



UNIVERSIDAD REGIONAL AMAZÓNICA IKIAM

FACULTAD DE CIENCIAS DE LA VIDA

CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

**CARACTERIZACIÓN DEL PERFIL BIOQUÍMICO, TOXICOLÓGICO
DE *BOTHROPS TAENIATUS* Y SU INMUNORECONOCIMIENTO
POR ANTIVENENO**

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

INGENIERIA EN BIOTECNOLOGÍA

AUTOR: CAMILA MICAELA FREIRE TORRES

TUTOR: PhD. CAROLINA DEL CARMEN PROAÑO BOLAÑOS

Napo – Ecuador
2023

DECLARACIÓN DE DERECHOS DE AUTOR

Yo, Camila Micaela Freire Torres, con documento de identidad N° 1805401278, declaro que los resultados Obtenidos en la investigación que presento en este documento final, previo a la obtención del título de Ingeniería 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.

Tena, 14 de septiembre de 2023



Camila Micaela Freire Torres

C.I. 1805401278

AUTORIZACIÓN DE PUBLICACIÓN EN EL REPOSITORIO INSTITUCIONAL

Yo, Camila Micaela Freire Torres, con documento de identidad N° 1805401278, en calidad de autora y titular de los derechos morales y patrimoniales del trabajo de titulación: Caracterización del perfil bioquímico, toxicológico de *Bothrops taeniatus* y su inmunoreconocimiento por antiveneno. De conformidad con el Art. 114 del CÓDIGO ÓRGANICO 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, 14 de septiembre de 2023



Camila Micaela Freire Torres

C.I. 1805401278

CERTIFICADO DE DIRECCIÓN DE TRABAJO DE INTEGRACIÓN CURRICULAR

Certifico que el Trabajo de Integración Curricular Titulado: Caracterización del perfil bioquímico, toxicológico de *Bothrops taeniatus* y su inmunoreconocimiento por antiveneno, en la modalidad: Tesis, fue realizado por: Camila Micaela Freire Torres, 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, 14 de septiembre de 2023



PhD. Carolina del Carmen Proaño Bolaños

C.I. 1714818760

PhD. José Rafael De Almeida

C.I. 1757448954

DEDICATORIA

Este trabajo principalmente se lo dedico a mi abuela, madrina, y segunda madre, la Lic. Ligia Carlota Castellanos Sevilla. Fuiste mi fuente de inspiración durante toda mi carrera, tu apoyo constante y tu preocupación me inspiraba a continuar estudiando e investigando lo que me gusta. Estoy segura de que si vieras todo lo que he logrado estarías muy orgullosa de mí, abuelita. Me hubiese gustado mucho que estuvieras conmigo en esta etapa final de mi carrera.

A mis padres, Greta Torres y Roberto Freire. Ustedes, junto a mi abuelita, fueron parte de todo mi crecimiento, tanto académico, como personal. Su apoyo invaluable durante toda mi vida fue motor no solo de esta investigación, sino, también de que me pueda levantar diariamente. A mi hermano, Samuel Freire, la verdad, gracias a ti escogí la carrera de ingeniería en Biotecnología, y fuiste pieza clave para desarrollar mi instinto investigador desde muy niña.

Finalmente, y aunque talvez nunca entienda las palabras de este escrito, este trabajo se lo dedico a mi hijo, mi gatito Milky, no sé qué hubiera hecho sin ti en mi vida. Tu fuiste todo mi apoyo en mis momentos de estrés, frustración y desmotivación. Con tus locuras hacías que mi mente se despeje y que piense de mejor manera todo.

A todos ustedes los quiero mucho.

AGRADECIMIENTO

Primero me quiero agradecer a mí misma, por ser alguien fuerte, tener valentía para enfrentar todas las adversidades que se me han presentado a lo largo de mi trayectoria académica, y por ser muy perseverante. Agradezco a mis padres, por su apoyo incondicional en todo. Sobre todo, a mi madre, que incansablemente me ha acompañado en mis peores momentos, y se ha desvelado junto a mí durante mis malas noches realizando tareas o estudiando. Gracias por todos sus consejos, y su apoyo emocional y económico.

Quiero agradecer a todos mis amigos que me apoyaron con sus palabras durante toda mi carrera, sobre todo a mi mejor amiga, Evelyn Cuesta. Gracias por estar para mí cuando más necesitaba un confidente. Tu apoyo constante y tus palabras de aliento han significado mucho. Gracias por recordarme siempre que soy capaz de lograr todo lo que me proponga. También quisiera agradecer a mis mejores amigos Antonio Vera y Jordy Infante por su apoyo incondicional durante todo este proceso. Su presencia fue invaluable, ya que me brindaron palabras alentadoras que me inspiraron cuando más lo necesitaba. Estoy profundamente agradecido por su amistad y respaldo, y no puedo expresar lo importante que ha sido contar con ustedes.

Agradezco profundamente a mis tutores el PhD. Rafael de Almeida y la PhD. Carolina Proaño, por su paciencia, y comprensión durante este proceso. A mis amigos y compañeros del grupo de investigación Josselin Hernández, Jefferson García, Eugenio Andrade, y Juan Diego Sacoto, por su colaboración y apoyo durante este trabajo.

Quiero expresar mis sinceros agradecimientos a todos mis profesores que me apoyaron y estuvieron presentes durante mi trayectoria académica universitaria. Sus enseñanzas fueron de gran ayuda durante la elaboración de este trabajo. Asimismo, estoy muy agradecida con la Dra. María Terán y con el INSPI, por permitirnos a mí y a mis compañeros, trabajar y colaborar juntos, y utilizar sus instalaciones durante el desarrollo de esta investigación.

TABLA DE CONTENIDO

CARÁTULA

DECLARACIÓN DE DERECHOS DE AUTOR.....	i
AUTORIZACIÓN DE PUBLICACIÓN EN EL REPOSITORIO INSTITUCIONAL	ii
CERTIFICADO DE DIRECCIÓN DE TRABAJO DE INTEGRACIÓN CURRICULAR.....	iii
DEDICATORIA.....	iv
AGRADECIMIENTO.....	v
TABLA DE CONTENIDO	vi
ÍNDICE DE TABLAS	vii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	viii
RESUMEN.....	ix
ABSTRACT	x
CAPITULO I: PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN	1
1.1. Antecedentes	1
1.1.1. Historia de la toxicología	1
1.1.2. Evolución del tratamiento de mordeduras de serpientes: de la toxinología a los antivenenos	2
1.1.3. Venómica: Historia y métodos de caracterización de venenos de serpientes	6
1.1.4. Composición química y actividad biológica del veneno de <i>Bothrops</i>	7
1.1.5. <i>B. taeniatus</i> : Composición, actividad biológica e inmunoreactividad	12
1.2. Planteamiento del Problema.....	14
1.3. Justificación	16
1.4. Objetivos de la Investigación	17
1.4.1. General	17
1.4.2. Específicos.....	17
CAPITULO II: METODOLOGÍA.....	18
2.1. Obtención y preparación de la muestra.....	18
2.2. Fraccionamiento del veneno de <i>B. taeniatus</i> mediante HPLC en fase reversa	18
2.3. Electroforesis de SDS-PAGE del veneno de <i>B. taeniatus</i>	18
2.4. Digestión trípica de geles SDS- PAGE	19
2.5. Análisis por LC-MS/MS del veneno de <i>B. taeniatus</i>	20
2.6. Ensayos enzimáticos del veneno de <i>B. taeniatus</i>	20
2.6.1. Actividad caseinolítica.....	21

2.6.2.	Actividad de fosfolipasa A ₂	21
2.6.3.	Actividad de serin proteinasa	21
2.6.4.	Actividad de L-aminoxidasa	22
2.7.	Caracterización de los efectos biológicos del veneno de <i>B. taeniatus</i>	22
2.7.1.	Evaluación de efecto hemorrágico	23
2.7.2.	Evaluación de formación de edema	23
2.7.3.	Ensayos de letalidad	23
2.7.4.	Ensayos de neutralización del veneno de <i>B. taeniatus</i>	24
CAPITULO III: RESULTADOS		25
3.1.	Perfil bioquímico del veneno de <i>B. taeniatus</i>	25
3.2.	Proteómica del veneno de <i>B. taeniatus</i>	26
3.3.	Ensayos enzimáticos	35
3.4.	Ensayos biológicos	36
3.4.1.	Ensayo de edema	36
3.4.2.	Ensayo hemorrágico	37
3.4.3.	Curva de dosis - respuesta	38
3.4.4.	Ensayos de Neutralización.....	39
CAPITULO IV: DISCUSIÓN E INTERPRETACIÓN.....		42
CAPITULO V: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES		49
REFERENCIAS		

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.	Familia de proteínas identificadas por LC-MS/MS, en las fracciones del veneno de <i>B. taeniatus</i> obtenidas mediante RP-HPLC.....	28
-----------------	--	----

