*, *Bothriechis guifarroi*, *Bothriechis lateralis*, *Bothriechis marchi*, *Bothriechis nigroviridis*, *Bothriechis nubestris*, *Bothriechis rowleyi*, *Bothriechis schlegelii*, *Bothriechis supraciliaris* y *Bothriechis thalassinus*. Sus hábitos arbóreos les permitieron desarrollar un color críptico

(especialmente verde o marrón) ojos grandes, cola prensil y cráneo estrecho. Su cola prensil no solo es utilizada para aferrarse cuando descansa sino también para sujetar a sus presas cuando ataca. Se ha observado que las serpientes de género *bothriechis* al no tener un comportamiento de constricción optan invariablemente por cazar presas pequeñas aferrándose a ellas hasta que su presa sucumbe por el veneno [20].

1.1.3. Investigaciones relacionadas con venenos de *B. schlegelii*

Los estudios de composición de venenos de serpiente en este último decenio han ayudado a ampliar significativamente el campo de la venómica, específicamente mediante el uso de la poderosa técnica analítica conocida como espectrometría de masas [9,21,22]. Esta técnica abre las puertas a varias investigaciones para caracterizar y descubrir nuevas moléculas prometedoras nunca antes identificadas. Se conoce que veneno de neonato *B. schlegelii* es el único veneno del género *Bothriechis* en el que se han identificado cantidades relativamente altas de inhibidores de tipo Kunitz (6,3 %) y γ PLA₂ (5,2 %), en el mismo estudio se evidenciaron grandes cambios ontogénicos en los proteomas de venenos entre serpientes neonatos y adultas[23].

Asimismo, se ha evaluado a partir de una secuencia proteica completa de 498 aminoácidos a partir de ADNc aislado de la glándula venenosa a una LAAO de *B. schlegelii* con actividad antibacteriana contra *Staphylococcus aureus* y *Acinetobacter baumannii*[24]. Los venenos ricos en LAAO son una fuente potencial de moléculas terapéutica ya que estas enzimas muestran concentraciones bajas a las que inhiben el crecimiento bacteriano y/o las matan directamente, además muestran ser inofensivas para células humanas.

Otra actividad de una toxina fosfolipasa A₂ de *B. schlegelii* es su propiedad miotóxica [25]. Es capaz de inducir mionecrosis rápida tras la inyección intramuscular en ratones, induce edema en el ensayo de la almohadillada en la pata del ratón y genera una actividad letal de 2.5 µg/g vía intravenosa [24]. Una familia de proteínas observada en serpientes neotropicales son los péptidos inhibidores de tipo Kazal (Kazal). La primera secuenciación y caracterización realizada en *B. schlegelii* mostró que contiene 45 aminoácidos, no inhibió la actividad SVSP, pero si parcialmente la actividad de la tripsina y el único efecto observado en ratones fue la inducción de edema en las almohadillas[26].

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.

1.1.4. Toxinas del género *Bothriechis*

Investigaciones de proteómica dentro del género *Bothriechis* revelan que tiene una composición muy diferente en términos de familias de proteínas predominantes [11,27,28]. Las principales familias de proteínas en *Bothriechis* son péptidos potenciadores de brandicinina, BPP; fosfolipasa A₂, PLA₂; proteínas secretoras ricas en cisteína, CRISP; lectinas de tipo C, Snaclec; metaloproteinasas, SVMP; L-aminoácido oxidasa, LAAO; factor de crecimiento endotelial vascular, svVEGF [11].

1.1.5. Tratamiento del envenenamiento ofídico

El tratamiento empleado en pacientes víctimas de accidentes que esta validado por la Organización Mundial de la Salud (OMS) está basado en el uso de antivenenos obtenidos a partir de la inmunización de animales y purificación de inmunoglobulinas. La producción en Ecuador ha sido discontinuada desde 2014 por lo que, el sistema de salud se encarga de importarlos [29–31]. Recientemente se ha presentado un proyecto por el Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública (INSPI) que pretende crear una planta de producción nacional de antivenenos con el fin de satisfacer las necesidades del país [31]. En el caso de *B. schlegelii* se suele emplear antiveneno polivalente, es decir, que utiliza anticuerpos producidos a partir del uso de un pool de inmunógenos de diferentes especies de serpientes. Al no utilizar el veneno de *B. schlegelii* dentro del pool es necesario llevar a cabo una evaluación preclínica para conocer la eficiencia del antiveneno. Por ejemplo, estudios han probado el antibotrópico producido por el Instituto Butantan de Brasil que emplea *Bothrops jararaca*, *Bothrops jararacussu*, *Bothrops moojeni*, *Bothrops neuwiedi* y *Bothrops alternatus* [14], así como en Costa Rica el antiveneno polivalente del Instituto Clodomiro Picado que a su vez emplea *Bo. asper*, *Crotalus durissus durissus*, y *Lachesis stenophrys* [11]. Ambos muestran la capacidad de neutralizar la actividad letal en ratones, pero también es necesario neutralizar con éxito los demás efectos locales y sistémicos que surgen

durante el envenenamiento. Por lo tanto, hay que tomar en cuenta la variabilidad venómica que tienen las serpientes, también intraespecíficamente[32–34].

1.2. Planteamiento del problema

La amplia distribución de la serpiente *B. schlegelii* por Centroamérica y el norte de Sudamérica puede ser acompañada de una variación de su veneno a nivel geográfico, además de las variaciones ontogénicas e intraespecíficas de esta especie. El conocimiento de la composición del veneno es clave para una identificación del grupo de toxinas que deben ser neutralizadas y para selección del correcto esquema de tratamiento basado en antivenenos. A largo plazo es también fundamental entender los mecanismos moleculares y las fuerzas evolutivas que subyacen la variación del veneno [9].

La mordedura de *B. schlegelii* causa en sus víctimas manifestaciones clínicas como dolor, edema, coagulación prolongada y necrosis (en casos graves) [12,35]. Pueden llegar a producir efectos locales intensos de inflamación y gangrena [36]. Se estima que la cantidad de veneno que porta esta serpiente son 12 mg y se aproxima que una mordedura inyecta 0.5 cm³ de veneno [37]. Tomando en cuenta estas características, uno de los aspectos más importantes es el hecho de que las mordeduras generalmente ocurren en la cabeza, tronco y extremidades superiores de los accidentados debido a los hábitos arborícolas de estas serpientes [38]. Esto convierte este envenenamiento en un desafío clínico en términos de tratamiento, ya que puede generar complicaciones a causa de la cercanía con órganos vitales. El grupo vulnerable más afectado por mordeduras de serpientes son los agricultores de 16 a 40 años [3]. En el Ecuador al no tener una producción propia de antiveneno, puede estar sujeto a una menor eficacia. Por otra parte, existe un vacío de conocimiento de los componentes bioquímicos dentro del veneno ya que no hay una caracterización proteómica de las toxinas del veneno de *B. schlegelii* en el Ecuador.

1.3. Justificación de la investigación

Los venenos de serpientes son un gran reservorio de componentes bioactivos por descubrir que pueden ser empleados para el diseño racional de futuras terapias, así como para la producción de medicinas esenciales, como los antivenenos. El valor

medicinal de los venenos de serpiente ha sido reconocido y explorado desde la antigüedad con remedios caseros [8,39] hasta la generación de productos farmacéuticos, como por ejemplo el Captopril [40,41]. Es sumamente importante contar con la caracterización bioquímica y farmacológica de los venenos de las serpientes que habitan en el Ecuador. Esto ofrece la oportunidad de comprender procesos fisiopatológicos derivados de un accidente ofídico, los cuales son indispensables para una propuesta y generación de tratamientos específicos. La serpiente *B. schlegelii*, ha sido muy poco estudiada en Ecuador a pesar de que también es parte de los casos por accidentes ofídicos [18]. Existen pocos estudios proteómicos que caractericen las toxinas presentes en el veneno de *B. schlegelii* y en el Ecuador todavía no se ha realizado este tipo de estudios.

Por lo tanto, con el fin de fortalecer el conocimiento de la composición proteómica indispensable para la generación de terapias específicas y descubrimiento de nuevas moléculas, este proyecto caracterizará bioquímica y toxicológicamente el veneno de *B. schlegelii* de Ecuador.

1.4. Objetivos de la investigación

- Caracterizar la composición bioquímica y actividad toxicológica del veneno de *Bothriechis schlegelii* de Ecuador.

1.4.1. Objetivos específicos

- Determinar el perfil proteico del veneno de *B. schlegelii* usando electroforesis y espectrometría de masas.
- Evaluar las principales actividades enzimáticas y toxicológicas del veneno de *B. schlegelii*.

CAPÍTULO II: MARCO METODOLÓGICO

2.1. Venenos

Las muestras de veneno de *B. schlegelii* fueron obtenidas de un pool, bajo autorización del Ministerio del Ambiente (MAE-DNB-CM-2015-0017 y MAE-DNB-CM-2019-0115) y en colaboración con David Salazar (Universidad Indoamérica) y María Terán (Instituto Nacional de Salud Pública). Luego de la extracción, el veneno fue desecado y almacenado en refrigeración a una temperatura de -20°C hasta el momento de su uso.

2.2. Animales

Para los ensayos toxicológicos, se utilizaron como modelo animal ratones suizos macho (16-20 g) del bioterio del INSPI. Las dosis de veneno aplicadas en los diferentes ensayos fueron seleccionadas a partir del estudio de Kuch et al. [10]. En resumen, los animales se mantuvieron en condiciones adecuadas y estandarizadas con seguimiento de temperatura (25 °C), luz (ciclos de luz/oscuridad de 12 h), alimento y agua hasta la fecha prevista para el experimento. Las pruebas se realizarán con base en el principio de las 3R (reemplazar, reducir y refinar) y apegándose a los protocolos aprobados por la Coordinación de Investigación de la Universidad Regional Amazónica Ikiam. Todos los ensayos se realizaron de acuerdo con las recomendaciones de la Unión Europea sobre experimentación con animales (Directiva del Consejo Europeo 2010/63/UE) relativa a la protección de los animales utilizados para fines científicos.

2.3. Perfil bioquímico

2.3.1. Fraccionamiento de los venenos por RP-HPLC

Los solventes o fases móviles usadas para el fraccionamiento estuvieron compuestas por 99,9 % (v/v) agua para el solvente A y 99,9 % (v: v) acetonitrilo (ACN) para el solvente B, ambos con un 0,1 % (v: v) de ácido trifluoroacético (TFA). Para el fraccionamiento se utilizó la estrategia “snake venomics” Calvete [42] tomando en cuenta algunas modificaciones de Lomonte et al. [43]. En resumen, se disolvieron 2 mg de veneno desecado en 200 µl de agua con TFA al 0,1 %. Se homogenizó durante 2 minutos usando un vórtex. A continuación, se centrifugó a 13 000 g por 10 min (T°

ambiente). Se colocaron 200 μ l de muestra para ser inyectada en el cromatógrafo. Se utilizó una columna C_{18} Phenomenex Jupiter (250 x 4.6 mm; 5 μ m; 30 Å) para cromatografía de alta eficiencia en fase reversa (RP-HPLC). La elución se realizó tomando en cuenta el procedimiento de Hernández-Altamirano et al. [44] en 1 ml/min durante 100 min y la columna se desarrolló en un gradiente lineal desde 5 % a 70 % de Solvente B y usando las siguientes condiciones de elución de la columna: 5% B durante 5 min, seguido de 5% - 25% B durante 10 min, 25% - 45 % B durante 60 min y 45 % - 70 % durante 10 min. La separación se llevó a cabo con un Cromatógrafo Líquido HPLC (PREP 150 LC, Waters), equipado con un sistema de bombas e inyector (Waters 2545), automuestreador (Waters 2707) y el detector (Waters 2489) UV/Vis. La detección se realizó a una longitud de onda de 215 nm. Las fracciones se recogieron de forma manual y se concentraron en un concentrador al vacío (Genevac, miVac Duo) a 35°C durante 24 horas.

2.3.2. Electroforesis vertical SDS-PAGE

La caracterización de las fracciones se realizó mediante electroforesis unidimensional en gel de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE) mediante la metodología de Laemmli [45] con ciertas modificaciones. Cada una de las fracciones obtenidas fue disuelta en 45 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) azul bromofenol). Las muestras se corrieron en condiciones reductoras, por lo que se añadieron 5 μ l de 1M DL-Ditriotreitol (DTT). Después, las muestras se homogenizaron y calentaron en un termobloque a 95 °C por 5 min. Se tomó 20 μ l de cada muestra para la electroforesis en una cámara BIO-RAD Mini-PROTEAN Tetra en Buffer de corrida 1X (0.025 M Tris-HCL (pH 8.3); 0.192 M glicina; 0.1% (m/v) SDS). Se preparó una solución con 30 % de acrilamida y 0.8 % de N, N' bis-metilenbisacrilamida, usando un gel de apilamiento con una concentración de 5 % acrilamida:bisacrilamida, 0.067 M Tris-HCL y 0.1 % (m/v) SDS; y un gel de corrida con una concentración de 12.5% acrilamida:bisacrilamida, 0.55M Tris-HCL y 0.02 (m/v) SDS a 120 mV. El gel se polimerizó con persulfato de amonio (PSA) y tetrametiletildiamina (TEMED). El marcador de peso molecular fue Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladder (5 μ l). La separación ocurrió a 120 mA. La tinción de las bandas se realizó con el colorante azul de Coomassie (Blue R-250) por 24 horas en un agitador magnético. Se destiñó con una solución decolorante con 40 % (m/v) metanol y 10 % (m/v) ácido acético. El gel se conservó en una solución de agua destilada. Como resultado, la tinción en gel se registró digitalmente para su análisis mediante el software ImageJ y GelAnalyzer.

2.3.3. Digestión de bandas de electroforesis en gel

Previo a la digestión proteolítica de las bandas del gel, se realizó la extracción conforme la metodología descrita por Sanz et al. (2019) [46] y con modificaciones de Hernández-Altamirano [44]. Aquellas bandas que presentaron coloración azul, es decir bandas de interés, se les extrajo el colorante azul de Coomassie con una solución de bicarbonato de amonio (AMBIC) 100 mM y ACN (1:1). Después de una hora, se descartó la solución de los geles y se agregaron 100 µl de ACN por 10 min a T° ambiente. Se descartó el ACN y nuevamente se agregaron 50 µl más por 10 min. Se desechó el ACN y las muestras fueron secadas en una centrifuga al vacío (45°C) por 15 min. A continuación, se rehidrataron las muestras con 80 µl de DTT (1.5 mg/ml, disuelto en AMBIC) por 30 min en una incubadora a 56°C. Una vez terminado el periodo de incubación se descartó el DTT y se agregaron 100 µl de ACN por 5 min a T° ambiente. Se descartó el acetonitrilo y se concentraron las muestras en la centrifuga al vacío (45°C) por 15 min. Una vez, se encontraron las muestras secas se realizó una alquilación mediante la adición de 50 µl de una solución de yodoacetamida (IAA) (10.2 mg/ml disuelta en AMBIC) en estado de oscuridad y a T° ambiente por 20 min. Se descartó la IAA y se añadieron 50 µl de ACN por 15 min a T° ambiente. Nuevamente se descartó el ACN y se empleó la centrifuga al vacío (45°C) por 15 min. Finalmente se rehidrató con tripsina (0.1 mg/ml en AMBIC) por 15 min a 4°C. Y se agregaron 20 µl de AMBIC para que se incuben a 37°C toda la noche.

A continuación, las muestras se centrifugaron por 15 segundos a 12000 rpm y se recolectó el sobrenadante en tubos Eppendorf de 1.5 ml. Se agregaron 30 µl de una solución de 60 % ACN con 1 % ácido fórmico (AF), y se sonicaron en baño Branson por 10 min (37°C). El sobrenadante fue recolectado en un tubo nuevo. Para recolectar más muestra se concentró nuevamente con 30 µl de solución (60 % ACN y 1 % AF) por 10 min en baño Branson (37°C) y se mezcló con la solución anteriormente recolectada. Se concentraron las muestras en la centrifuga al vacío por 20-40 min o hasta que quedaron secas. Los digeridos fueron transferidos a un vial de cromatografía después de haber sido disueltos con 20 µl de agua con 0.1 % AF. De este modo las muestras se almacenarán de 4-8 °C hasta la inyección en el sistema de cromatografía líquida-ionización por electropulverización-espectrometría de masas de tiempo de vuelo de cuadrupolo (LC-UPLC ESI-QTOF). Cabe mencionar que, todos los reactivos empleados fueron preparados al momento del uso.

2.3.4. Digestión líquida

En las bandas de electroforesis que no fueron teñidas con bandas marcadas se empleó una digestión trípica en solución. Para lo cual se extrajeron alícuotas de 15 µl de las fracciones obtenidas del RP-HPLC y se añadió bicarbonato de amonio (AMBIC) 1 M hasta completar 20 µl. Se agregaron 6 µl de DTT (100 mM) y se incubaron a 56°C durante 30 minutos. Las muestras se sometieron a una reacción de alquilación con 3 µl de yodoacetamida por 20 minutos en la oscuridad. Se añadieron 3 µl de DTT (100 mM) y se dejó reposar por 20 minutos a temperatura ambiente. De esta manera, se añadieron 3 µl de una solución de 20 µg de tripsina en 200 µl de AMBIC 0.1 M durante 12 horas a 37°C. Después de la digestión, se agregaron 0.2 µl ácido fórmico concentrado. Luego, se evaporó el solvente en la centrífuga al vacío hasta quedaron casi seco. Se disolvió nuevamente con 40 µl de ácido fórmico 0.1 %. Se transfirieron 25 µl de la muestra a un vial de cromatografía y se añadieron 100 µl de AF 0.1 %. Las muestras fueron almacenadas de 4-8°C hasta el momento de la inyección en el sistema LC-UPLC ESI-QTOF. Todos los reactivos fueron preparados al momento del uso.

2.3.5. Cromatografía Líquida de ultra eficiencia acoplada a Espectrometría de Masas en tándem LC-MS/MS

Las muestras de digestiones previas fueron inyectadas en una columna Acquity C18 a una velocidad de flujo de 0.3 mL/min con una fase móvil de 0.1% AF (solvente A) y 0.1% ACN (solvente B). La elución se realizó con un gradiente lineal e isocrático en 1% B por 1 min, 1-70% B por 29 min y nuevamente se mantuvo isocrático en 70% por 2 min. La corrida duró 40 min. Las condiciones de operación del espectro de masas fueron: voltaje capilar de 0.5 KV, tensión de cono, 40 v; temperatura de fuente 120 °C; temperatura de desolvatación 450 °C; flujo de gas cono 30L/h; y flujo de gas de desolvatación 900L/h. Para el análisis de datos por LC-MS/MS, fueron procesados utilizando el método de adquisición dependiente (DDA) con un barrido de masas en la región m/z de 400 a 1990. A continuación, se seleccionaron los iones más abundantes de los espectros MS1 de cargas +2 y +3 para una disociación por colisión inducida (CID) en donde se obtuvieron espectros MS2 de los 15 iones más intensos. La interpretación de los espectros se realizó manualmente mediante el programa MASCOT DISTILLER con versión de licencia 2.7 (<https://www.matrixscience.com/distiller.html>) empleando una base de datos privada de SwissProt y con una base de datos de proteínas más específicas creada para serpientes del género *Bothriechis* de UniProt. Para el análisis se aplicó parámetros de

búsqueda de iones en donde se seleccionó a carbamidoximetil cisteína (C) como modificaciones fijas y la oxidación de la metionina (M) como modificaciones variables.

2.4. Caracterización de la actividad enzimática

Se realizaron pruebas enzimáticas utilizando sustratos cromogénicos específicos para medir la actividad de L-aminoxidasa, caseinolítica, serinproteasa y fosfolipasa A₂. Se detectó y observó la cantidad de sustrato transformado parra cada actividad. Cabe recalcar que para cada ensayo se empleó un sustrato específico. La actividad fue cuantificada con un lector de microplacas (Glomax Discover System, Promega). Los experimentos se realizaron por triplicado e independientemente unos de otros. Se utilizó el veneno *Bothrops atrox* y *Bo. asper* como comparación.

2.4.1. Actividad proteolítica

Se evaluó la actividad proteolítica según el método de Lomonte y Gutierrez [47] empleado azocaseína como sustrato cromogénico sintético. Se disolvieron 5 mg de azocaseína en 1 ml de tampón A (50 mM Tris-HCl, pH 8). El veneno también se disolvió en tampón A, con una concentración de 1 mg/ml. De este modo, la actividad proteolítica se determinó empleando 10 µl de veneno con 90 µl de solución de sustrato en tubos de 1.5 ml y se incubaron por 90 minutos a 37 °C. Transcurrido este periodo, se añadieron 200 µl de ácido trifluoroacético (TCA) al 5 % y se centrifugaron a 5 min a 8000 rpm. La reacción se detuvo añadiendo 150 µL de NaOH 0.5M. La absorbancia se monitoreó por espectrofotometría a 450 nm y 37 °C. Como control se utilizaron 10 µL de tampón A y 90 µL de solución sustrato como blanco.

2.4.2. Actividad fosfolipasa A2

El ensayo de actividad fosfolipasa se realizó conforme a la metodología de Holzer [48] con modificaciones de Resende et al. [49]. Además, se empleó la metodología de Calgarotto et al. [50] para adaptar el ensayo a una microplaca de 96 pocillos. Cabe mencionar que el sustrato cromogénico empleado fue ácido 4-nitro-3 [octanoiloxi] benzoico (NOBA) el cual pude mimetizar los fosfolípidos de membrana. En este sentido, se disolvieron 3.1 mg de NOBA en 1 mL de acetonitrilo y 10 mL de tampón B (Tris-HCl 10 mM, CaCl₂ 10 mM, NaCl 0,1 M, pH 8). Se disolvió 1 mg de veneno en 1 ml de tampón

A. La microplaca se preparó mezclando 20 μ L de veneno, 220 μ L de sustrato y 20 μ L de agua destilada, y se dejó incubar por 20 min a 37°C. Mientras que, para el blanco se reemplazó el veneno por 20 μ L de tampón A. Así mismo, la absorbancia se leyó a 405 nm.

2.4.3. Actividad serinproteasa

Para demostrar la actividad serinproteasa se utilizó el sustrato benzoil-arginil-p-nitroanilida (L-BapNa) (Sigma-Aldrich) y se siguió el procedimiento de Munekiyo y Mackessy [51] con modificaciones de Sant'Ana et al. [52]. Para disolver el sustrato se utilizaron 218 mg de BapNa en 50 μ L de dimetil sulfóxido y 5 ml de tampón B. Mientras que, las muestras de veneno se disolvieron en tampón A, en una concentración de 1 mg/ml. La microplaca de 96 pocillos se cargó con la mezcla de 20 μ L de veneno, 200 μ L de sustrato y 50 μ L de buffer A. Mientras que para corregir absorbancias se sustituyó la misma cantidad de veneno por buffer A siguiendo las mismas proporciones anteriores. Seguido, se realizó un periodo de incubación por 30 min para dar paso a la reacción de hidrólisis en enlaces peptídicos. En este caso la absorbancia fue cuantificada a 410 nm debido la generación de un producto específico llamado p-nitroanilina de color amarillo.

2.4.4. Actividad L-aminooxidasa

Para evaluar la actividad L-aminoácido oxidasa (LAAO) en los venenos de serpientes se empleó L-metionina como sustrato cromogénico. Gracias a que estas enzimas pueden catalizar la desaminación oxidativa de L-aminoácidos y generar peróxido de hidrógeno como uno de sus productos, en un ensayo enzimático es posible detectarlo gracias a la oxidación catalizada por peroxidasa y o-fenilendiamina que actúa como sonda de peróxido de hidrógeno [53]. Se preparó 1 ml de solución sustrato (50 mM de Tris-HCl; 5 mM de L-metionina; 2 mM de 4,5-dicloro-o-fenilendiamina; pH 8), 0.8 U/mL de solución peroxidasa y 1 mg/ml de veneno en tampón A. En consecuencia, se prosiguió a cargar la microplaca de 96 pocillos con 20 μ L de veneno, 90 μ L de sustrato y 10 μ L de peroxidasa. En el caso del blanco control se cambió el veneno por 20 μ L de agua destilada. Se incubó la microplaca por un tiempo de 60 min a 37 °C. Se detuvo la reacción de oxidación añadiendo 50 μ L de H₂SO₄ 2M y la absorbancia se cuantificó a 490 nm.

2.5. Caracterización de las actividades toxicológicas

2.5.1. Evaluación de la actividad inflamatoria

La actividad inflamatoria de diferentes concentraciones de veneno se investigó usando el modelo de edema de la planta de la pata tomando en cuenta la metodología de Leon et al [54] . Con esta finalidad, se emplearon grupos de cuatro ratones (18-20 g). Los efectos fueron comparados mediante la inyección de diferentes concentraciones de 25, 50, 100 y 200 µg de veneno disueltos en 50 µl de PBS en la almohadilla de la pata izquierda trasera y 50 µl de PBS en la pata trasera derecha. El incremento de las dimensiones de las patas causado por la inflamación fue monitoreado con un calibrador pie de rey digital (Truper) hasta por 24 horas después de la inyección. La actividad inflamatoria fue calculada a partir de la diferencia de medias de ambas patas inyectadas y expresada en porcentaje.