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Estructura terciaria de las enzimas del veneno de <i>Bothrops atrox</i> , de: a) SVMP, b) SVSP, c) PLA2, d) LAAO, y e) CTL.	11
Figura 2.	Distribución de <i>B. taeniatus</i> dentro del Ecuador, ubicada principalmente en la región Amazónica.	13
Figura 3.	Perfil cromatográfico del veneno de <i>B. taeniatus</i> (RP-HPLC), cromatograma detectado a 214 nm (UV), en el que se visualiza líneas entrecortadas en color rojo, que señalan el gradiente empleado (Acetonitrilo %).	25
Figura 4.	Perfil electroforético del veneno de <i>B. taeniatus</i> . Se visualiza el gel de electroforesis SDS-PAGE de las fracciones obtenidas. El marcador molecular (kDa) se encuentra en la parte izquierda.	26
Figura 5.	Esquematización del porcentaje de toxinas totales en el veneno de <i>B. taeniatus</i>	27
Figura 6.	Actividades enzimáticas del veneno de <i>B. taeniatus</i> : a) caseinolítica, b) fosfolipásica, c) SVSP, y d) LAAO	36
Figura 7.	Actividad edemogénica del veneno de <i>B. taeniatus</i> : a) actividad para diferentes concentraciones de veneno a lo largo del tiempo, b) efecto en la pata de un ratón después de la inyección del veneno.	37
Figura 8.	Curva de dosis-respuesta para la actividad hemorrágica del veneno de <i>B. taeniatus</i> , halo hemorrágico a diferentes concentraciones: a) Control, b) 0,25; c) 0,5; d) 1; e) 6,25; f) 12,5; g) 25 µg/ratón.	38
Figura 9.	Curva de dosis-respuesta del veneno de <i>B. taeniatus</i>	39
Figura 10.	Neutralización del efecto hemorrágico de <i>B. taeniatus</i> por suero antiofídico, a) efecto sobre el diámetro del halo hemorrágico, b) impacto en la piel de ratón: 1. Con veneno, 2. con veneno y antiveneno.	40
Figura 11.	Neutralización de la letalidad del veneno de <i>B. taeniatus</i> por el suero antiofídico polivalente del INS.	41

RESUMEN

Bothrops taeniatus, es una serpiente de la familia *Viperidae*, la cual es la responsable de una gran cantidad de accidentes ofídicos en el Ecuador. Esta víbora, siendo una de las más venenosas alrededor del mundo, tiene un especial impacto en comunidades indígenas y áreas rurales. A pesar de la existencia de antivenenos polivalentes dentro de Ecuador, estos no son específicos para *B. taeniatus*. Además, estos sueros presentan limitaciones, particularmente debido a la variabilidad en la composición del veneno. Esta investigación se desarrolló por la escasez de información sobre la caracterización de las toxinas de este veneno. Por lo que, el objetivo de este estudio fue caracterizar bioquímica y biológicamente el veneno de *B. taeniatus* en Ecuador, así como su inmunoreconocimiento por un antiveneno polivalente generado usando venenos colombianos. Se emplearon diversas técnicas como: cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa (RP-HPLC), electroforesis de gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE), cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tandem (LC-MS/MS), ensayos enzimáticos (fosfolipasa, caseinólíticos, de serino proteasa, y de L-aminooxidasa), y ensayos biológicos en modelos animales CD-1 (hemorrágico, edemogénico y de letalidad). También se evaluó la neutralización del veneno usando un antiveneno comercial. Se encontró una alta abundancia de fosfolipasas A₂ (PLA₂) y metaloproteasas de veneno de serpiente (SVMP). Los ensayos enzimáticos revelaron una fuerte actividad fosfolipásica. Asimismo, se observó un efecto edematogénico y una capacidad hemorrágica significativa. Igualmente, el suero antiofídico logró neutralizar la actividad hemorrágica y letal del veneno. En conclusión, el análisis del veneno reveló una variedad de toxinas, y variabilidad en su composición con respecto a otras investigaciones. Estos hallazgos proporcionan una base sólida para futuros estudios sobre el potencial biotecnológico de sus toxinas, así como para el desarrollo de antivenenos específicos que requieran menores dosis y reduzcan la posibilidad de reacciones adversas y potencialmente letales.

Palabras clave: Antiveneno, *Bothrops taeniatus*, genómica, inmunoreconocimiento, veneno de serpientes.

ABSTRACT

Bothrops taeniatus, a snake belonging to the *Viperidae* family, is responsible for a significant number of snakebite accidents in Ecuador. This highly venomous viper has a pronounced impact on indigenous communities and rural areas. Despite the presence of polyvalent antivenom in Ecuador, they are not specific to *B. taeniatus* venom. Moreover, these sera have limitations, primarily due to the variability in venom composition. This research emerged due to the lack of information regarding toxin characterization in this venom. Hence, the aim of this study was to biochemically and biologically characterize *B. taeniatus* venom in Ecuador, as well as its immunoreactivity with a broad-spectrum antivenom generated using Colombian venoms. Various techniques were employed, including high-performance liquid chromatography (RP-HPLC), sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE), liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC-MS/MS), enzymatic assays (phospholipase, caseinolytic, serine protease, and L-aminoxidase), and biological assays on CD-1 animal models (hemorrhagic, edematogenic, and lethality). The neutralization of venom using a commercial antivenom was also evaluated. The study revealed a high abundance of phospholipase A2 (PLA2) and snake venom metalloproteinases (SVMPs). Enzymatic assays indicated robust phospholipase activity. Furthermore, significant edematogenic and hemorrhagic effects were observed. Similarly, the antivenom serum managed to neutralize the hemorrhagic and lethal activity of the venom. In conclusion, the venom analysis unveiled a range of toxins and composition variability compared to other studies. These findings offer a strong foundation for future research on the biotechnological potential of these toxins, along with the development of specific antivenoms requiring lower doses and reducing the risk of adverse and potentially lethal reactions.

Keywords: Antivenom, *Bothrops taeniatus*, genomics, immunorecognition, snake venom.

CAPITULO I: PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

1.1. Antecedentes

1.1.1. *Historia de la toxicología*

El término toxicología deriva del griego τοξικόν (toxikon = veneno en él se sumergían las puntas de flechas) y λόγος (logos = estudio/discurso) [1,2]. La toxicología se define como la ciencia que se encarga del estudio de los efectos dañinos de los agentes químicos en los sistemas biológicos. Estas sustancias extrañas que se encuentran ausentes en el cuerpo humano reciben el nombre de xenobióticos [1,3]. Por otra parte, el término veneno se encuentra generalmente definido como una sustancia capaz de destruir la vida o causar enfermedad cuando es introducida o absorbida en pequeñas cantidades dentro de un organismo [1].

De forma específica, en los seres humanos, la toxicología se encarga de estudiar su exposición ante estas sustancias y sus respuestas tóxicas [4]. Por otra parte, la palabra toxicidad puede referirse a la capacidad inherente de un químico para causar daño a un organismo vivo. Tomando en cuenta que todos los productos químicos tienen la habilidad de producir respuestas tóxicas, es importante considerar su toxicidad en el contexto de otras sustancias [3,4]. La forma más empleada durante años para comparar la toxicidad de las sustancias es la dosis letal 50 (LD₅₀). La cual demuestra, de forma estadística, el potencial de una sustancia para causar la muerte del 50% de una población expuesta. Para ello se emplean especialmente modelos murinos en laboratorios, de acuerdo al principio de las 3Rs [3,5]. Este principio consiste en: Reemplazo (del uso de animales con técnicas alternativas, siempre y cuando sea posible), reducción (minimizar el número de animales empleados), y refinamiento (reducción de estrés y sufrimiento en animales de experimentación, mediante la mejora de estrategias) [6].

Uno de los factores que permiten contextualizar un evento de intoxicación, es el concepto de dosis-respuesta. Esta idea se refiere a la magnitud de una respuesta tóxica en relación a la cantidad de exposición química y suele representarse con gráficas que generalmente demuestran una distribución normal (Gaussiana) [3,7]. Por ello, es necesario conocer las dosis de una sustancia que puedan o no provocar toxicidad, de forma que se logre caracterizar la potencia relativa de esta. Hay dos tipos principales de relaciones dosis-

respuesta, las que exhiben un umbral y las que no. En una relación con umbral existe una cantidad mínima de exposición (dosis), donde, por debajo de este, no se observaría ningún efecto [3].

1.1.2. Evolución del tratamiento de mordeduras de serpientes: de la toxinología a los antivenenos

En los últimos años, una de las ramas derivadas de la toxicología, llamada toxinología, se ha expandido sustancialmente [8]. Esta área multidisciplinaria de investigación se encarga de estudiar la estructura detallada, función, mecanismo de acción, y la búsqueda de estrategias terapéuticas para neutralización de las toxinas [8–10]. El término toxina proviene del griego toxikon (veneno) y del sufijo -ina (sustancia) [8,11]. Las toxinas son sustancias derivadas de los tejidos de una planta, animal o microorganismo que tiene un efecto perjudicial en otros seres vivos [8]. El objetivo de la toxinología abarca diferentes aspectos. Por un lado, se busca estudiar a estos organismos tóxicos, comprendiendo su hábitat, distribución, identificación y modo de acción. Por otro lado, se explora la composición bioquímica, genómica, transcriptómica, secretómica y proteómica de los venenos [8,10]. Estos estudios tienen como finalidad comprender su interacción con diferentes miembros del ecosistema, especialmente los seres humanos. Igualmente, se busca desarrollar eficientes intervenciones que mitiguen los debilitantes efectos de la fisiopatología del envenenamiento, y descubrir el potencial farmacológico de las toxinas y su utilidad como la base para la fabricación de nuevos medicamentos [10].

Existe una gran variedad de animales, hongos y plantas que secretan veneno como una estrategia vital de defensa, o para paralizar a sus presas [8]. Los venenos son sustancias altamente complejas que incluyen toxinas que en conjunto pueden ejercer un efecto mayor que el que podría generar una sola de ellas (sinergia) [9]. Estas sustancias pueden ser empleadas para una alta gama de funciones, debido principalmente a que el veneno puede ser transferido directamente al organismo [12]. Un ejemplo de sinergia son las proteínas involucradas en la remodelación de lípidos y péptidos, las cuales facilitan la distribución de toxinas que modulan los canales iónicos y los receptores, permeabilizando las membranas lipídicas (lisolecitinas), digiriendo proteínas, y descomponiendo los tejidos conectivos [9].