2.5.2. Evaluación de la actividad hemorrágica

La capacidad del veneno de inducir daño vascular e inducir hemorragia se evaluó basado en la metodología por Kondo et al. [55]. En líneas generales, un grupo de 4 animales (16-20 g) recibió una inyección subcutánea en la zona dorsal de 1, 6.25, 12.5 y 25 µg de veneno disuelto en 50 µl 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 y evaluar el área de la hemorragia. Como resultado, el área (en mm²) se registró digitalmente para su análisis el software ImageJ. Como control se utilizó un ratón que recibió una inyección de PBS en lugar de veneno.

2.5.3. Evaluación de la actividad letal

La actividad letal fue investigada siguiendo las directrices de Kuch et al. [10]. Para la inyección intraperitoneal, se disolvieron 25, 50, 100, 200 y 300 µg de veneno en 200 µl de PBS, que se administraron a cuatro ratones por concentración. El monitoreo de los ratones se realizó cada hora durante las 6 primeras horas. Posteriormente, se registraron los tiempos de muerte por intervalos a las 12, 24 y 48 horas. Los datos obtenidos fueron representados en una gráfica de curva de supervivencia.

2.6. Análisis estadístico

En los ensayos toxicológicos, el procedimiento experimental fue realizado usando un grupo de 4 animales en un único experimento por consideraciones bioéticas. Para el análisis, los datos fueron ordenados y tabulados. Los resultados de las pruebas realizadas en este trabajo se expresaron como media $\pm$ error estándar de la media y se compararon con los resultados de sus respectivos controles. Con la ayuda del software GraphPad Prism 8 y OriginPro 2022, los resultados serán analizados por “t” de Student o ANOVA dependiendo del número de grupos evaluados, siempre que presenten una distribución normal. También, seguido de un post-test de comparación múltiple de Tukey, adoptando valores con $p < 0.05$ como significancia estadística.

CAPÍTULO III: PRESENTACIÓN DE DATOS Y RESULTADOS

3.1. Perfil bioquímico de *B. schlegelii*

El fraccionamiento por RP-HPLC del veneno de serpiente *B. schlegelii* reveló 29 fracciones principales (**Figura 2**) que fueron detectadas y colectadas a partir de los 10 minutos hasta los 90 minutos. Conforme el perfil cromatográfico obtenido, los picos 14 y 22 tienen los mayores valores de absorbancia y área, que indican mayores valores de abundancia relativa. La cuantificación reveló que estas toxinas componen aproximadamente 27.75 y 29.66 % del veneno total respectivamente. El pico 14 eluye en un tiempo de retención de 45 minutos y está conformado en su totalidad por PLA₂ (**Tabla 1**). Por el contrario, el pico 22 que eluye al minuto 66 aproximadamente está conformado por toxinas de diferentes tipos. El 14.42 % pertenece a SVSP, 10.37 % SVMMP y el 4.87 a PLA₂ (**Tabla 1**).

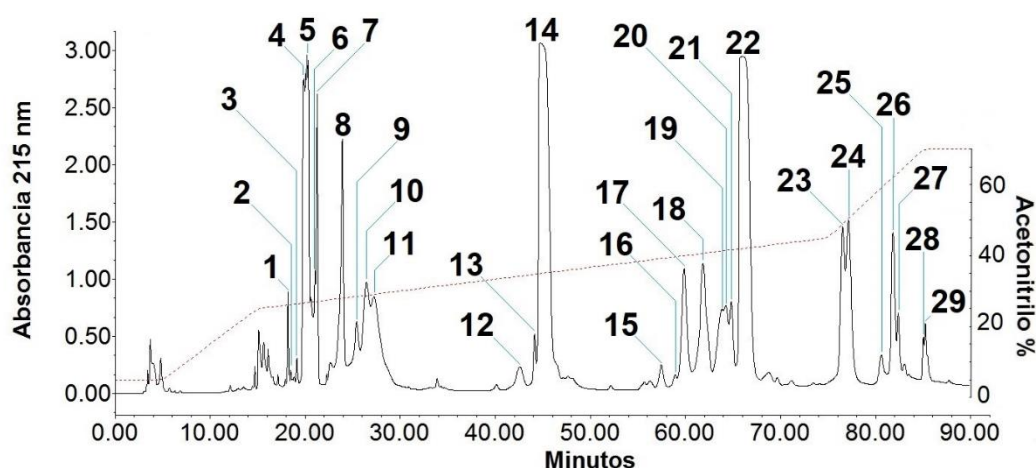


Figura 2. Perfil cromatográfico del veneno de *B. schlegelii* fraccionado por RP-HPLC.

Elaborado por: Andrade, Eugenio, 2023.

La corrida fue monitoreada a 215 nm por 100 min. Los picos con absorbancia significativa se encuentran enumerados del 1-29. Las fracciones se recolectaron manualmente y se caracterizaron mediante espectrometría de masas.

Las fracciones de HPLC separadas por SDS-PAGE en condiciones reductoras mostraron una amplia gama de pesos moleculares desde los 10 hasta los 140 kDa. aproximadamente. En las primeras fracciones, desde la 1 a la 9, no se observaron bandas ni en la 15, 17 y 22. Sin embargo, a partir de la fracción 10 hasta la 16 empieza

a verse un ligero patrón de elución de proteínas de bajo peso molecular de aproximadamente 10 a 35 kDa. (**Figura 3**). Conforme, avanzan los picos 18 hasta 23 se observa una elución de proteínas de peso medio entre 15 y 50 kDa. (**Figura 3**). Mientras que en los últimos picos del 24 al 29 se eluyen mayormente las proteínas de alto peso molecular entre 50 y 140 kDa. (**Figura 3**).

La identificación de proteínas por cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas LC-MS ha sido ampliamente utilizada para caracterizar los venenos de serpientes y ha permitido conocer la diversa composición de los venenos. Se logró analizar todas las fracciones por espectrometría de masas con el uso del programa MASCOT, lo cual permitió identificar y asignar familias de proteínas a las fracciones del veneno de *B. schlegelii* (**Tabla 1**). Se identificó un total de 8 familias de proteínas, de las cuales predominan las fosfolipasas A₂ (PLA₂) en 34.7 %, serin proteasas (SVSP) en 23.35% y metaloproteinasas (SVMP) en 19.95 % que eluyeron a un tiempo aproximado de 44-76, 58-82 y 18-85 minutos respectivamente. En menor proporción se identificó L-amino ácido oxidasas (LAAO) que eluyeron al final de la corrida entre los 64-84 minutos. También, se identificó desintegrinas (Des), proteínas secretoras ricas en cisteína (CRISP), péptidos potenciadores de bradicinina (BPP), 5'-nucleotidasas (SV5N) y fosfodiesterasas (PDE) (**Figura 4**). Sin embargo, cabe recalcar que no todas las fracciones pudieron ser asignadas a una familia de proteínas específica. Este estudio caracterizó el veneno de *B. schlegelii* casi en su totalidad con la excepción de las fracciones 1, 6, 8, 11, 12, 18 y algunas bandas las cuales representan el 14.13 % del perfil proteico.

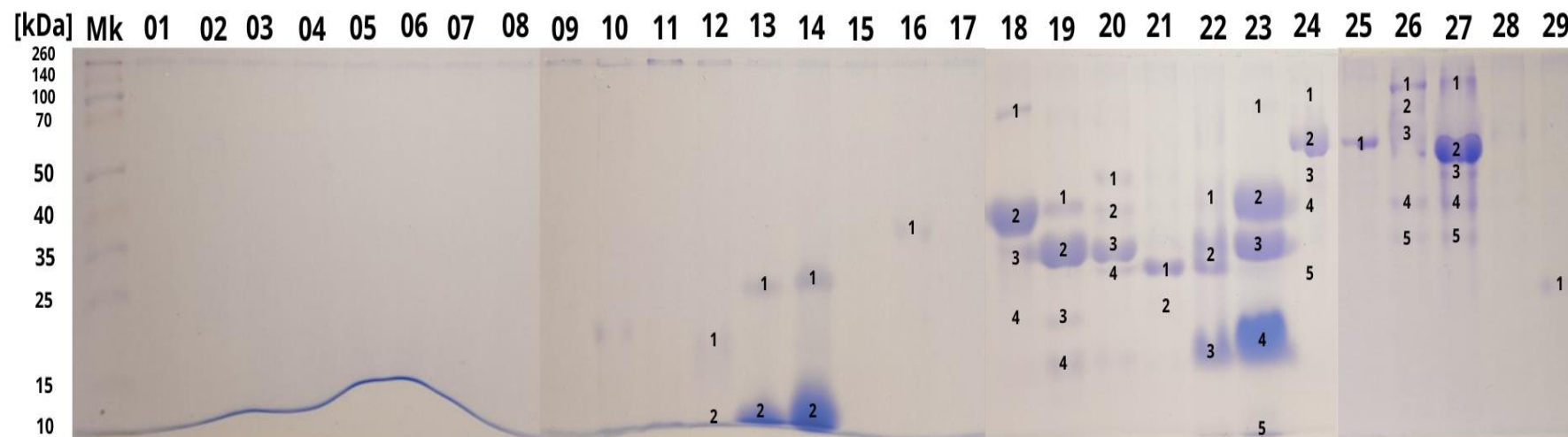


Figura 3. Fracciones de veneno de *B. schlegelii* separada por SDS-PAGE.

Elaborado por: Andrade, Eugenio, 2023.

Los marcadores de masa molecular se indican a la izquierda del gel (Mk, KDa). La numeración de la parte superior corresponde a la numeración de las fracciones de RP-HPLC que se muestra en la **Figura 2**. Mientras que la numeración dentro del gel corresponde a las bandas de proteínas se escindieron y caracterizaron mediante ESI-QTOF. Los resultados se muestran en la **Tabla 1**.

Tabla 1. Asignación de las fracciones de RP-HPLC del veneno de *B. schlegelii*.

Fracciones		Abund. Relat. ^c	Ion del péptido		Secuencia del péptido	Proteína relacionada				
Frac ^a	Sub Frac ^b		m/z	z		Familia ^d	Especie	MW ^e (KDa.)	Entrada UNIPROT	Dig. ^f
1		0.96	No identificado							
2		0.06	684.29	3+	LRPGAQCAEGLCCDQCR	SVMP	<i>Gloydius halys</i>	-	Q90221	Líquida
3		0.27	684.29	3+	LRPGAQCAEGLCCDQCR	Des	<i>Crotalus basiliscus</i>	-	P31981	Líquida
			576.23	2+	CTGQSADCPR	Des	<i>Crotalus basiliscus</i>	-	P31981	Líquida
4		1.65	684.29	3+	LRPGAQCAEGLCCDQCR	Des	<i>Crotalus basiliscus</i>	-	P31981	Líquida
5		3.9	684.29	3+	LRPGAQCAEGLCCDQCR	SVMP	<i>Gloydius halys</i>	-	Q90221	Líquida
6		0.13	No identificado							
7		2.49	684.29	3+	LRPGAQCAEGLCCDQCR	SVMP	<i>Gloydius halys</i>	-	Q90221	Líquida
8		3.62	No identificado							
9		0.88	529.77	2+	IACEPQNVK	SVMP	<i>Gloydius halys</i>	-	Q8AWI5	Líquida
			634.30	2+	LYCIDSSPANK	SVMP	<i>Gloydius halys</i>	-	Q8AWI5	Líquida
10		1.64	529.77	2+	IACEPQNVK	SVMP	<i>Gloydius halys</i>	-	Q8AWI5	Líquida
			634.30	2+	LYCIDSSPANK	SVMP	<i>Gloydius halys</i>	-	Q8AWI5	Líquida
11		1.1	No identificado							
12	1	0.66	No identificado							
	2		No identificado							
13	1	0.6	470.19	2+	EVCECDK	PLA2	<i>Bothriechis schlegelii</i>	27	A8E2V4	Gel
	2		526.53	3+	CCFVHDCCYEK	PLA2	<i>Gloydius halys</i>	11	O42187	Gel
	2		470.18	2+	EVCECDK	PLA2	<i>Gloydius halys</i>		O42187	Gel
14	1	27.75	470.19	2+	EVCECDK	PLA2	<i>Bothriechis schlegelii</i>	29	A8E2V4	Gel
	2		796.27	2+	CCFLHDCCYTR	PLA2	<i>Echis carinatus sochureki</i>	11	P59170	Gel

15		0.79	569.76	2+	SVDFDSESPR	CRISP	<i>Bothrops cotiara</i>	-	P0DMG5	Líquida
16	1	0.13	745.05	3+	NSAHIAPLSLPSSPPSVGSV CR	SVSP	<i>Crotalus adamanteus</i>	39	J3SBQ3	Gel
			559.80	2+	TLCAGILEGGK	SVSP	<i>Crotalus adamanteus</i>		J3SBQ3	Gel
17		4.7	509.58	3+	IIGGDECNINEHR	SVSP	<i>Gloydus blomhoffii</i>	-	P81176	Líquida
			559.80	2+	TLCAGILEGGK	SVSP	<i>Gloydus blomhoffii</i>	-	P81176	Líquida
18	1	6.11	No identificado							
	2		No identificado							
18	3		510.29	2+	DKDIM(OX)LIR	SVSP	<i>Crotalus adamanteus</i>	27	J3SDW9	Gel
	3		559.80	2+	TLCAGILEGGK	SVSP	<i>Crotalus adamanteus</i>		J3SDW9	Gel
	4		559.80	2+	TLCAGILEGGK	SVSP	<i>Trimeresurus gramineus</i>	20	O13060	Gel
19	1	0.75	No identificado							
	2		603.81	2+	IM(OX)GWGTISPTK	SVSP	<i>Crotalus atrox</i>	28	Q8QHK3	Gel
			500.23	3+	VVGGDECNINEHR	SVSP	<i>Agkistrodon contortrix</i>		P82981	Gel
	3		504.90	3+	VIGGDECNINEHR	BPP	<i>Gloydus ussuriensis</i>	23	Q7SZE2	Gel
			552.29	2+	VLNEDEQTR	BPP	<i>Gloydus ussuriensis</i>		Q7SZE2	Gel
	4		635.68	3+	KPEIQNEIVDLHNSLR	CRISP	<i>Gloydus blomhoffii</i>	18	Q8JI40	Gel
			589.30	2+	SVNPTASNM(OX)LK	CRISP	<i>Gloydus blomhoffii</i>		Q8JI40	Gel
			635.68	3+	KPEIQNEIVDLHNSLR	CRISP	<i>Bothriechis schlegelii</i>		F2Q6E4	Gel
20	1	0.18	676.82	2+	SAGQLYEESLQK	LAAO	<i>Bothrops jararacussu</i>	52	Q6TGQ9	Gel
	2		No identificado							
	3		745.05	3+	NSAHIAPLSLPSSPPSVGSV CR	SVSP	<i>Crotalus adamanteus</i>	27	J3SBQ3	Gel

			559.80	2+	TLCAGILEGGK	SVSP	<i>Crotalus adamanteus</i>	J3SBQ3	Gel	
4			504.90	3+	VIGGDECNINEHR	BPP	<i>Gloydius ussuriensis</i>	25	Q7SZE2	Gel
			616.32	2+	KVLNEDEQTR	BPP	<i>Gloydius ussuriensis</i>		Q7SZE2	Gel
			552.27	2+	VLNEDEQTR	BPP	<i>Gloydius ussuriensis</i>		Q7SZE2	Gel
			559.80	2+	TLCAGILEGGK	BPP	<i>Gloydius ussuriensis</i>		Q7SZE2	Gel
21	1	0.88	509.58	3+	IIGGDECNINEHR	SVSP	<i>Gloydius blomhoffii</i>	24	P81176	Gel
			559.80	2+	TLCAGILEGGK	SVSP	<i>Gloydius blomhoffii</i>		P81176	Gel
	2		449.25	3+	M(OX)ILQETGKNPAK	PLA2	<i>Bothrops jararacussu</i>	19	Q90249	Gel
22	1	29.66	559.79	2+	TLCAGILEGGK	SVSP	<i>Trimeresurus gramineus</i>	27	O13060	Gel
	2		548.77	2+	TLTSFGWR	SVMP	<i>Bothrops leucurus</i>	24	P84907	Gel
			422.76	2+	DLIKVEK	SVMP	<i>Bothrops leucurus</i>		P84907	Gel
	3		426.22	2+	NAAICFR	PLA2	<i>Bothriechis lateralis</i>	13	C0HJC1	Gel
			470.18	2+	EVCECDK	PLA2	<i>Bothriechis schlegelii</i>		A8E2V4	Gel
23	1	2.52	757.85	2+	ETDYEEFLEIAR	LAAO	<i>Bothriechis nigroviridis</i>	75	A0A6B2F2P2	Gel
	2	No identificado								
	3		637.85	2+	RTLACAGILEGGK	SVSP	<i>Gloydius brevicaudus</i>	26	Q9PTL3	Gel
			502.93	3+	DDEKDKDIM(OX)LIR	SVSP	<i>Protobothrops jerdonii</i>		Q9DF66	Gel
			619.32	3+	VFDHLDWIIQSIAGNK	SVSP	<i>Gloydius brevicaudus</i>		P85109	Gel
	4		595.93	3+	EICECDKNAAICFR	PLA2	<i>Bothriechis lateralis</i>	15	C0HJC1	Gel
			584.95	3+	SLMQFKTLIM(OX)KIAGR	PLA2	<i>Gloydius halys</i>		O42192	Gel
			591.26	3+	EVCECDKNAAICFR	PLA2	<i>Bothriechis schlegelii</i>		A8E2V4	Gel
	5	No identificado								

24	1	2.96	1116.85	3+	EGNLSPGAVDM(OX)IGDL LNEDSGYYVSFIESLK	LAAO	<i>Bothriechis nigroviridis</i>	81	A0A6B2F2P2	Gel
			1116.85	3+	EGNLSPGAVDM(OX)IGDL LNEDSGYYVSFIESLK	LAAO	<i>Bothriechis schlegelii</i>		A0A024BTN9	Gel
	2		859.93	2+	ETPVLSNPGPYLEFR	SV5N	<i>Gloydus brevicaudus</i>	61	B6EWW8	Gel
			523.30	2+	VPTYVPLEK	SV5N	<i>Crotalus adamanteus</i>		F8S0Z7	Gel
	3		655.30	2+	ETDYEEFLEIAR	LAAO	<i>Bothriechis nigroviridis</i>	50	A0A6B2F2P2	Gel
			864.06	3+	FNEIVDGMCLKPTSMYQAI EEK	LAAO	<i>Bothriechis schlegelii</i>		A0A024BTN9	Gel
	4		563.76	2+	FDEIVGGM(OX)DK	LAAO	<i>Gloydus blomhoffii</i>	43	Q90W54	Gel
			441.75	2+	IFLTCTK	LAAO	<i>Bothriechis schlegelii</i>		A0A024BTN9	Gel
	5		No identificado							
	25	0.81	757.85	2+	ETDYEEFLEIAR	LAAO	<i>Bothriechis nigroviridis</i>	67	A0A6B2F2P2	Gel
			629.01	3+	KDPGLLQYPVKPSEEGK	LAAO	<i>Bothriechis schlegelii</i>		A0A024BTN9	Gel
			629.01	3+	KDPGLLQYPVKPSEEGK	LAAO	<i>Bothriechis nigroviridis</i>		A0A6B2F2P2	Gel
			681.34	3+	DCGDTVINDLSLIHQLTK	LAAO	<i>Bothriechis schlegelii</i>		A0A024BTN9	Gel
			583.77	2+	QPLPETLQLK	PDE	<i>Crotalus adamanteus</i>	103	J3SEZ3	Gel
26	1	3.66	545.22	2+	KDCCTDYK	PDE	<i>Crotalus adamanteus</i>		J3SEZ3	Gel
			710.83	2+	DFYTFDSEGIVK	PDE	<i>Crotalus adamanteus</i>		J3SEZ3	Gel
			408.85	3+	GGTHGYDNEFK	PDE	<i>Crotalus adamanteus</i>		J3SEZ3	Gel
			No identificado							
	2		No identificado							

	3		757.85	2+	ETDYEEFLEIAR	LAAO	<i>Bothriechis nigroviridis</i>	77	A0A6B2F2P2	Gel
	4		No identificado							
	5		No identificado							
27	1	0.66	No identificado							
	2		634.30	2+	LYCIDSSPANK	SVMP	<i>Gloydius halys</i>	63	Q8AWI5	Gel
	3		514.27	2+	IPCAPQDVK	SVMP	<i>Daboia siamensis</i>	54	Q7LZ61	Gel
	4		745.04	3+	NSAHIAPLSLPSSPPSVGSV CR	SVSP	<i>Crotalus adamanteus</i>	42	J3SBQ3	Gel
			559.80	2+	TLCAGILEGGK	SVSP	<i>Crotalus adamanteus</i>		J3SBQ3	Gel
	5		504.90	3+	VIGGDECNINEHR	BPP	<i>Gloydius ussuriensis</i>	32	Q7SZE2	Gel
			552.27	2+	VLNEDEQTR	BPP	<i>Gloydius ussuriensis</i>		Q7SZE2	Gel
			559.80	2+	TLCAGILEGGK	BPP	<i>Gloydius ussuriensis</i>		Q7SZE2	Gel
28		0.21	757.85	2+	ETDYEEFLEIAR	LAAO	<i>Gloydius blomhoffii</i>	-	Q90W54	Líquida
29	1	0.27	430.73	2+	ETDLLNR	SVMP	<i>Crotalus atrox</i>	26	Q90392	Gel
			443.26	3+	YIELVIVADHR	SVMP	<i>Gloydius halys</i>		Q8AWX7	Gel

Elaborado por: Andrade, Eugenio, 2023.

a Fracción; **b** Sub fracción de bandas de proteínas escindidas; **c** Abundancia relativa; **d** Abreviaciones: Des: Desintegrina; *PLA₂*: Fosfolipasa A2; SVMP: Metaloproteinasa; CRISP: Proteínas secretoras ricas en cisteína; BPP: Péptido potenciador de bradicinina; SVSP: Serin-proteasa; SV5N: 5'-nucleotidasa; LAAO: L-amino acida oxidasa; PDE: Fosfodiesterasa; **e** masa aparente de SDS-PAGE en condiciones reductoras. **f** Dig. Tipo de digestión.

Las fracciones obtenidas por RP-HPLC en la **Figura 2** fueron asignadas a familias de proteínas mediante secuenciación en LC-ESI-QTOF por fragmentación de iones seleccionados de bandas de proteínas digeridas con tripsina en gel y/o solución.

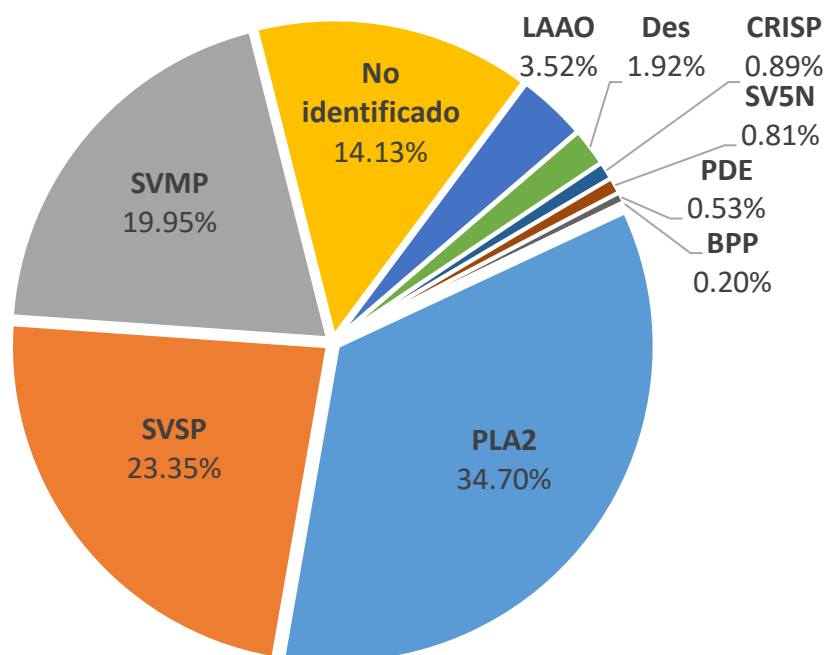


Figura 4. Composición proteica general del veneno de *B. schlegelii*.
Elaborado por: Andrade, Eugenio, 2023.