En este sentido, estas especies tóxicas, es decir aquellas que poseen una toxina que puede causar daño en pequeñas dosis, pueden clasificarse en 3 categorías, en función de cómo estos compuestos llegan al objetivo: venenosas, ponzoñosas y toxigénicas [5,13]. En

caso de las especies ponzoñosas, como las ranas dardo dorada, generalmente poseen tejidos, parcial o totalmente tóxicos, por lo que pueden causar envenenamiento a través del tacto [5,13]. Por otro lado, los animales toxigénicos son capaces de producir toxinas y liberarlas al entorno. Estos animales atacan cuando se sienten molestos, sin necesidad de defenderse. Algunos ejemplos son los sapos caña o las cobras, quienes escupen su veneno [13]. Al contrario, los animales venenosos son aquellos capaces de producir esta sustancia a través de una glándula secretora o en un grupo de células especializadas, las cuales liberan toxinas por medio de mordeduras o picaduras (es decir, tienen la capacidad de inyectar su veneno) [5]. Como por ejemplo las serpientes que tienen colmillos, o los peces león que tienen espinas [13].

Las serpientes son animales que se encuentran presentes en varias partes del mundo. Existen alrededor de 2000 especies distribuidas en el planeta, de las cuales 256 son venenosas, y se encuentran clasificadas en varias familias [14]: *Elapidae*, *Viperidae* [15], *Crotalidae*, y *Hydrophidae* [16].

Se conoce que el veneno de las serpientes cumple una función defensiva, aunque también es empleado para la obtención de alimentos [5]. Estas sustancias pueden clasificarse según sus manifestaciones clínicas. Por un lado, los venenos hemotóxicos están compuestos principalmente por componentes hemostáticos que afectan el sistema de coagulación sanguínea. Por otro lado, los venenos neurotóxicos tienen la capacidad de alterar el funcionamiento de los componentes neuronales, afectando al sistema nervioso [14].

Las propiedades toxicológicas del veneno de serpiente han fascinado a la humanidad durante miles de años, y han sido estudiadas durante los últimos 400-500 años [16]. Se ha reportado el empleo de venenos de serpientes desde el siglo VII en Ayurveda (sistema médico tradicional originario de la India que se enfoca en la prevención y el tratamiento de enfermedades), para tratar problemas gastrointestinales, artritis, y para la longevidad [17]. Similarmente, médicos de la Antigua Grecia describieron las acciones farmacológicas de estas sustancias [18]. Más tarde, durante el siglo XIX, en la Edad Media, estos fluidos fueron empleados como remedio para distintas afecciones. Posteriormente, en 1934 se descubrió que estos mismos componentes tóxicos, en pequeñas dosis, poseían propiedades analgésicas, presentando una actividad mayor a la de la morfina [19]. El desarrollo del antihipertensivo Captopril, péptido potenciador de la bradicinina (aislado del

veneno de *Bothrops jararaca*), definió la edad moderna de los medicamentos provenientes de venenos de serpientes [16].

Los accidentes por mordedura de serpiente son un problema actual de salud pública, los cuales provocan morbilidad y mortalidad, sobre todo en regiones correspondientes a los trópicos [20]. Alrededor del mundo, este problema causa anualmente más de 100000 muertes, y alrededor de 400000 personas son afectadas de manera incapacitante. Las personas que viven en áreas rurales tropicales y pertenecen a poblaciones empobrecidas, son especialmente vulnerables a las mordeduras de serpientes, lo que a su vez perpetúa el ciclo de pobreza [14,21]. Dentro del Ecuador, se cuantifica 10 muertes y 1500 envenenamientos, de los cuales el 37% pertenecen a provincias amazónicas [22]. Donde, tan solo en la provincia de Napo, se reporta 133 accidentes ofídicos, de los cuales, el 67% de individuos afectados pertenecen a comunidades indígenas. Por lo tanto, este es un problema de salud pública preocupante para este país [23].

El veneno de estos animales es conocido por ser el causante de una variedad de síntomas clínicos. Está compuesto por una mezcla sinérgica y diversa de moléculas biológicamente activas. Estas moléculas pueden o no contribuir a la actividad de las toxinas presentes en el veneno [24]. Los venenos provenientes de estos animales son considerados como un complejo cóctel químico de péptidos, enzimas, carbohidratos, lípidos, metales, iones, etc. Sin embargo, se desconoce cuántos componentes con exactitud poseen [25,26].

Generalmente, la mayoría de los venenos de serpientes están formados por cuatro familias de proteínas, las cuales son: fosfolipasa A₂ (PLA₂), toxinas de tres dedos (3FTx), serino proteasa de veneno de serpiente (SVSP) y metaloproteasa de veneno de serpiente (SVMP). Asimismo, se pueden encontrar en menor frecuencia seis familias de proteínas adicionales, en las que se incluyen: proteínas secretoras ricas en cisteína (CRiSP), péptidos tipo-Kunitz (KUN), L-amino oxidasas (LAAO), péptidos natriuréticos (NP), lectinas de tipo C (CTL) y desintegrinas (DIS) [27]. Estos componentes, producidos por glándulas exocrinas especializadas, pueden causar ciertos efectos. Uno de estos es la interrupción de la habilidad del corazón de bombear sangre, causando eventualmente la muerte. A su vez, son capaces de afectar la capacidad de coagulación, lo que ocasiona hemorragias [25].

Dentro de este contexto, es importante señalar que los venenos de serpientes varían en su composición, en función de su sexo, dieta y ubicaciones geográficas, así como de

factores estacionales [28]. Esta variación influye en los síntomas clínicos observados en el envenenamiento, como la neurotoxicidad, miotoxicidad, hemotoxicidad, anticoagulante, procoagulante, hemorrágico, necrosis, daño renal y parálisis muscular. Por lo tanto, este fenómeno genera ciertos desafíos para el adecuado manejo del envenenamiento [14].

Actualmente, el único tratamiento existente para el envenenamiento por cualquier animal venenoso, es el uso de antivenenos. Estos sueros se basan en anticuerpos obtenidos del plasma de animales como caballos y ovejas, que han sido previamente hiperinmunizados con estos venenos, en dosis subletales [24]. Las investigaciones sobre los antivenenos comenzaron en 1890, cuando von Behring y Kitasato demostraron que el suero de un animal infectado con difteria confiere inmunidad contra la misma enfermedad a otros animales. Sin embargo, oficialmente estas sustancias fueron concebidas por primera vez por los científicos franceses Calmette y Phisalix en 1894 [29]. Fue desde entonces que se ha buscado optimizar a estos sueros mediante la inclusión de diversos pasos de purificación, que suelen implicar técnicas de precipitación, como parte de su fabricación. Posterior a este desarrollo inicial de la terapia de suero para el envenenamiento por mordedura de serpiente, otros países con altas incidencias de envenenamientos de animales como Brasil, Australia, Sudáfrica, Costa Rica y México, empezaron a fabricar antivenenos contra animales venenosos locales a lo largo del siglo XX [30–33].

A pesar de los esfuerzos por desarrollar antivenenos de nueva generación por medio de métodos biotecnológicos, química medicinal y tecnologías de anticuerpos, los antivenenos basados en plasma siguen siendo el único tratamiento eficaz contra envenenamiento por mordedura de serpiente [31]. Para guiar la producción de antivenenos, la OMS ha clasificado a las serpientes altamente venenosas en dos categorías. La Categoría 1 incluye serpientes que comúnmente causan mordeduras con altos niveles de morbilidad, discapacidad y mortalidad. Por otra parte, la Categoría 2 incluye a organismos con una importancia médica secundaria, ya que son menos comunes o se cuenta con menos datos epidemiológicos [34].

Existen dos tipos de antivenenos, policlonal (producido contra el veneno de diferentes especies de serpientes) o monoclonal (producido contra el veneno de una especie específica de serpiente). A pesar de que estos son el tratamiento convencional para la neutralización de toxinas, presentan algunas limitaciones [24,35]. Una de estas son las reacciones adversas desencadenadas por las proteínas animales, lo que requiere una prueba de alergia que consume tiempo antes de la administración de la terapia, en una

situación en la que el tiempo es una preocupación [32]. Las reacciones adversas provocadas por los sueros pueden clasificarse en tempranas y tardías. Las reacciones adversas tempranas ocurren dentro de las 24 horas siguientes a la administración de los antisueros y son las más graves [33,35]. Mientras que las tardías, ocurren desde 5 hasta 20 días después de la administración del antisuero. Dependiendo del tipo de reacción se debe buscar una terapia adecuada para su tratamiento. El tratamiento más recomendable, es la administración de ciertos fármacos como: antihistamínicos, glucocorticoides y catecolaminas [33].

Para promover el desarrollo de antivenenos de nueva generación eficientes, la caracterización de veneno de serpiente es esencial, en términos de identificar y cuantificar las proteínas tóxicas en venenos crudos [24]. Estas técnicas de análisis pueden ayudar a reconocer las toxinas responsables de las patologías observadas en las víctimas de mordeduras de serpiente. Para facilitar este proceso de caracterización, se han desarrollado varios enfoques, entre los más importantes se encuentran la venómica, toxicovenómica y antivenómica, los cuales tienen como finalidad mapear la composición de las toxinas del veneno, sus efectos tóxicos y la eficacia del antiveneno [36].

1.1.3. Venómica: Historia y métodos de caracterización de venenos de serpientes

En específico, el término venómica se refiere a las estrategias analíticas para revelar la composición del proteoma de los venenos de serpiente [24]. Esta palabra fue acuñada por primera vez en el 2004, y en ella se combinan técnicas de proteómica como la cromatografía líquida de alta resolución de fase inversa (RP-HPLC) y la espectrometría de masas (MS), así como la genómica y transcriptómica [36,37]. Para la venómica basada en péptidos, se emplean técnicas de MS. Para lo cual, primero se extraen las proteínas del veneno de la serpiente y luego se cortan en fragmentos más pequeños por medio de enzimas de digestión, como la tripsina [38]. Posteriormente, estos fragmentos son analizados en un espectrómetro de masas, de forma que se obtenga la composición de aminoácidos. Luego, estas secuencias son comparadas con información almacenada en bases de datos genómicas y transcriptómicas, ya sea de la misma especie o de especies diferentes [36].

Aunque la venómica ha sido utilizada durante casi 20 años, aún no existe un flujo de trabajo ampliamente aceptado. Actualmente, los enfoques de venómica más comunes combinan separaciones analíticas en conjunto con herramientas de proteómica y transcriptómica para

evaluar la composición del veneno [36]. Estos últimos avances han permitido la identificación y cuantificación (abundancia relativa) rápida de familias de proteínas dentro de estas sustancias. La recopilación de esta información, que aumenta constantemente, posibilita una rápida asimilación y evaluación de las tendencias evolutivas, variación geográfica y posibles implicaciones médicas [39]. Por otra parte, en la actualidad se ha desarrollado la antivenómica, que se encarga de investigar cuales toxinas de veneno se unen a los anticuerpos de los antivenenos [36].

Gracias a los diferentes estudios venómicos realizados durante los últimos años, se conoce un total de 57 proteínas pertenecientes al proteoma de venenos de serpientes. Entre las cuales, se puede contemplar una serie de proteínas reguladoras y familias de baja abundancia, con significado funcional o biológico desconocido. De manera general, se sabe que cada veneno de serpiente individual puede contener de entre 3 a 20 familias de proteínas de toxinas reconocidas. Se cree que cada una de estas familias de proteínas de toxinas es monofilética, es decir, cada grupo en el veneno de serpiente se deriva de un único proceso de reclutamiento al proteoma de esta sustancia, el cual es seguido por una regulación al alza en la expresión y una diversificación ortóloga [27].

1.1.4. Composición química y actividad biológica del veneno de *Bothrops*

Dentro del orden *Squamata* se incluye la familia *Viperidae*, la cual posee 331 especies de viperinos y viperinos de fosa [25,40]. En específico, existen 17 especies de viperinos de fosa, en los que se contemplan los géneros *Bothrops*, *Bothrocophias*, *Porthidium*, *Crotalus*, y *Lachesis*. Las especies provenientes de esta familia son responsables de la gran mayoría de mordeduras de serpientes registradas a nivel global [26]. En Latinoamérica, los envenenamientos por parte de accidentes ofídicos ocurren con mayor incidencia en el bosque tropical amazónico, que, debido a su biodiversidad, posee una rica fauna de serpientes venenosas, sobre todo, de la familia *Viperidae*. Las especies viperinas en la región Amazónica están clasificadas en los géneros *Bothrops*, *Bothrocophias*, *Crotalus*, y *Lachesis* [41].

Particularmente, el género *Bothrops*, es un grupo de serpientes extremadamente diverso, y se encuentra distribuido a lo largo de Centro y Sur América. Representan los taxones más significativos en términos médicos de la región (debido al alto número de accidentes que causan), y son responsables de más envenenamientos y muertes humanas

relacionadas con accidentes ofídicos, que cualquier otro género de serpiente en esta zona [42–44].

Entre los principales efectos clínicos por mordedura de este género se encuentran: efectos locales (edema, hemorragia y mionecrosis) y efectos sistémicos que resultan principalmente en trastornos de la coagulación sanguínea [42]. Dicho esto, las principales categorías de proteínas que generan efectos coagulopáticos sistémicos se componen de SVMP, SVSP, PLA₂ y CTL [43]. Todos estos componentes son los principales responsables de lesiones locales e inflamaciones, al igual que de cambios sistémicos relacionados con la hemostasia. La gran cantidad de proteasas en estas sustancias contribuyen al predominio de eventos hemorrágicos, característicos de los accidentes ofídicos por parte de este género [45]. De forma que, estas toxinas afectan los componentes de la cascada de coagulación, y alterar la formación del tapón hemostático y la agregación plaquetaria [43].

Otros componentes minoritarios identificados en los venenos de estas serpientes incluyen: LAAO, 5'-nucleotidasas (5'NT), y hialuronidasa (HA) [42,44]. Las SVSP, CTL y LAAO tienen una contribución significativa en venenos, sobre todo de las especies *Bothrops moojeni*, *B. insularis* y *B. cotiara*, respectivamente. Igualmente, estos venenos bothrópicos poseen componentes menores, como fosfodiesterasas (PDE), peptidasas, inhibidores de fosfolipasa, aminopeptidasas, CRiSP, DIS y péptidos [45].

Las SVMPs se caracterizan por su gran diversidad estructural y funcional, así como por su dependencia catalítica a iones metálicos (**véase Figura 1 a)**) [46]. En concreto, estas proteínas son dependientes de zinc y cuentan con una secuencia de péptidos ligantes de metal que contiene tres histidinas y una glicina, lo que contribuye al dominio catalítico [47]. Según su estructura, las SVMPs se clasifican en tres clases: P-I, P-II y P-III. La clase P-I está compuesta por un solo dominio de metaloproteasa, la P-II cuenta con una disintegrina adicional, y la clase P-III por metaloproteasa, disintegrina, cisteína y, en algunos casos, dominios similares a lectina [45].

Algunos de los efectos biológicos atribuidos a las SVMPs son la hemorragia y letalidad [46]. Generalmente, los miembros de la clase P-I están relacionados con eventos hemorrágicos locales discretos o ausentes. Sin embargo, también tienen actividad fibrinógenolítica relevante que afecta la hemostasia [48,49]. Por otro lado, los P-III son los predominantes en los venenos bothrópicos y son consideradas las toxinas hemorrágicas más potentes

debido a la presencia de dominios no catalíticos que favorecen la fijación y la acción dirigida sobre componentes específicos de la microvasculatura [49]. De igual modo, los venenos bothrópicos constan, también, de SVMPs del grupo A, las cuales se diferencian de las otras clases porque no dependen de cofactores para activar la protrombina [50].

Por otra parte, las SVSPs, son enzimas cuya estructura tienen un sitio catalítico altamente conservado, en el que se encuentra un residuo de serina reactivo (Ser195), asociado a residuos de histidina (His57) y aspartato (Asp102) [51]. Asimismo, posee doce residuos de cisteína que forman seis puentes disulfuro y estabilizan su estructura secundaria. Muchas de estas toxinas son glicoproteínas de cadena simple con una masa molecular que varía de 26 a 67 kDa (**véase Figura 1 b**) [51,52]. Las SVSPs influyen principalmente en la hemostasis, ya que actúan en la agregación plaquetaria, en varios factores de la cascada de coagulación, y en los sistemas fibrinolíticos y de calicreína-kinina [45].

La mayoría de las SVSPs se clasifican como proteasas tipo trombinas, esto se debe a que presentan actividad fibrinógenolítica (similar a la trombina plasmática) [52]. Estas proteínas generalmente no activan otros factores de la cascada de coagulación, y por lo tanto el coágulo de fibrina formado no presenta entrecruzamiento, lo que contribuye a su rápida eliminación a través del sistema fibrinolítico [45,51]. Por estas razones, varias SVSPs han sido estudiadas para su aplicación en tratamientos y diagnósticos de coagulopatías y enfermedades cardíacas [45].

En el caso de las fosfolipasas, estas son enzimas que participan en la hidrólisis de los fosfolípidos de las membranas y se clasifican en 5 grupos, basados en la especificidad de la hidrólisis del enlace éster a los fosfolípidos: A₁, A₂, B, C, y D. La PLA₂ y la fosfolipasa B (PLB) son las enzimas de este grupo más encontradas dentro de los venenos bothrópicos [45]. Las PLA₁s se encargan de romper el enlace éster del carbono-1 de los fosfolípidos, generando ácidos grasos como el ácido araquidónico y lisofosfolípidos [53]. Mientras que las PLA₂s clivan el enlace éster del carbono-2. Por otro lado, PLB presenta actividad de ambas fosfolipasas anteriormente mencionadas [45].

La fosfolipasa que predomina en los venenos de serpientes son las PLA₂s (**Figura 1 c**), la cual posee un bajo peso molecular, de aproximadamente 13 – 15 kDa. Además, la estructura de su polipéptido está compuesta por algunos enlaces disulfuro, y un residuo de histidina (His48) en el sitio activo [45,47,54]. Esta clase de fosfolipasa necesita de un cofactor Ca²⁺ en su sitio catalítico para poder funcionar, debido a la presencia de un residuo

de aspartato en la posición 49 de su cadena de aminoácidos [45,54]. Sin embargo, existen variaciones en el residuo 49 en algunas PLA₂s, dependiendo de la especie de serpiente. Un ejemplo común es el reemplazo de un residuo de lisina por un aspartato, este cambio compromete la unión de Ca²⁺ en el sitio catalítico. Sin embargo, a pesar de que las PLA₂s Lys49 carecen de actividad catalítica, pueden presentar alta toxicidad, y se relacionan con la miotoxicidad [45]. Por lo tanto, las PLA₂s de veneno de serpiente exhiben una amplia gama de efectos, que pueden estar o no relacionados con la actividad catalítica, como la neurotóxica, miotóxica, hemolítica, edematogénica, hiperalgésica, hipotensiva, proinflamatoria, bactericida, anticoagulante y actividades antiplaquetarias [45,47].

En cuanto a las CTL encontradas en los venenos de serpientes son proteínas que requieren la presencia de iones de calcio para unirse a mono y oligosacáridos (**Figura 1 e**). Estas proteínas pueden ser clasificadas en CTL clásicas y snaclecs. Las CTL clásicas tienen un dominio que reconoce específicamente carbohidratos. Además, son proteínas homodiméricas u homo-oligoméricas unidas por puentes disulfuro, las cuales se unen a la galactosa y son capaces de inducir la agregación plaquetaria [49].