Los valores fueron calculados a partir de las abundancias relativas del perfil cromatográfico y tomando en cuenta la asignación de fracciones a familias de proteínas (**Tabla 1**). Todas las fracciones fueron analizadas con imageJ a través del parámetro de “intensity density” con el fin de distribuir los porcentajes de proteínas acorde a la separación realizada por SDS-PAGE (**Figura 3**). Des: Desintegrina; PLA_2 : Fosfolipasa A2; SVMP: Metaloproteinasas; CRISP: Proteínas secretoras ricas en cisteína; BPP: Péptido potenciador de bradicinina; SVSP: Serin-proteasa; SV5N: 5'-nucleotidasa; LAAO: L-amino acid oxidasa; PDE: Fosfodiesterasa.

3.2. Caracterización enzimática del veneno de *B. schlegelii*

Las actividades catalíticas del veneno de *B. schlegelii* fueron monitoreadas a la longitud de onda específica para cada sustrato cromogénico. Se realizaron tres experimentos independientes por triplicado y se utilizaron los venenos de *Bo. asper* y *Bo. atrox* para comparación. Los resultados de los ensayos enzimáticos evidencian diferencias en las actividades evaluadas al realizar una comparación entre los venenos (**Figura 5**).

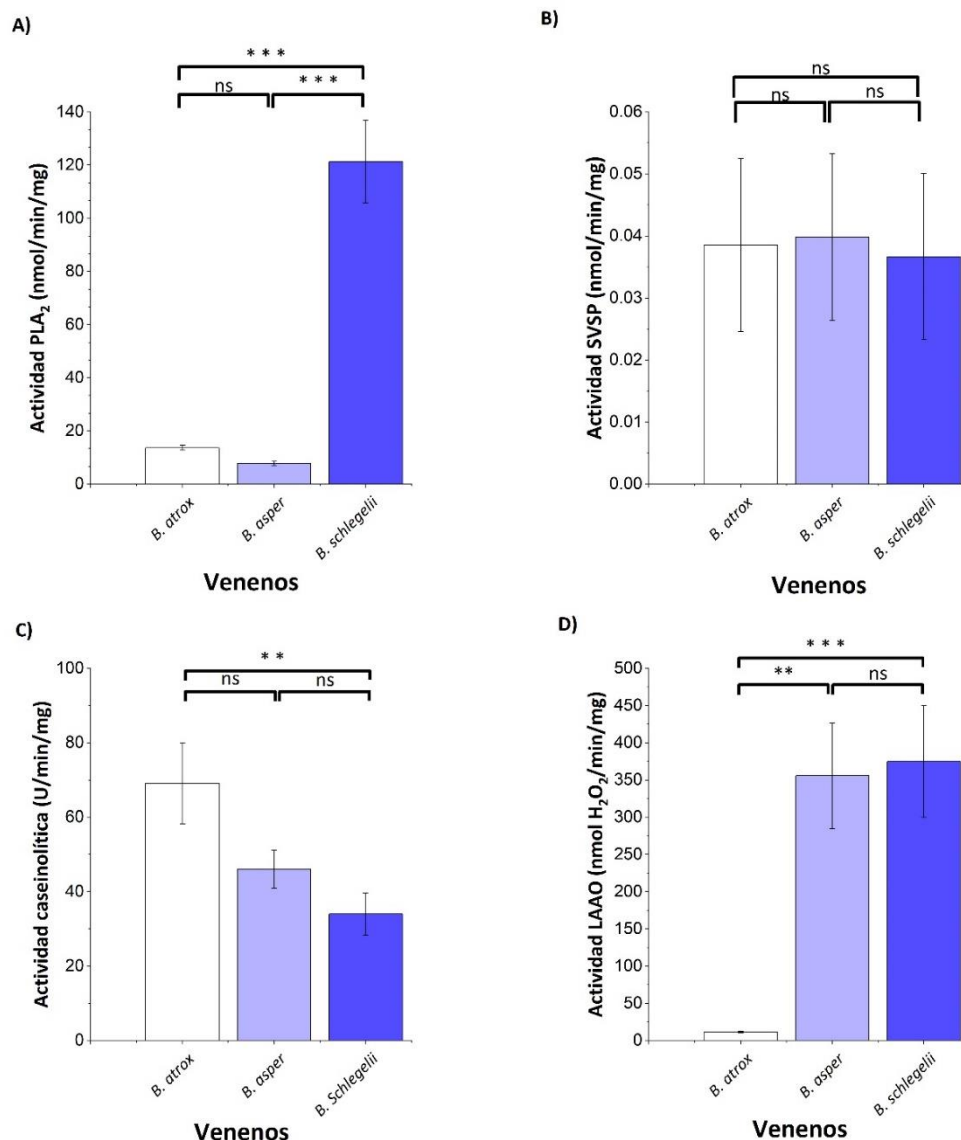


Figura 5. Caracterización enzimática del veneno de *B. schlegelii* de Ecuador.

Elaborado por: Andrade, Eugenio, 2023.

La comparación se realizó con venenos de *Bo. atrox* y *Bo. Asper*. Las actividades enzimáticas: (A) fosfolipasa, (B) serinproteasa, (C) caseinolítica, y (D) L-aminoácido oxidasa se evaluaron mediante métodos colorimétricos. El análisis se realizó empleando ANOVA, con una significancia de $p < 0.05$ para la prueba de Tukey como significativas al comparar la actividad entre muestras que son indicadas para cada actividad. Las diferencias estadísticas significativas se señalan con un asterisco simple (*) para $P < 0.05$, doble asterisco (**) para $P < 0.01$, tripe asterisco (***) para $P < 0.001$ o (ns) para denotar sin diferencia significativa.

Existen diferencias significativas importantes para *B. schlegelii* vs *Bo. atrox* para todos

los ensayos enzimáticos excepto en SVSP. Curiosamente, el ensayo de actividad serinproteasa sobre *B. schlegelii* mostró una actividad de 0.03 ± 0.013 nmol/min/mg similar a la de los venenos controles sin diferencias significativas, observándose una degradación similar del sustrato L-BapNa en las tres serpientes (**Figura 5B**). El veneno de *B. schlegelii* mostró la mayor actividad PLA_2 (121.3 ± 46.4 nmol/min/mg) sobre el sustrato NOBA con mucha diferencia en comparación con los otros dos venenos (**Figura 5A**). Por otro lado, en el ensayo caseinolítico que evalúa la actividad proteolítica de las toxinas, se identificó que *B. schlegelii* presenta la menor actividad de los tres venenos (34.0 ± 5.7 U/min/mg) (**Figura 5C**). Así mismo, el sustrato sintético L-aminoxidasa mostro una alta formación de H_2O_2 en presencia de los venenos de *B. schlegelii* y *Bo. asper* respectivamente con valores de 355.8 ± 70.8 y 374.8 ± 74.9 nmol de H_2O_2 /min/mg en comparación a una baja formación en *Bo. atrox* (**Figura 5D**).

3.3. Caracterización toxicológica del veneno de *B. schlegelii*

Al cabo de dos horas tras la inyección (intradérmica) del ensayo de actividad hemorrágica en las concentraciones 1, 6.25, 12.5 y 25 $\mu\text{g}/50 \mu\text{L}$ no mostró diferencias significativas con respecto al control (**Figura 6**). A penas se logró observar una pequeña área hemorrágica de aproximadamente 0.5 cm^2 a la concentración más alta (25 $\mu\text{g}/50 \mu\text{L}$) (**Figura 6**). En consecuencia, el análisis estadístico de ANOVA muestra que no hay diferencia entre las medias de los distintos grupos testeados. Por lo cual, el veneno de *B. schlegelii* de Ecuador a las concentraciones probadas resulta ser muy poco o nulamente hemorrágico.

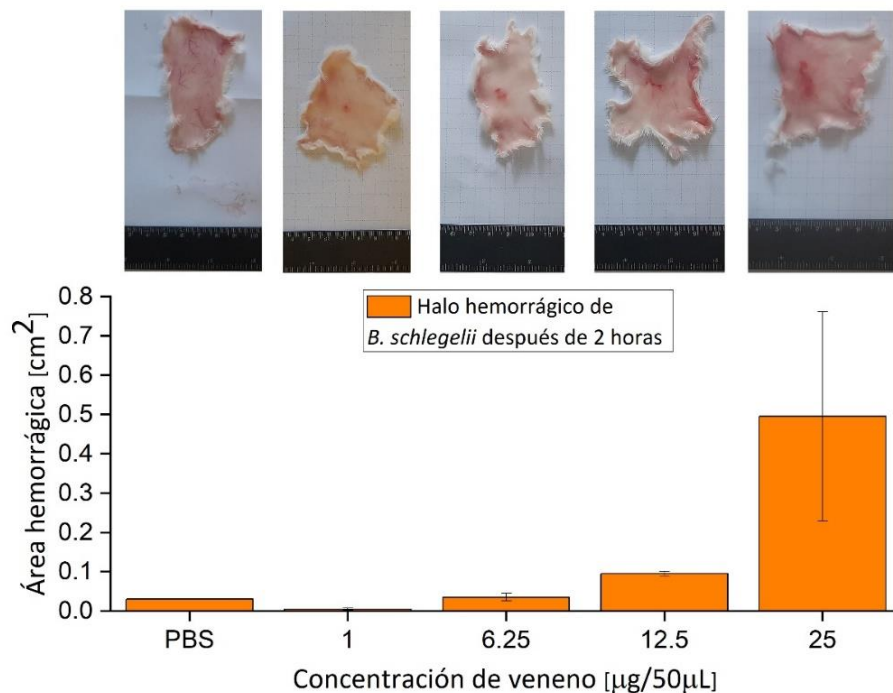


Figura 6. Actividad hemorrágica inducida por el veneno de *B. schlegelii* de Ecuador.
Elaborado por: Andrade, Eugenio, 2023.

Después de 2 h de la inyección, los animales ($n = 4$) fueron sacrificados y la piel del lomo se plegó para medir el área de hemorragia (cm^2) mediante el uso del software ImageJ. Los datos obtenidos fueron tratados con ANOVA de una cola mediante el uso del software OriginPro 2021, adoptando valores con $p < 0.05$ como significancia estadística. Los resultados se expresan como la media $\pm$ desviación estándar.

Por otro lado, se evaluó la actividad inflamatoria inducida por el veneno de *B. schlegelii* con respecto al tiempo y concentración. El periodo evaluación fue de 24 horas y las concentraciones evaluadas fueron 25, 50, 100 y 200 $\mu g/50\mu L$. El ANOVA mostró que hay diferencias significativas para ambos factores. En consecuencia, el test de Tukey mostró que la actividad inflamatoria es estadísticamente significativa para los tiempos de 1, 3 y 6 horas (**Figura 7**), mientras que, la actividad inflamatoria con respecto al rango de concentraciones mostró que existen diferencias significativas principalmente al comparar las concentraciones más altas con las más bajas durante las 9 primeras horas (**Figura 7**). A partir de las 12 horas hasta el final del ensayo no se observó actividad inflamatoria significativa. Esto quiere decir que, en las distintas concentraciones de veneno evaluadas en este estudio el porcentaje de edema inducido por el veneno muestra una actividad inflamatoria. Específicamente, en los tiempos evaluados la mayor inflamación ocurrió en el periodo de 1 hora (**Figura 7**), llegando a ser de 34.9 %, 30.3

%, 28 % y 25.9 % para las concentraciones de 25, 50, 100 y 200 $\mu\text{g}/50 \mu\text{L}$ respectivamente. Al cabo de 9 horas la inflamación disminuyó a 7.9 %, 4.1 %, 3.1 % y 2.5 % para 25, 50, 100 y 200 $\mu\text{g}/50 \mu\text{L}$ respectivamente y al final de las 24 horas el porcentaje de edema en todo el rango de concentraciones fue de 1-2 % aproximadamente.