Por el contrario, las snaclecs son las CTLs que se presentan mayoritariamente en los venenos de las serpientes, y su principal diferencia con las CTL clásicas es su falta de capacidad para reconocer y unirse a azúcares [49,55]. En su lugar, estas toxinas son heterodímeros que se unen por enlaces disulfuro o complejos oligoméricos que incluyen dos subunidades altamente homólogas estrechamente asociadas por un intercambio de bucles [55]. El principal sitio de unión de ligandos de los snaclecs, es la superficie cóncava que se encuentra entre sus dos subunidades. Igualmente, estos compuestos pueden actuar como agonistas o antagonistas de la agregación plaquetaria o como anticoagulantes [49].

Otra enzima que se encuentra comúnmente en los venenos de serpientes son las LAAOs (**véase Figura 1 d**), las cuales son flavo enzimas homodiméricas, que se encargan de catalizar la deaminación oxidativa estereoespecífica de un L-aminoácido a un α-cetoácido, liberando peróxido de hidrógeno [55]. Estas proteínas presentan una masa molecular de entre 110 a 159 kDa, y poseen tres dominios mayores de unión al sustrato, de unión al FAD y un dominio helicoidal. Adicionalmente, las LAAOs, dependiendo de su isoforma, pueden inhibir o inducir la agregación plaquetaria, por lo que pueden ser responsables de edemas, inflamaciones, apoptosis, hemólisis, y hemorragias [49].

En menor cantidad, los péptidos potenciadores de bradicinina (BPPs), que se encuentran en el veneno de muchas especies de serpientes *Bothrops* y otras especies de serpientes, inhiben la enzima convertidora de angiotensina I, lo que aumenta el efecto hipotensor de la bradicinina circulante y puede provocar un shock vascular en la presa o víctima de la serpiente [56].

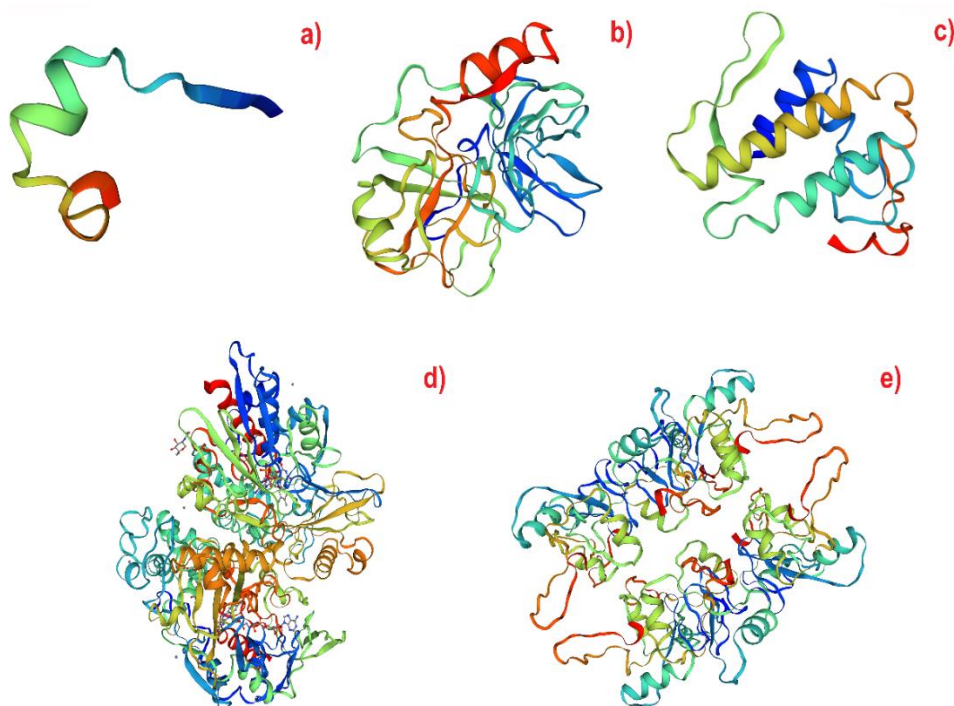


Figura 1. Estructura terciaria de las enzimas del veneno de *Bothrops atrox*, de: a) SVMP, b) SVSP, c) PLA2, d) LAAO, y e) CTL.
Realizado por: Freire, Camila, 2023.

Es importante mencionar que la incidencia de mordeduras de serpientes de este género se ve influenciada por la edad y el dimorfismo sexual de las serpientes. Por ejemplo, las hembras y juveniles son los especímenes que causan la mayoría de los accidentes ofídicos en Brasil. Asimismo, el veneno de la hembra de *B. jararaca* muestra una mayor actividad de hialuronidasa, y hemorrágica, así como una letalidad más alta [43].

Existen varios estudios realizados con diferentes especies del género *Bothrops*, que incluyen investigaciones sobre la ontogenia de algunos de estos animales como *B. atrox*, *B. asper*, *B. insularis* y *B. jararaca*. Especialmente, *B. atrox*, es la especie que es responsable de la mayoría de las muertes humanas en Sudamérica [42,43,57]. Por otro lado, se ha observado variabilidad en los venenos de estas especies en función de factores como la distribución geográfica y la variación del hábitat, lo que puede resultar en una

diversidad funcional capaz de afectar la eficacia del antiveneno, tal y como se ha demostrado en ensayos in vitro [43].

1.1.5. *B. taeniatus*: Composición, actividad biológica e inmunoreactividad

B. taeniatus, conocida por su nombre común Orito palo (español), es una víbora de tamaño mediano, que se encuentra en la región Amazónica. Esta serpiente posee un cuerpo delgado y alargado, una cabeza ligeramente más larga y ancha, y una coloración dorsal que puede variar entre verde pálido, café o grisáceo, con bandas irregulares que van desde 22 a 48 (**Figura 2**). *B. taeniatus* es una especie semi arbórea asociada principalmente con los bosques primarios de tierras bajas, aunque también pueden ser avistada en bosques secundarios, humedales, y áreas de cultivo [15,58].

Aunque su distribución es amplia, son pocos los reportes de avistamientos de esta serpiente, principalmente debido a su coloración extremadamente críptica, o a su vez por la baja frecuencia de muestreo y datos de recolección. Por otra parte, *B. taeniatus* se encuentra localizada, principalmente, en países de la región amazónica. En Ecuador, esta víbora se puede avistar en áreas rurales, específicamente en bosques húmedos de la baja Amazonía hasta las estribaciones orientales de los Andes y las cordilleras Amazónicas del Cóndor y Cutucú, en provincias como Chimborazo, Morona Santiago, Napo y Orellana (**Figura 2**) [15,58].

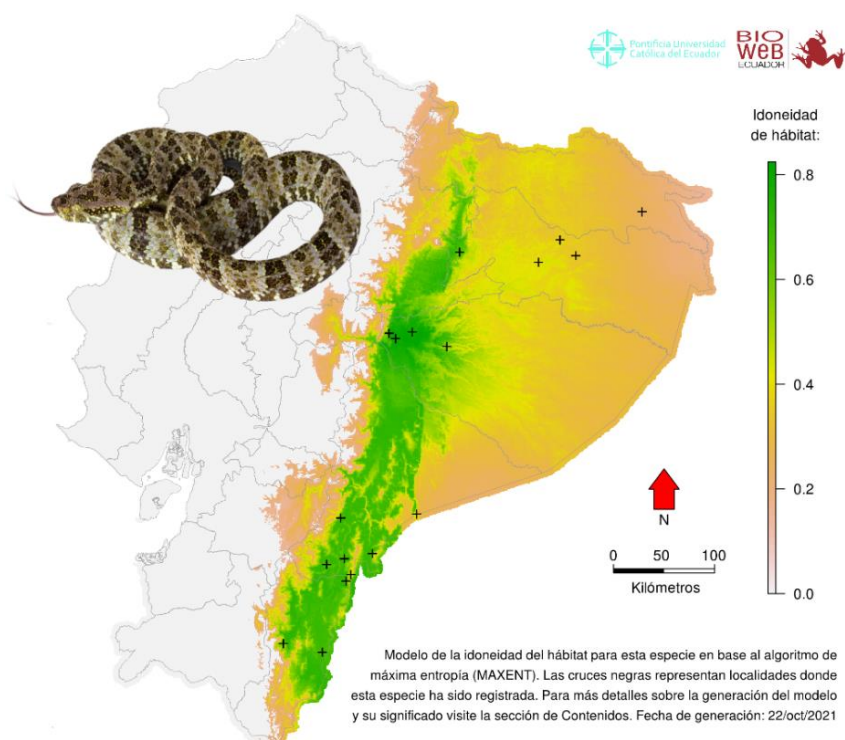


Figura 2. Distribución de *B. taeniatus* dentro del Ecuador, ubicada principalmente en la región Amazónica.

Fuente: Torres-Carvajal, 2019; Foto Read Morley-BIOWEB, <https://bioweb.bio> [59].

La sustancia venenosa producida por esta especie se considera una de las más tóxicas del mundo [60]. Estudios anteriores, desarrollados por Kuch, han revelado que este veneno puede provocar shock, edema, hemorragias y necrosis, síntomas que usualmente ocurren inmediatamente después del envenenamiento. Igualmente, algunas investigaciones realizadas en Brasil han demostrado que este veneno posee actividad de calicreína, trombina y plasmina, por lo que es capaz de inducir una migración selectiva de neutrófilos en la cavidad peritoneal, desencadenando hemorragia. Por otra parte, se sabe que esta especie tiene una de las LD_{50} más baja del mundo (1,47 mg/kg) y una dosis mínima hemorrágica (DMH) de 1,8 mg/ratón [60,61].

Por otro lado, el veneno peruano de *B. taeniatus* presenta alta actividad de PLA_2 , la cual, como se mencionó anteriormente, permite que el veneno degenere sistémica y localmente el tejido muscular esquelético. Para agregar, posee baja actividad proteolítica, moderada actividad de SVSP y LAAO, así como un elevado grado de citotoxicidad [26,62]. En cambio, en Ecuador existe tan solo un estudio, en el que se investigó esta sustancia mediante ensayos enzimáticos, y biológicos (sobre ratones). En este estudio se determinó que el veneno de esta víbora no posee actividad coagulante, no obstante, presenta letalidad a una dosis de 4,5 mg/kg, la cual es más alta en comparación con algunas otras especies.

De igual modo, se ha encontrado que, este veneno se caracteriza por ser anticoagulante y miotóxico. Como resultado, la sintomatología del envenenamiento por esta serpiente se caracteriza por causar daño muscular y necrosis [60,63].

Actualmente en Ecuador, no existen estudios acerca de la inmureactividad y neutralización del veneno de *B. taeniatus*. Sin embargo, se han llevado a cabo investigaciones en Brasil, por el Instituto Butantan [61], en donde se ha generado un suero mediante la inmunización de caballos de los venenos de las especies *B. jararaca*, *B. jararacussu*, *B. moojeni*, *B. alternatus* y *B. neuwiedi*, para tratar el envenenamiento por mordedura de serpientes. A pesar de los esfuerzos, por medio de ensayos de Western Blot, se demostró que este suero no puede identificar a todos los componentes presentes en el veneno *B. taeniatus* y en *B. atrox* del Alto Río Negro y de Maranhão, respectivamente. En relación a su capacidad inmunogénica, en esta misma investigación se inmunizó a ratones hembra con diferentes venenos del género *Bothrops*, y se midieron los niveles de anticuerpos generados mediante la técnica de detección ELISA. En este trabajo se encontró que los venenos de *B. taeniatus*, y el pool de venenos de Butantan generaron una respuesta más baja de anticuerpos, en comparación a los individuos inyectados con el veneno de *B. atrox* [61].

1.2. Planteamiento del Problema

Alrededor del mundo se produce entre 1,8 a 2,7 millones de accidentes ofídicos [41]. En específico, dentro del continente americano se han reportado 57 mil envenenamientos por mordedura de serpientes, en donde, el género *Bothrops* es el mayor responsable de estos casos [15,25]. Igualmente, el veneno de este género de serpientes posee una gran relevancia médica en América Latina. Sin embargo, la caracterización de sus componentes es limitada, o incluso inexistente para algunos taxones [26].

Ecuador es uno de los países de Sudamérica que se caracteriza por poseer el mayor número de especies de reptiles por unidad de área. Dentro de este país existen alrededor de 240 especies de serpientes, y 36 de ellas son clasificadas como venenosas. Estas víboras se encuentran divididas en dos familias responsables de la mayoría de los envenenamientos por mordedura de serpiente: *Elapidae* (que incluyen 19 especies) y *Viperidae* (17 especies) [64].

En este sentido, la familia *Viperidae* se concentra mayoritariamente en la región costera y amazónica del Ecuador e incluye las siguientes especies: *Bothriechis schlegelii*,

Bothrocophias campbelli, *Bo. hyoprora*, *Bo. microphthalmus*, *Bothrops asper*, *B. atrox*, *B. bilineata*, *B. brazili*, *B. lojanus*, *B. osbornei*, *B. pulcher*, *B. punctatus*, *B. taeniatus*, *Lachesis acrochorda*, *L. muta*, *Porthidium arcossae*, y *P. nasutum* [65]. Además, en este país se ha estimado un aproximado de 9,8 casos de mordedura de serpientes por 100000 habitantes, y un alrededor de 0,058 casos de mortalidad por 100000 habitantes entre 2014 y 2016, debido a accidentes ofídicos, principalmente por parte del género *Bothrops* [22,65]. Sin embargo, el acceso a los datos epidemiológicos es limitado [22].

La especie *B. taeniatus* causa un índice de mordida dentro de América Latina de 1,1 por cada 100000 habitantes. Además, es identificada como una de las serpientes mayoritariamente responsables de causar gran cantidad de envenenamientos dentro del Ecuador, y una de las más venenosas en todo el mundo [15,25,41]. Por lo que, cada año, en este país, se han visibilizado alrededor de 1200 a 1400 casos de mordeduras por parte de esta víbora en: Santo Domingo de los Colorados, Guayas y Pastaza. La cual provoca accidentes, principalmente, en pueblos indígenas y zonas pobladas por personas encargadas de la agricultura y tala de árboles [60,66].

Por otra parte, la sintomatología del envenenamiento por mordedura de *B. taeniatus* puede llegar a ser muy severo. Tal fue el caso reportado en Pastaza, donde un hombre exhibió mareos, dolor de cabeza, edema, moretones, e hinchazón en la extremidad perjudicada, lo que fue tratado mediante amputación. Asimismo, se sabe que el ataque de un solo individuo adulto produce daños graves en la zona afectada, ya que sus colmillos se tornan más largos, otorgándoles mayor capacidad de inyectar el veneno [60,63].

Como se mencionó previamente, Ecuador posee antivenenos polivalentes, que no son específicos para el veneno de *B. taeniatus*. Por otro lado, un suero antiofídico empleado en Brasil (Butantan), para el veneno de esta especie, demostró cierta efectividad al inactivar la actividad de unas pocas toxinas [61]. Sin embargo, al existir variabilidad en la composición del veneno, gracias a diversos factores como la zona geográfica en donde se encuentre la especie, la neutralización de este veneno se vuelve menos eficaz. Para contextualizar, se conoce que la desactivación de toxinas se da gracias a la unión de un anticuerpo a un antígeno, con el fin de que no desarrolle su efecto tóxico, mediante interacciones paratopo-epítipo, las cuales se limitan a regiones determinantes de complementariedad. Por lo que, estudios previos han señalado que pequeñas variaciones en el epítipo (toxinas de venenos), puede comprometer la eficiencia del antiveneno [65,66].

1.3. Justificación

Una de las principales razones por las que se ha decidido llevar a cabo la presente investigación es que, a pesar de la existencia de poca información referente a la caracterización de las toxinas de este veneno en Perú y Brasil, esta sustancia puede presentar ciertas variaciones en Ecuador [43]. La composición de los venenos, como ya se ha explicado previamente, varían significativamente en referencia a el área geográfica, sexo y edad. Esta variabilidad en la toxicidad y actividad del veneno es relevante porque conduce a la variabilidad del lote de antiveneno [32].

La variación del veneno de serpientes representa una adaptación evolutiva para la captura y digestión de presas, así como la evasión de depredadores. Esto se ha visibilizado claramente en estudios realizados con *B. atrox*, en diferentes hábitats cercanos al río Amazonas en Brasil, en los que se obtuvo como resultado diferencias entre las proteínas que componían el veneno, y su abundancia. Igualmente, los venenos de los diferentes individuos estudiados demostraron distinciones en la funcionalidad, y heterogeneidad en cuanto a letalidad en mamíferos y aves. Tomando como conclusión que, dependiendo de la distribución geográfica, los venenos se diferenciarán en su efecto tóxico [43].

Por otra parte, la caracterización detallada de las toxinas existentes en este veneno puede permitir, en un futuro, la fabricación de antivenenos específicos como tratamiento para el envenenamiento. Esto debido a que, en Ecuador, el brotopismo se trata mediante antivenenos polivalentes desarrollados en otro país como Costa Rica, los cuales pueden presentar varias limitaciones. Una de estas es la generación de reacciones adversas. Además, estos pueden ser menos eficaces contra los efectos locales, siendo incapaces de neutralizar síntomas irreversibles como la neurotoxicidad, necrosis y colapso cardiovascular. Para finalizar, como ya se ha explicado, estos pueden perder su rendimiento debido a la existencia de variaciones en la composición del veneno [67].

1.4. Objetivos de la Investigación

1.4.1. General

- Caracterizar la composición proteómica, actividades enzimáticas y efecto in vivo en ratones CD-1, del veneno de *B. taeniatus*, así como su neutralización por antiveneno.

1.4.2. Específicos

- Determinar el perfil de toxinas proteicas y peptídicas del veneno de *B. taeniatus*.
- Evaluar las actividades fosfolipásica, proteasas, y L-aminoxidasas, así como biológica (generación de edema, hemorragia, y dosis letal) del veneno de *B. taeniatus* en ratones CD-1.
- Establecer los efectos locales y sistémicos desencadenados por el veneno y la inhibición por el antiveneno empleado dentro del país.

CAPITULO II: METODOLOGÍA

2.1. Obtención y preparación de la muestra

Para todos los ensayos se empleó veneno desecado de *B. taeniatus*, el cual fue obtenido del Instituto Nacional de Investigación y Salud Pública (INSPI). Posteriormente, este veneno fue almacenado a -4 °C.

2.2. Fraccionamiento del veneno de *B. taeniatus* mediante HPLC en fase reversa

El fraccionamiento del veneno y posterior purificación de dichas fracciones se realizó mediante RP-HPLC (PREP 150 LC, Waters), y una columna analítica C18 de fase reversa (250 × 4,6 mm, diámetro de partícula de 5 µm), que se monitoreó a 214 nm. Para realizar este procedimiento, se disolvieron 3 mg de veneno puro en 200 µl de una solución buffer, compuesta por ácido trifluoroacético (TFA) al 0,05 %, acetonitrilo al 5 % y agua tipo I. La muestra se homogeneizó, por medio de vórtex, durante 2 minutos. Luego, esta muestra fue centrifugada a temperatura ambiente a 13000 x g, durante 10 minutos (centrífuga Sorvall ST40R de Thermo Scientific). Después, se inyectaron 200 µl de la muestra en un sistema RP-HPLC equipado con un detector UV/Vis (Waters 991), bombas e inyector (Waters 1525) [28].