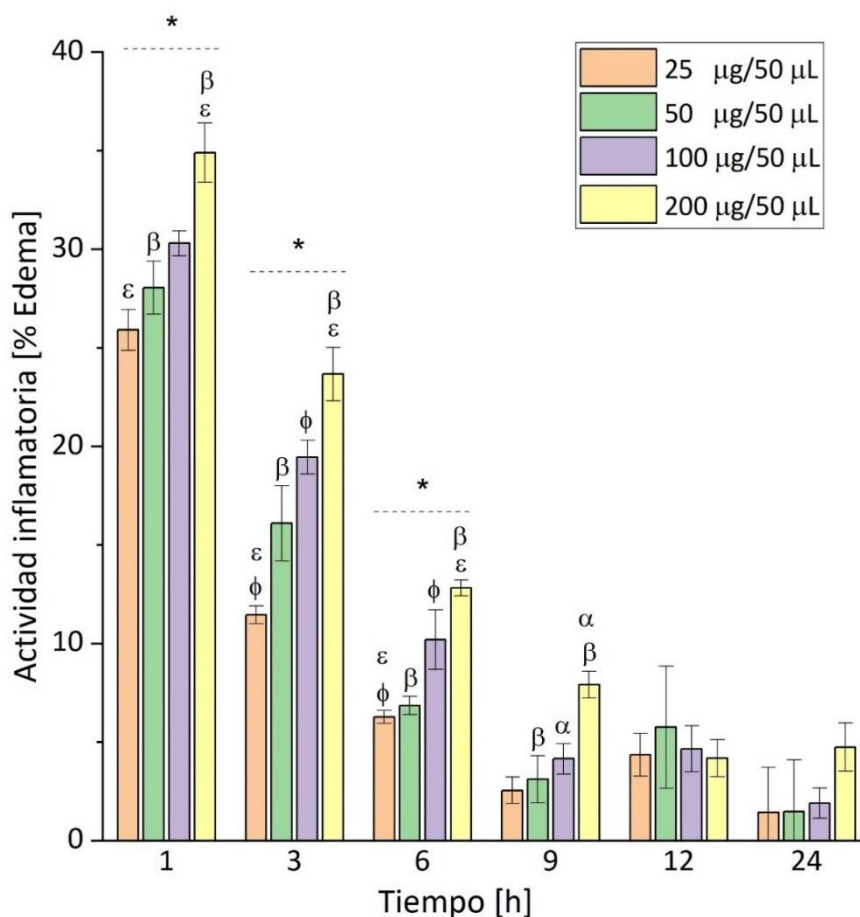


Figura 7. Evolución temporal del porcentaje de edema inducido por el veneno de *B. schlegelii* de Ecuador.

Elaborado por: Andrade, Eugenio, 2023.

El análisis se realizó empleando ANOVA, con una significancia de $p < 0,05$ para la prueba de Tukey como significativas al comparar la actividad entre muestras que son indicadas para cada tiempo. Las diferencias estadísticas significativas se señalan como: * (diferencia entre tiempos), α (diferencia entre concentración 100 y 200 $\mu\text{g}/50 \mu\text{L}$), β (diferencia entre concentración 50 y 200 $\mu\text{g}/50 \mu\text{L}$), ϵ (diferencia entre concentración 25 y 200 $\mu\text{g}/50 \mu\text{L}$), ϕ (diferencia entre concentración 25 y 50 $\mu\text{g}/50 \mu\text{L}$)

3.4. Actividad letal del veneno de *B. schlegelii*

Los resultados del ensayo de supervivencia en ratones muestran que el veneno de *B. schlegelii* de Ecuador no es letal a las concentraciones de 25, 50, 100, 200 $\mu\text{g}/50\text{ }\mu\text{L}$. Sin embargo, al subir la dosis a 300 $\mu\text{g}/50\text{ }\mu\text{L}$ se observó una supervivencia del 25 % de la población al cabo de 48 horas (**Figura 8**). El análisis estadístico mostró que la mayor concentración (300 $\mu\text{g}/50\text{ }\mu\text{L}$) es estadísticamente significativa.

La cantidad de veneno administrada que es capaz de matar a la mitad de la población dentro de un periodo determinado de tiempo se conoce como dosis letal media (LD_{50}) y es sumamente útil para realizar comparaciones de toxicidad. Por lo tanto, a partir de las observaciones de supervivencia se calculó la LD_{50} mediante la plataforma en línea “ LD_{50} Calculator AAT Bioquest” por el método “Spearman-Kärber” en donde se obtuvo un valor de 15.4 mg/kg. Este alto valor refleja una baja actividad letal del veneno.

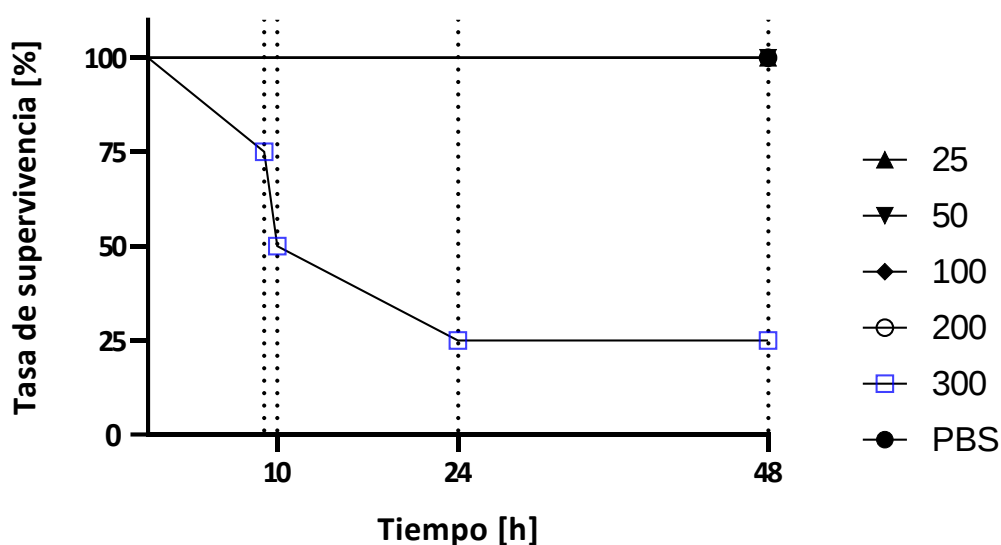


Figura 8. Caracterización de la letalidad del veneno de individuos de *B. schlegelii*.

Elaborado por: Andrade, Eugenio, 2023.

La supervivencia de los ratones se expresa en porcentaje en un periodo de 48 h. Las observaciones fueron analizadas y graficadas en el software GraphPad Prism 8 en donde mediante el test de Gehan-Breslow-Wilcoxon se obtuvo que la curva de supervivencia es significativa con respecto al control.

CAPÍTULO IV: INTERPRETACIÓN Y DISCUSIÓN

La caracterización de los venenos de serpiente a nivel bioquímico y proteómico permite conocer de manera directa la composición compleja de estos, entender mejor la dinámica fisiopatológica del envenenamiento derivado de una mordedura y determinar las toxinas claves para el desarrollo de estrategias antiveneno [56]. Por lo tanto, es de suma importancia generar estos conocimientos de tal manera que ofrezcan un perfil venómico y toxicológico útil para tratamientos por accidentes ofídicos. En el Ecuador, existe escasa información acerca del envenenamiento por *B. schlegelii* y su toxinología, en particular en el campo de la proteómica. Además, se ha demostrado que la amplia distribución de esta especie en Centro y Sud América influye en la composición y actividades del veneno [14]. Por lo tanto, es necesario tomar en consideración los constituyentes, propiedades enzimáticas y tóxicas de los mismos. Debido a esta problemática se aborda la caracterización bioquímica y actividad toxicológica del veneno de esta serpiente.

A pesar de que *B. schlegelii* no cuenta con una base de datos de proteínas sumamente robusta como otras especies modelo, esta si cuenta con la disponibilidad del transcriptoma específico de la glándula venenosa y secuencias de proteínas relacionadas al veneno [56]. Por lo tanto, además de realizar una búsqueda en una base de datos general como “Swiss-Prot”, también se empleó una base de datos propia con secuencias de proteínas pertenecientes al género *Bothriechis*. La comparación de datos LC-MS con un transcriptoma de la glándula del veneno evidencia de manera interesante como puede llegar a cambiar la abundancia de familias de proteínas de cierto individuo. Casos puntuales como estudios de comparación del veneno de serpientes adultas y neonatos para *B. schlegelii* y *B. lateralis* demuestran cambios ontogénicos, pero que difieren en la dirección de dichos cambios[23]. Es decir que, el cambio ontogénico en *B. schlegelii* conduce a un cambio de composición con predominio de PLA₂ en su veneno, mientras que en *B. lateralis* este cambio dependiente de la edad resulta en un veneno rico en SVMP.

Los péptidos y proteínas de mayor tamaño se retienen en los geles de electroforesis, mientras que los de menor peso molecular tienden a disiparse [57]. Este patrón se observó en las primeras fracciones en eluir, entre los 10 a 30 minutos, contenían proteínas pequeñas obtenidas por extracción en solución que pertenecen a

desintegrinas (Des) de pesos moleculares menores a 10 KDa. y metaloproteinasas de tipo II (SVMP-II) y (SVMP-III). Dentro de los 40 a los 65 min se encontraron proteínas de mediano peso molecular como las PLA₂, SVMP-II, proteínas secretoras ricas en cisteína (CRISP), serin proteasas (SVSP), péptido potenciador de bradicinina (BPP) y l-amino acida oxidasa (LAAO) los cuales oscilaron entre los 11 y 40 KDa. aproximadamente. Mientras que las proteínas más grandes e hidrofóbicas eluyeron a partir de los 75 hasta los 90 minutos. Varias de las fracciones encontradas en este grupo mostraron estar conformadas por varios tipos de proteínas. Se hallaron principalmente SVMP-III, LAAO, 5'-nucleotidasa (SV5N) y fosfodiesterasa (PDE).

El fraccionamiento del veneno por RP-HPLC señala una amplia elución de proteínas a lo largo de todo el tiempo de corrida siendo las PLA₂ las toxinas más abundantes (37.7 %). El principal responsable de esta abundancia es la fracción 14 que representa un 27.75 % respecto al veneno total. Estos resultados concuerdan con varios investigadores en donde se evidencia que las serpientes *B. schlegelii* de Costa Rica adultas se caracterizan por contener PLA₂ miotóxicas en mayor abundancia y ausencia de proteínas de tipo lectina tipo C (CTL) [23,27]. Sin embargo, el veneno de *B. schlegelii* suele contener la presencia de un inhibidor de tipo Kazal (Kazal) reportado por varios autores que eluyen aproximadamente entre a los 70-80 min en especímenes adultos [11,26]. En este caso, Kazal no se encontró dentro del perfil proteómico. Sin embargo, no se descarta la existencia de dicha proteína ya que no se logró una identificación total de las fracciones del veneno.

Con respecto a los ensayos toxicológicos, de acuerdo a este estudio se puede determinar que el veneno de *B. schlegelii* no es hemorrágico en las dosis probadas. Lo cual se asemeja a resultados similares evaluados en otros ensayos de especímenes colombianos y ecuatorianos [10,32]. Las SVMP son una de las principales toxinas involucradas en procesos hemorrágicos ya que degradan las proteínas de la membrana basal en la pared de los vasos sanguíneos [58]. Por lo tanto, al estar presentes en el veneno *B. schlegelii* como se evidenció en el análisis MS, así como indirectamente en el ensayo caseinolítico que presencié una baja actividad proteolítica, es probable que la ausencia de actividad hemorrágica ocurra debido a una pérdida de actividad funcional por parte de las metaloproteinasas [32,58]. El análisis proteómico permitió identificar que el 19,95 % son SVMP. Sin embargo, dentro de este grupo las subclases SVMP-I, SVMP-II y SVMP-III comprenden el 10.37, 6.72 y 2.86 % respectivamente. Las SVMP-I son pequeñas toxinas que en comparación con las potentes SVMP-III producen una

actividad hemorrágica relativamente débil[58]. Otras investigaciones, también sugieren una baja actividad hemorrágica en venenos de esta especie en Colombia [59], pero una mayor actividad hemorrágica para venenos de especímenes de Costa Rica [14]. Lo cual evidencia la alta variabilidad de los venenos de serpientes dentro de una misma especie y refuerza la idea de investigación a niveles más específicos como el proteómico.

Para el ensayo de edema, se evidenció una notable actividad inflamatoria en la pata de los ratones al cabo de 1 hora. El porcentaje de inflamación inducido por la concentración más alta fue de 34.9 % y 28 % para la más baja. La evolución temporal del edema tiene su punto más alto una hora después de la inyección del veneno y disminuye casi en su totalidad al cabo de 6 horas. Actividades muy similares han sido reportadas en venenos *B. schlegelii* de Colombia y Costa Rica donde el efecto edematogénico llega al máximo entre 0.5 y 1 hora, pero el edema provocado por el veneno costarricense mostró ser más prolongado e intenso [14,32]. Este efecto local se evidencia por un común aumento de volumen, migración de células inmunitarias y degradación tisular del área [60]. Varias de las familias de proteínas encontradas en esta investigación pueden ser claves en el proceso inflamatorio, sin embargo, destacan las PLA₂ miotóxicas características del veneno de *B. schlegelii*. Como prueba fehaciente de una alta actividad PLA₂ se tiene el ensayo enzimático sobre el sustituto de fosfolípidos sintético NOBA. Esta alta actividad PLA₂ en relación a los venenos controles es comparable con otras serpientes de la misma especie que también exhiben una alta actividad PLA₂ respecto a otros venenos controles [14]. Estas toxinas además de provocar miotoxicidad generan eventos inflamatorios y nociceptivos (relacionados con el dolor)[61]. Por lo cual, la inflamación local y el dolor son eventos muy comunes en accidentes ofídicos por *B. schlegelii*.