La elución se llevó a cabo a un flujo de 1 ml/minuto utilizando un gradiente lineal de fase móvil A (0,1% TFA y agua) y fase móvil B (acetonitrilo con 0,1% TFA): 5 % B durante 5 min, 5-25 % B por 10 min, 25-45 % B a 60 min, 45-70 % B por 10 min, 70 % B a 5 min, 70–5 % B por 5 min, y 5% B en 5 min (tiempo total de 100 min). Por último, las fracciones de veneno seleccionadas (con valores de absorbancia significativos) fueron recolectadas manualmente y se sometieron a un proceso de liofilización a -80 °C, empleando el equipo Benchtop Pro 9 L, Omnitronics [28].

2.3. Electroforesis de SDS-PAGE del veneno de *B. taeniatus*

Para llevar a cabo la electroforesis de SDS-PAGE se empleó el método establecido por Laemmli con pequeñas modificaciones [68]. Primeramente, se realizaron dos disoluciones bajo condiciones reductoras. La primera de 0,1 mg de veneno crudo total disueltos en 60 µl de buffer de carga (Tris-HCl 0.075 M con pH 6.8, glicerol 10 % (v:v), SDS 4 % (m:v), azul

de bromofenol 0,001 % (m:v)) y 5 µl de ditioneitol (DTT) 1M. Y la segunda con las fracciones recolectadas, 45 µl de buffer de carga y 5 µl de DTT. Por otro lado, se utilizaron geles de apilamiento y de corrida, en concentraciones de 5 y 12,5 %, respectivamente. Adicionalmente, se inyectaron 20 µl de cada muestra y 5 µl de marcador molecular (Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladder), y se los corrió a 120 mA en un sistema Mini-PROTEAN® (BIORAD). Después de finalizar la electroforesis, los geles se tiñeron con azul de Coomassie R-250 (0,1 %, Thermo Scientific®), en un agitador orbital (Orbit™ LS Low Speed Laboratory Shaker, Labnet) por toda la noche [28,69]. Posteriormente, fueron decolorados (metanol 40%, ácido acético glacial 20 % y agua tipo I) por 2 - 4 h. Finalmente, se fotografiaron los geles, y se analizó su patrón proteico mediante los softwares ImageJ y Gel Analyzer.

2.4. Digestión trípica de geles SDS- PAGE

Posterior a la separación de cada fracción por SDS-PAGE, se escindieron únicamente las bandas principales de los geles, las cuales fueron sometidas a digestión con tripsina bovina [68]. Para realizar esto, se llevó a cabo métodos basadas en los protocolos propuestos por Almeida et al. (2020), y Sanz et al. (2019) [70,71], con ciertas modificaciones.

Primeramente, previo a la digestión trípica en gel, se destiñeron las bandas con 50 µl de una solución compuesta por bicarbonato de amonio (AMBIC), y acetonitrilo (ACN) en proporción 1:1, por 15 min. Más tarde, los geles fueron expuestos a un proceso de reducción mediante DTT 5 mM, incubándolos a 56°C por 30 min. Después, se descartó la solución. Seguido, se añadieron 100 µl de ACN, y se lo desechó inmediatamente. Enseguida, se secaron los geles por centrifugación al vacío. Seguidamente se llevó a cabo una alquilación durante 20 min, al añadir 90 µl de yodoacetamida (IAA) a temperatura ambiente, bajo condiciones de obscuridad [68,71]. Posteriormente, estas piezas fueron digeridas empleando 30 µl de tripsina bovina a 4°C por 15 min. A continuación, se añadió AMBIC y se incubó a 37 °C por 16 h. Luego, se centrifugaron las muestras a 12000 rpm por 15 s, y se recolectó el sobrenadante. Se agregaron 30 µl de ACN 60% con ácido fórmico 1%, en una proporción 3:2, y se sonicó en baño Branson por 10 min a 37 °C. Más tarde se volvieron a centrifugar las muestras, y se mezclaron los sobrenadantes con los obtenidos anteriormente. La solución final fue concentrada al vacío durante 30 min, y el digerido fue disuelto en 20 µl de agua con 0,1% de ácido fórmico.

2.5. Análisis por LC-MS/MS del veneno de *B. taeniatus*

Para el análisis se empleó el equipo ACQUITY® Xevo G2-S QToF UPLC®/MS. Las muestras de toxinas digeridas fueron cargadas (Flujo - 0,3 ml/min) y separadas en una columna C18 (ACQUITY UPLC BEH 1,7µm, 21 x 50 mm), mediante tampón A (0,1 % de ácido fórmico en agua) y un gradiente lineal de tampón B (ácido fórmico al 0,1 % en ACN): de 1% a 70% en 30 minutos. El instrumento de espectrometría de masas se configuró con un voltaje de capilar de 0,5 kV, un voltaje de cono de 40 V, una temperatura de fuente de 120 °C, una temperatura de desolvatación de 450 °C, un flujo de gas en cono de 30 l/h, y un flujo de gas de desolvatación de 900 l/h. Los datos de MS se obtuvieron mediante un enfoque de adquisición de datos dependiente (DDA), y se empleó un rango de masas que abarcó desde 400 hasta 1990 m/z. Una vez realizada la corrida, los datos fueron analizados en el software Mascot Distiller 2.7, en el que se establecieron las cisteínas carbometiladas y la oxidación de metionina como modificaciones fijas y variables, respectivamente. Además, para la homologación fue necesario secuencias de proteínas provenientes de UniProt [70,72].

2.6. Ensayos enzimáticos del veneno de *B. taeniatus*

Para todos los ensayos se diluyó veneno crudo de *B. taeniatus* en buffer A (Tris-HCl 50 mM, pH 8,0), a una proporción de 1:1 (m:v). La evaluación de la actividad enzimática se realizó por triplicado usando un espectrofotómetro para microplacas (Glomax Discover System - Promega) y sustratos cromogénicos mencionados en los siguientes incisos [28]. Asimismo, para todos se utilizó buffer B (Tris-HCl 10 mM, CaCl₂ 1 M, NaCl 10 mM; pH 7,8). Por otra parte, se ha empleado un pool de veneno tanto de *B. asper*, así como *B. atrox*, con el fin de comparar las actividades específicas enzimáticas. Para el análisis de la actividad específica en cada ensayo se obtuvo una media ± desviación estándar, la cual significó una cantidad representativa para los tres experimentos realizados, independientes para cada ensayo. Igualmente, se trataron todos los datos mediante un Análisis de Varianza de una vía (ANOVA), y una prueba de Tukey con un intervalo de confianza de 0,05. Estas evaluaciones fueron representadas en gráficos generados mediante el software Origin Pro 9.950171 (OriginLab Corporation) [73].

2.6.1. Actividad caseinolítica

La actividad caseinolítica se determinó, usando el protocolo de Lomonte y Gutierrez (1983) [74]. Primero, se diluyeron 8,1 mg de sustrato (azocaseína, Sigma-Aldrich) en 1620 µl de buffer A (**descrito en la sección 2.6**). A continuación, se añadieron en microtubos 30 µl de veneno diluido, y 270 µl de solución de sustrato, los cuales fueron incubados por 90 min a 37°C. Una vez concluido este tiempo, se añadieron 600 µl de TFA al 5% a cada muestra, y se las centrifugó por 5 min a 8000 rpm. De manera similar, se preparó un control negativo utilizando 30 µl de buffer A y 270 µl de sustrato. A continuación, se transfirieron 150 µl del sobrenadante de cada solución y 150 µl de NaOH (0,5 M) a una placa de 96 pocillos. Por último, se midió la absorbancia a 440 nm. La actividad específica se calculó como la cantidad de veneno por cada variación de 0,005 unidades de absorbancia [28,74].

2.6.2. Actividad de fosfolipasa A₂

La actividad fosfolipásica se determinó, basándose en el protocolo de Holzer y Mackessy (1996) [75] con pequeñas adaptaciones, como previamente se ha detallado en anteriores investigaciones llevadas a cabo por nuestro grupo de investigación [76,77]. Se disolvieron 0,9 mg del sustrato (ácido 4-nitro-3 [octanoiloxi] benzoico - NOBA) en 300 µl de acetonitrilo y 3 ml de buffer B (**descrito en la sección 2.6**). Luego, se añadieron 20 µl de la disolución de veneno, 220 µl de solución de sustrato y 20 µl de buffer B en una microplaca de 96 pocillos. Para el control negativo, se siguió el mismo procedimiento, reemplazando la cantidad equivalente de la disolución de veneno, por buffer B. La absorbancia se midió a 410 nm, después de 20 min de incubación a 37°C. Para finalizar, la actividad específica, se definió como el cambio de absorbancia de 0,10 unidades, lo cual equivale a la producción de 25,8 nmoles de cromóforo [28,75].

2.6.3. Actividad de serin proteinasa

La actividad de serin proteinasa se determinó, usando el protocolo de Munekiyo y Mackessy (1998) [78], con algunas modificaciones. Se preparó una solución del sustrato N-benzoil-L-arginil-p-nitroanilida (L-BapNa - Sigma-Aldrich), disolviendo 1,55 mg en 36 µl de dimetilsulfóxido (DMSO) y 3555 µl de buffer B (**descrito en la sección 2.6**). Luego, se añadieron a una microplaca de 96 pocillos 20 µl de veneno, 200 µl de sustrato y 50 µl de buffer A (**descrito en la sección 2.6**). Para el control negativo, se utilizó una mezcla de 70 µl de buffer B y 200 µl de sustrato. Después de 30 min de incubación a 37°C, se midió la

absorbancia a 410 nm. La actividad específica se determinó como la cantidad de p-nitroanilina liberada [28,78,79].