Los BPP son péptidos que actúan como potenciadores de las demás toxinas dentro de los venenos de serpientes y participan en el mecanismo del dolor. Gracias a su potente capacidad vasodilatadora provocan la contracción del musculo, aumentando la permeabilidad vascular. Esto permite una rápida difusión del veneno a través del sistema circulatorio y un shock hipotensor. Estos péptidos fueron encontrados en las fracciones 27, 20 y 19 en algunas de sus bandas. A pesar de que conforman una pequeña parte (0.02 %) dentro del arsenal venómico de esta serpiente, su rol es imprescindible para comprender la evolución del envenenamiento y su sinergia con otras toxinas.

Las LAAO están ampliamente distribuidas en las serpientes Viperidae, Crotalidae y

Elapidae. Estas toxinas son, específicamente flavoenzimas que catalizan la desaminación oxidativa de una amplia gama de l-aminoácidos para formar -cetoácidos, H_2O_2 y amoníaco [62]. Por lo cual, hay varios enfoques que se pueden realizar con LAAO para actividades antimicrobianas, antivirales, anti-VIH y de proliferación de células tumorales[24]. Una de las LAAO identificadas que se encontró en la fracción 20 se conoce que de forma aislada exhibe actividades antiprotozoarias contra *Leishmania sp.* y *Trypanosoma cruzi* mediadas por H_2O_2 [63]. El 3.72 % de las proteínas encontradas en este estudio representan LAAO sin embargo en su gran mayoría son proteínas registradas en UniProtKB pero sin evidencia experimental. En general, los efectos biológicos de este tipo de proteínas involucran la agregación plaquetaria, formación de edema, hemorragia y citotoxicidad [62]. Para la fracción 24 se identificó una LAAO la cual inhibe la agregación plaquetaria mediante la interacción entre la integrina plaquetaria $\alpha IIb\beta 3$ activada y el fibrinógeno debido a la generación continua de H_2O_2 [64]. Esta también es capaz de inducir apoptosis en células endoteliales, sin embargo, el mecanismo aun es incierto y se descarta que sea por H_2O_2 [65].

La actividad letal se evaluó en un rango inicial de 25, 50, 100 y 200 μg de veneno diluidos en 200 μl de PBS. Sin embargo, ninguna de estas concentraciones provocó efectos letales después de 48 horas. En consecuencia, se añadió la concentración más alta (300 $\mu g/200 \mu l$). Al cabo de 10 horas murió el 50 % de la población y a las 24 horas el 75 %. No ocurrieron más decesos hasta el final del experimento. La letalidad es el evento que puede llegar a ser consecuencia de la acción de todas las biomoléculas presentes en el veneno. Una forma de medir la toxicidad relativa de una sustancia tan compleja como el veneno de serpiente y compararla con otra es mediante la dosis letal media (LD_{50}) necesaria para matar al 50 % de la población. A partir de todas las observaciones se calculó el valor de LD_{50} resultando en 15.4 mg/ kg o 308.7 $\mu g/ g$. Un valor alto en comparación con las serpientes venenosas más comunes [10]. Esto quiere decir que *B. schlegelii* necesita una gran cantidad de veneno en mamíferos para provocar efectos letales. Otros autores obtienen valores de 206.0 $\mu g/ g$ [66], 184.8 $\mu g/ g$ [14] Colombia, 130 $\mu g/ g$ Ecuador[10] y 112 $\mu g/ g$ Costa Rica[14]. En líneas generales, se evidencia una baja actividad letal por parte de estos venenos, especialmente de los especímenes ecuatorianos y colombianos. Como se mencionó anteriormente, el envenenamiento involucra una serie de eventos como paro respiratorio, trastornos hemorrágicos, daños tisulares, entre otros, que pueden llegar a ser letales. Si bien la baja actividad letal supone efectos tóxicos menos graves, las víctimas pueden sufrir daños irreversibles que generen la necesidad de amputación o discapacidades permanentes. El hecho de que

la serpiente *B. schlegelii* registre la mayoría de sus mordeduras en el tronco superior de las víctimas debido a sus hábitos arbóreos le da mucho más énfasis al control de los efectos locales en un tratamiento[38].

El antiofídico (BAV) producido por el Instituto Butantan inmunizado con mezcla de venenos de *B. jararaca* (50 %), *B. jararacussu* (12,5 %), *B. moojeni* (12,5 %), *B. neuwiedi* (12,5 %) y *B. alternatus* (12,5 %) disminuye considerablemente el efecto letal del veneno de *B. schlegelii* logrando neutralizaciones mayores al 70 % [14]. Esta reacción inmunológica entre antiveneno y veneno sugiere la neutralización de varios efectos tóxicos. En un estudio donde se evaluó la neutralización a nivel proteómico, se demostró que no todas las fracciones del veneno de *B. schlegelii* separadas por HPLC se neutralizan en presencia del antiveneno polivalente (Crotalino) del Instituto Clodomiro Picado (ICP) [11]. A pesar de la capacidad de reacción cruzada del antiveneno polivalente existieron proteínas de peso molecular entre 20 a 25 kDa. que débilmente fueron reconocidas por el antiveneno mediante el análisis Western blot. El veneno de *B. schlegelii* de Ecuador puede ser neutralizado por antivenenos polivalentes [11,14], debido a las similitudes del perfil toxicológico halladas en este estudio. Principalmente, en referencia a la actividad letal, hemorragia y edema. Sin embargo, se recomienda ensayos de carácter preclínicos para validar completamente cualquier tratamiento.

CAPÍTULO V: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

- Este estudio representa la primera caracterización del veneno de *B. schlegelii* a nivel proteómico en el Ecuador. La caracterización del veneno mediante la estrategia de análisis empleada muestra que las familias de proteínas identificadas más abundantes corresponden a: PLA₂ en 34.7 %, SVSP en 23.35 % y SVMP en 19.95 %. Dentro de las SVMP se identificaron las subfamilias SVMP-I, SVMP-II y SVMP-III que representan el 10.37 %, 6.72 % y 2.86 % respectivamente. Además, se identificaron: L-aminoácido oxidasas (3.52 %), desintegrinas (1.92 %), proteínas secretoras ricas en cisteína (0.89%), péptidos potenciadores de bradicinina (0.2 %), 5'-nucleotidasas (0.81 %) y fosfodiesterasas (0.53 %). Hubo un porcentaje de 14.13 % de proteínas que no fueron asignadas a ninguna familia.
- A pesar de determinarse una baja actividad letal (LD₅₀= 15.4 mg/kg) en mamíferos los ensayos enzimáticos corroboraron la presencia de varias de estas familias de proteínas. El veneno de *B. schlegelii* se caracterizó por una alta actividad fosfolipasa en relación a venenos control de *Bo. atrox* y *Bo. asper*. Se evidenció una considerable actividad SVSP y LAAO, pero una baja actividad proteolítica. El efecto inflamatorio del veneno mostró un incremento de edema hasta un 34.9 % para la concentración más alta en ratones CD-1 después de 1 hora. Sin embargo, no se detectó actividad hemorrágica.
- Tomando en cuenta la amplia distribución que abarca esta serpiente en América Central y el norte de América del Sur es imprescindible este tipo de estudios en todo el rango geográfico donde habita para obtener una comprensión completa de la venómica. La proteómica ofrece una visión mucho más detallada e indispensable para la generación de terapias con antivenenos para que sean mejores y más eficientes. Especialmente cuando se trata de especies de alta variabilidad y distribución como *B. schlegelii*. Al revelar la composición proteica del veneno, esta información puede ser útil como base y predicción en el pronóstico clínico después del envenenamiento y proporciona una mejor guía para la producción de un antiveneno eficaz. Además, las proteínas detectadas en *B. schlegelii* podrían investigarse selectivamente en busca de potenciales moléculas terapéuticas.

REFERENCIAS

1. Kasturiratne A, Wickremasinghe AR, de Silva N, Gunawardena NK, Pathmeswaran A, Premaratna R, et al. The Global Burden of Snakebite: A Literature Analysis and Modelling Based on Regional Estimates of Envenoming and Deaths. *PLoS Med.* 2008;5: e218. Available: <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.0050218>
2. María Gutiérrez J, León G, Lomonte B, Angulo Y. Antivenoms for snakebite envenomings. *Inflammation & Allergy-Drug Targets (Formerly Current Drug Targets-Inflammation & Allergy)(Discontinued)*. 2011;10: 369–380.
3. Ochoa-Avilés A, Heredia-Andino OS, Escandón SA, Celorio-Carvajal CA, Arias-Peláez MC, Zaruma-Torres F, et al. Viperidae snakebites in Ecuador: A review of epidemiological and ecological aspects. *Toxicon X.* 2020;7: 100051. doi:<https://doi.org/10.1016/j.toxcx.2020.100051>
4. Valencia JH, Garzón K, Elena BM, Oxford P. Serpientes venenosas del Ecuador: sistemática, taxonomía, historia natural, conservación, envenenamiento y aspectos antropológicos. Fundación Herpetológica Gustavo Orcés; 2016.
5. Chippaux J-P. Guidelines for the production, control and regulation of snake antivenom immunoglobulins. *Biol Aujourd'hui.* 2010;204: 87–91.
6. Townsend JH, Medina-Flores M, Wilson LD, Jadin RC, Austin JD. A relict lineage and new species of green palm-pitviper (Squamata, Viperidae, *Bothriechis*) from the Chortís Highlands of Mesoamerica. *Zookeys.* 2013; 77.
7. Mackessy SP. Morphology and ultrastructure of the venom glands of the northern pacific rattlesnake *Crotalus viridis oreganus*. *J Morphol.* 1991;208: 109–128. doi:<https://doi.org/10.1002/jmor.1052080106>
8. Koh DCI, Armugam A, Jeyaseelan K. Snake venom components and their applications in biomedicine. *Cell Mol Life Sci.* 2006;63: 3030–3041.
9. Calvete JJ, Sanz L, Angulo Y, Lomonte B, Gutiérrez JM. Venoms, venomomics, antivenomics. *FEBS Lett.* 2009;583: 1736–1743. doi:10.1016/j.febslet.2009.03.029
10. Kuch U, Mebs D, Gutiérrez JM, Freire A. Biochemical and biological characterization of Ecuadorian pitviper venoms (genera *Bothriechis*, *Bothriopsis*, *Bothrops* and *Lachesis*). *Toxicon.* 1996;34: 714–717.
11. Lomonte B, Escolano J, Fernández J, Sanz L, Angulo Y, Gutiérrez JM, et al. Snake venomomics and antivenomics of the arboreal neotropical pitvipers *Bothriechis lateralis* and *Bothriechis schlegelii*. *J Proteome Res.* 2008;7: 2445–2457.
12. Galofre-Ruiz M. ENVENOMATION CAUSED BY THE BITE OF THE SNAKE BOTHRIECHIS SCHLEGELII. REPORT OF TWO CASES IN COLOMBIA . Case reports . *scieloco* ; 2017. pp. 5–11.
13. Gutiérrez JM, Chaves F. Proteolytic, hemorrhagic and myonecrotic effects of the venoms of Costa Rican snakes from the genera *Bothrops*, *Crotalus* and *Lachesis* (author's transl). *Toxicon.* 1980;18: 315–321.
14. Prezotto-Neto JP, Kimura LF, Alves AF, Gutiérrez JM, Otero R, Suarez AM, et al. Biochemical and biological characterization of *Bothriechis schlegelii* snake venoms from Colombia and Costa Rica. *Exp Biol Med.* 2016;241: 2075–2085.
15. Lomonte B, Díaz C, Chaves F, Fernández J, Ruiz M, Salas M, et al. Comparative characterization of Viperidae snake venoms from Perú reveals two compositional patterns of phospholipase A2 expression. *Toxicon X.* 2020;7: 100044.
16. Garzón-Santomaro C, Sánchez-Nivicela JC, Mena-Valenzuela P, González-Romero D, Mena-Jaén J. Anfíbios, reptiles y aves de la provincia de El Oro. Una guía para la identificación de especies del páramo al manglar 2a Ed Quito: Serie de Publicaciones GADPEO-INABIO. 2019.
17. Ramos PM. Datos sobre la dieta de *Bothriechis schlegelii* (Berthold, 1846)(Serpentes-Viperidae) en el Occidente del Ecuador. *Boletín Técnico, Serie Zoológica.* 2010;9.
18. Avendaño Mora KT. Accidente ofídico, manejo clínico y sus complicaciones en el Area de Emergencia del Hospital Martín Icaza de Babahoyo en el período 2013-2014. Universidad de Guayaquil. Facultad de Ciencias Médicas. Escuela de Medicina; 2016.
19. Otero R. Manual de diagnóstico y tratamiento del accidente ofídico. Manual de diagnóstico y tratamiento del accidente ofídico. 1994. p. 87.
20. Campbell JA. The distribution, variation, and natural history of the Middle American montane pitviper, *Porthidium godmani*. *Biology of the Pitvipers.* 1992; 223–250.
21. Calvete JJ, Juárez P, Sanz L. Snake venomomics. Strategy and applications. *Journal of Mass Spectrometry.* 2007;42: 1405–1414. doi:<https://doi.org/10.1002/jms.1242>
22. Georgieva D, Arni RK, Betzel C. Proteome analysis of snake venom toxins: pharmacological insights. *Expert Rev Proteomics.* 2008;5: 787–797. doi:10.1586/14789450.5.6.787
23. Pla D, Sanz L, Sasa M, Acevedo ME, Dwyer Q, Durban J, et al. Proteomic analysis of venom

- variability and ontogeny across the arboreal palm-pitvipers (genus *Bothriechis*). *J Proteomics*. 2017;152: 1–12.
24. Vargas Muñoz LJ, Estrada-Gomez S, Núñez V, Sanz L, Calvete JJ. Characterization and cDNA sequence of *Bothriechis schlegelii*-aminic acid oxidase with antibacterial activity. *Int J Biol Macromol*. 2014;69: 200–207. doi:10.1016/j.ijbiomac.2014.05.039
 25. Tsai IH, Chen YH, Wang YM, Tu MC, Tu AT. Purification, sequencing, and phylogenetic analyses of novel Lys-49 phospholipases A(2) from the venoms of rattlesnakes and other pit vipers. *Arch Biochem Biophys*. 2001;394: 236–244. doi:10.1006/abbi.2001.2524
 26. Fernández J, Gutiérrez JM, Calvete JJ, Sanz L, Lomonte B. Characterization of a novel snake venom component: Kazal-type inhibitor-like protein from the arboreal pitviper *Bothriechis schlegelii*. *Biochimie*. 2016;125: 83–90. doi:https://doi.org/10.1016/j.biochi.2016.03.004
 27. Lomonte B, Tsai W-C, Bonilla F, Solórzano A, Solano G, Angulo Y, et al. Snake venomomics and toxicological profiling of the arboreal pitviper *Bothriechis supraciliaris* from Costa Rica. *Toxicon*. 2012;59: 592–599. doi:https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2012.01.005
 28. Fernández J, Lomonte B, Sanz L, Angulo Y, Gutiérrez JM, Calvete JJ. Snake Venomomics of *Bothriechis nigroviridis* Reveals Extreme Variability among Palm Pitviper Venoms: Different Evolutionary Solutions for the Same Trophic Purpose. *J Proteome Res*. 2010;9: 4234–4241. doi:10.1021/pr100545d
 29. Rivera I. APLICACIÓN DE LA ESTRATEGIA FARMACOLÓGICA PARA DISMINUIR LAS COMPLICACIONES POR ACCIDENTE OFÍDICO EN EL “HOSPITAL JOSÉ MARÍA VELASCO IBARRA.” ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO. 2019.
 30. Gil Yepes JD. Complicaciones en pacientes con accidente ofídico atendidos en el Hospital José María Velasco Ibarra de Tena en el período 2015-2016. 2018.
 31. Fan HW, Vigilato MAN, Pompei JCA, Gutiérrez JM. Situación de los laboratorios públicos productores de antivenenos en América Latina. *Revista Panamericana de Salud Pública*. 2019;43.
 32. Montealegre-Sánchez L, Montoya-Gómez A, Jiménez-Charris E. Individual variations in the protein profiles and functional activities of the eyelash palm pit-viper (*Bothriechis schlegelii*) venom from the Colombian southwest region. *Acta Trop*. 2021;223: 106113.
 33. Núñez V, Cid P, Sanz L, La P De, Angulo Y, Lomonte B, et al. Snake venomomics and antivenomics of *Bothrops atrox* venoms from Colombia and the Amazon regions of Brazil, Perú and Ecuador suggest the occurrence of geographic variation of venom phenotype by a trend towards paedomorphism. *J Proteomics*. 2009;73: 57–78. doi:10.1016/j.jprot.2009.07.013
 34. Alape-Girón A, Sanz L, Escolano J, Flores-Díaz M, Madrigal M, Sasa M, et al. Snake venomomics of the lancehead pitviper *Bothrops asper*: geographic, individual, and ontogenetic variations. *J Proteome Res*. 2008;7: 3556–3571.
 35. Otero R, Gutiérrez J, Mesa MB, Duque E, Rodríguez O, Arango JL, 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*. 2002;40: 1107–1114.
 36. Reid DE. Los Géneros de Anfibios y reptiles de Colombia, III: Tercera Parte: Reptiles; Orden de las Serpientes. *Caldasia*. 1944.
 37. Savage. JM. The Amphibians and Reptiles of Costa Rica: A Herpetofauna Between Two Continents, Between Two Seas. University of Chicago. 2002;53: 934. doi:10.1080/10635150490424619
 38. Campbell JA, Lamar WW, Brodie ED. The venomous reptiles of the western hemisphere. Comstock Pub. Associates Ithaca [NY]; 2004.
 39. Harvey AL, Bradley KN, Cochran SA, Rowan EG, Pratt JA, Quillfeldt JA, et al. What can toxins tell us for drug discovery? *Toxicon*. 1998;36: 1635–1640.
 40. e Silva MR, Beraldo WT, Rosenfeld G. Bradykinin, a hypotensive and smooth muscle stimulating factor released from plasma globulin by snake venoms and by trypsin. *American Journal of Physiology-Legacy Content*. 1949;156: 261–273.
 41. Fernandez JH, Neshich G, Camargo ACM. Using bradykinin-potentiating peptide structures to develop new antihypertensive drugs. *Genet Mol Res*. 2004;3: 554–563.
 42. Calvete JJ. Proteomic tools against the neglected pathology of snake bite envenoming. *Expert Rev Proteomics*. 2011;8: 739–758.
 43. Lomonte B, Fernández J, Sanz L, Angulo Y, Sasa M, Gutiérrez JM, et al. Venomous snakes of Costa Rica: Biological and medical implications of their venom proteomic profiles analyzed through the strategy of snake venomomics. *J Proteomics*. 2014;105: 323–339. doi:10.1016/j.jprot.2014.02.020
 44. Hernández-Altamirano JA, Salazar-Valenzuela D, Medina-Villamizar EJ, Quirola DR, Patel K, Vaiyapuri S, et al. First insights into the venom composition of two Ecuadorian coral snakes. *Int J Mol Sci*. 2022;23: 14686.
 45. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970;227: 680–685.
 46. Sanz L, Quesada-Bernat S, Ramos T, Casais-e-Silva LL, Corrêa-Netto C, Silva-Haad JJ, et al. New insights into the phylogeographic distribution of the 3FTx/PLA2 venom dichotomy across genus *Micrurus* in South America. *J Proteomics*. 2019;200: 90–101. doi:https://doi.org/10.1016/j.jprot.2019.03.014

47. Lomonte B, Gutiérrez JM. Proteolytic activity of snake venoms of Costa Rica on casein. *Rev Biol Trop*. 1983;31: 37–40.
48. Holzer M, Mackessy SP. An aqueous endpoint assay of snake venom phospholipase A2. *Toxicon*. 1996;34: 1149–1155.
49. Resende LM, Almeida JR, Schezaro-Ramos R, Collaço RCO, Simioni LR, Ramirez 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*. 2017;127: 22–36.
50. Calgarotto AK, Damico DCS, Ponce-Soto LA, Baldasso PA, Da Silva SL, Souza GHMF, et al. Biological and biochemical characterization of new basic phospholipase A2 BmTX-I isolated from *Bothrops moojeni* snake venom. *Toxicon*. 2008;51: 1509–1519. doi:<https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2008.03.030>
51. Munekiyo SM, Mackessy SP. Effects of temperature and storage conditions on the electrophoretic, toxic and enzymatic stability of venom components. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*. 1998;119: 119–127.
52. Sant'Ana CD, Ticli FK, Oliveira LL, Giglio JR, Rechia CG V, Fuly AL, et al. BjuSSuSP-I: a new thrombin-like enzyme isolated from *Bothrops jararacussu* snake venom. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol*. 2008;151: 443–454.
53. Kishimoto M, Takahashi T. A spectrophotometric microplate assay for L-amino acid oxidase. *Anal Biochem*. 2001;298: 136–139.
54. León G, Valverde JM, Rojas G, Lomonte B, Gutiérrez JM. 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*. 2000;38: 233–244.
55. Kondo H, KONDO S, IKEZAWA H, MURATA R, OHSAKA A. Studies on the quantitative method for determination of hemorrhagic activity of Habu snake venom. *Jpn J Med Sci Biol*. 1960;13: 43–51.
56. Calvete JJ, Lomonte B, Saviola AJ, Bonilla F, Sasa M, Williams DJ, et al. Mutual enlightenment: A toolbox of concepts and methods for integrating evolutionary and clinical toxinology via snake venomomics and the contextual stance. *Toxicon X*. 2021;9–10: 100070. doi:<https://doi.org/10.1016/j.toxcx.2021.100070>
57. Lomonte B, Calvete JJ. Strategies in 'snake venomomics' aiming at an integrative view of compositional, functional, and immunological characteristics of venoms. *Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases*. 2017;23.
58. Markland FS. Snake venoms and the hemostatic system. *Toxicon*. 1998;36: 1749–1800.
59. Otero R, Guillermo Osorio R, Valderrama R, Augusto Giraldo C. [Pharmacologic and enzymatic effects of snake venoms from Antioquia and Choco (Colombia)]. *Toxicon*. 1992;30: 611–620. doi:[10.1016/0041-0101\(92\)90855-y](https://doi.org/10.1016/0041-0101(92)90855-y)
60. 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. *Front Immunol*. 2019;10: 1882. doi:[10.3389/fimmu.2019.01882](https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01882)
61. Teixeira CFP, Landucci ECT, Antunes E, Chacur M, Cury Y. Inflammatory effects of snake venom myotoxic phospholipases A2. *Toxicon*. 2003;42: 947–962. doi:<https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2003.11.006>
62. Du X-Y, Clemetson KJ. Snake venom L-amino acid oxidases. *Toxicon*. 2002;40: 659–665. doi:[https://doi.org/10.1016/S0041-0101\(02\)00102-2](https://doi.org/10.1016/S0041-0101(02)00102-2)
63. França SC, Kashima S, Roberto PG, Marins M, Ticli FK, Pereira JO, et al. Molecular approaches for structural characterization of *Bothrops* L-amino acid oxidases with antiprotozoal activity: cDNA cloning, comparative sequence analysis, and molecular modeling. *Biochem Biophys Res Commun*. 2007;355: 302–306. doi:<https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2006.12.217>
64. Takatsuka H, Sakurai Y, Yoshioka A, Kokubo T, Usami Y, Suzuki M, et al. Molecular characterization of L-amino acid oxidase from *Agkistrodon halys blomhoffii* with special reference to platelet aggregation. *Biochim Biophys Acta*. 2001;1544: 267–277. doi:[10.1016/s0167-4838\(00\)00229-6](https://doi.org/10.1016/s0167-4838(00)00229-6)
65. Suhr SM, Kim DS. Identification of the snake venom substance that induces apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun*. 1996;224: 134–139. doi:[10.1006/bbrc.1996.0996](https://doi.org/10.1006/bbrc.1996.0996)
66. Otero R, Osorio RG, Valderrama R, Giraldo CA. Efectos farmacologicos y enzimaticos de los venenos de serpientes de Antioquia y Choco (Colombia). *Toxicon*. 1992;30: 611–620. doi:[https://doi.org/10.1016/0041-0101\(92\)90855-Y](https://doi.org/10.1016/0041-0101(92)90855-Y)