2.6.4. Actividad de L-aminoxidasa

La actividad L-aminoxidasa fue determinada según el protocolo de Costal-Oliveira y colaboradores [80], con ciertas modificaciones. Para llevar a cabo el procedimiento, se prepararon dos soluciones distintas. La primera consistió en la dilución de L-metionina 5 mM y de 4,5-diclorofenilalanina 2 mM, en 6000 µl de buffer A (solución sustrato). La segunda constó de 0,1 mg de peroxidasa disuelta en 700 µl de buffer A (**descrito en la sección 2.6**). Después, se añadieron 90 µl de la solución de sustrato, 10 µl de peroxidasa y 20 µl de veneno en cada pocillo de una microplaca de 96 pocillos. Para el control negativo, se reemplazó el veneno por buffer A. A continuación, las muestras se incubaron durante 60 minutos a 37°C. Al finalizar el tiempo de incubación, se agregaron 50 µl de ácido sulfúrico (H₂SO₄ 2M). Por último, se realizó la lectura de la microplaca a 490 nm. La actividad específica de la enzima se expresará como una unidad de actividad oxidativa por mg de proteína [80,81].

2.7. Caracterización de los efectos biológicos del veneno de *B. taeniatus*

Para evaluar la actividad biológica del veneno de *B. taeniatus*, se utilizaron ratones macho CD-1 con un peso de 18-20 g, obtenidos del INSPI [73]. Igualmente, se siguió el protocolo de uso y manejo de animales de laboratorio, bajo la autorización de la Coordinación de Investigación de la Universidad Regional Amazónica Ikiam. Para los ensayos de neutralización, se empleó el Suero Antiofídico Polivalente del INS de Colombia (BATCH: VI: 06(04/2017); fecha de caducidad: 04/2024). Por otro lado, las cantidades de las soluciones en cada uno de los ensayos (Muestra: 1 mg de veneno disuelto en 1 ml de PBS y Control: PBS en el mismo volumen que la solución anterior), así como la cantidad de ratones utilizados (control positivo y negativo) y la cantidad de antiveneno, se basaron en el protocolo descrito por Patiño et al. (2021) [28]. En el caso de los resultados obtenidos, se los expresaron como la media ± desviación estándar, y todos fueron representados en gráficas desarrolladas mediante el software Origin Pro 9.950171.

2.7.1. Evaluación de efecto hemorrágico

El estudio del efecto hemorrágico se basó en los protocolos de Kondo et al. (1960) [82] y Patiño et al. (2021) [28], con algunas modificaciones. Se emplearon seis concentraciones diferentes de veneno, obtenidas a partir de diluciones de la solución muestra (0,25 µg/ratón, 0,5 µg/ratón, 1 µg/ratón, 6,25 µg/ratón, 12,5 µg/ratón, 25 µg/ratón). Se utilizaron cuatro ratones para cada uno de los grupos correspondientes al control y a las concentraciones mencionadas. Inicialmente, se administraron 50 µl de las soluciones por vía intradérmica dorsal en cada ratón, agrupados según su concentración correspondiente. Asimismo, los ratones pertenecientes al grupo control fueron inyectados con 50 µl de PBS, únicamente. Después de un periodo de 3 horas, los ratones fueron sacrificados mediante desplazamiento cervical. Seguido, se extrajo la piel dorsal, y se midió el área de hemorragia (mm²) utilizando el software ImageJ. Se calculó la DMH, basándose en el método propuesto por la Universidad de Costa Rica (2007) [83]. Los datos fueron ajustados en una regresión cuadrática.

2.7.2. Evaluación de formación de edema

La investigación del efecto edemogénico se analizó según el protocolo de Lomonte et al. (1993) [84], con algunas modificaciones. Para ello, se utilizaron 4 grupos de individuos, cada uno compuesto por 4 ratones, correspondientes a diferentes concentraciones de veneno (25 µg/ratón, 12,5 µg/ratón, 6,25 µg/ratón y 1 µg/ratón). En cada ratón, se administraron 50 µl de veneno (en la pata izquierda) y 50 µl de PBS como control (en la pata derecha), por vía intraplantar. Estos individuos fueron evaluados durante un período de 24 horas (a 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, y 24 horas). Se midió el grosor de formación de edema con ayuda de un pie de rey [28].

2.7.3. Ensayos de letalidad

Los ensayos de letalidad se basaron en el protocolo de Patiño et al. (2021) [28]. Se utilizaron 6 concentraciones diferentes de veneno (200 µg/ratón, 100 µg/ratón, 50 µg/ratón, 25 µg/ratón, 12,5 µg/ratón, y 6,25 µg/ratón), con 4 ratones asignados a cada grupo de concentración. Además, se estableció un grupo control con la misma cantidad de individuos. Inicialmente, se administraron 200 µl de veneno por vía intraperitoneal a cada animal, mientras que en el grupo de control se administraron 200 µl de PBS. A continuación, se registraron los tiempos de mortalidad a intervalos de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8,

9, 10, 11, 12, 24, 48 horas. Posteriormente, se determinó la dosis letal 50 (LD₅₀) utilizando el método Probit, basado en las recomendaciones dadas por la Universidad de Costa Rica (2007) [83] y se construyó una curva de supervivencia a en función de la dosis.

2.7.4. Ensayos de neutralización del veneno de *B. taeniatus*

Para los ensayos de neutralización se usó el protocolo de Patiño et al. (2021) [28] y el manual de la Universidad de Costa Rica (2007) [83]. Primero, se preparó una solución de veneno utilizando la LD₅₀, y una solución de antiveneno con PBS. Estas soluciones fueron mezcladas a una proporción de 1:1 (m:v) y se incubaron a 37°C durante 30 minutos. Posteriormente, se inyectaron 200 µl de la solución final por vía intraperitoneal a 4 ratones, y se registraron los tiempos de mortalidad durante 12, 24 y 48 horas. Por otra parte, para el análisis de la inhibición de los efectos hemorrágicos se empleó la dosis mínima hemorrágica (DMH). Se inyectaron 50 µl de la solución en la región dorsal intradérmica de 4 ratones, y después de 3 horas se los sacrificó para extraer su piel y medir el área de hemorragia mediante el software ImageJ.

CAPITULO III: RESULTADOS

3.1. Perfil bioquímico del veneno de *B. taeniatus*

Después de realizar la cromatografía del veneno de *B. taeniatus* (RP-HPLC), se identificaron 17 principales picos distintos (**Figura 3**). Estas fracciones revelaron la presencia de diversas toxinas características de los venenos del género *Bothrops*. A breves rasgos, se observó una mayor abundancia relativa (según los valores de absorbancia y área bajo el pico cromatográfico) en las fracciones 6, 8 y 9, correspondientes a los tiempos de elución de 53, 59 y 72 minutos, respectivamente. Estos tiempos indican la presencia de proteínas de tamaño medio como PLA₂, CTL, SVSP, CRiSP, factores de crecimiento nervioso (NGF) y factores de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) [85]. Además, se encontró una abundancia moderada en las fracciones 1, 2, 3, 4, 10, 14, 16 y 17 (con tiempos de elución de 19, 20, 40, 49, 76, 84, 86 y 87 minutos, respectivamente). En estas fracciones se pueden observar la presencia de: pequeños péptidos (fracciones 1 y 2), proteínas de tamaño medio (fracciones 3 y 4), y proteínas hidrofóbicas o de gran tamaño (fracciones 10, 14, 16 y 17), como SVMP, LAAO, PDE, 5'NT, HA y PLB. Por último, se encontraron fracciones con menor abundancia (5, 7, 11, 12, 13 y 15), que presentan proteínas de tamaño medio (10 – 50 kDa) y grande (>50 kDa) [85].

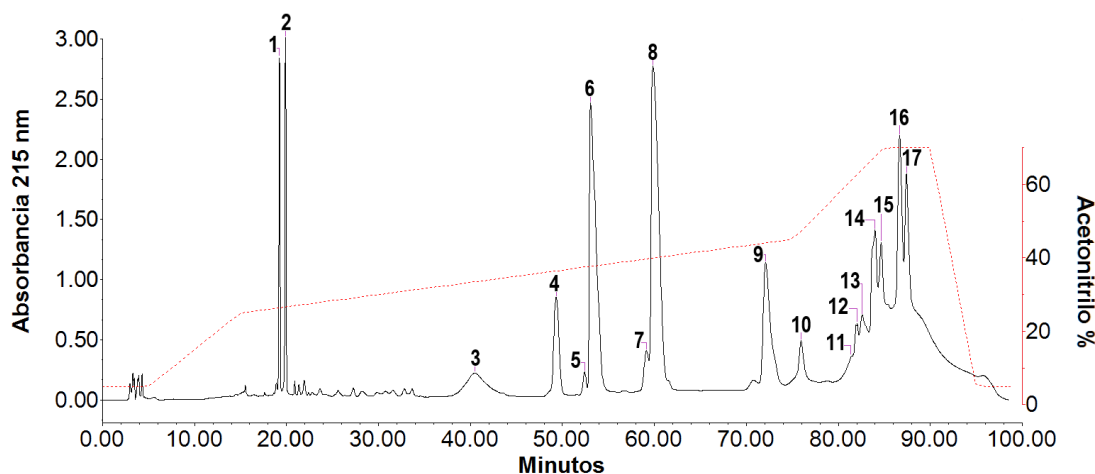


Figura 3. Perfil cromatográfico del veneno de *B. taeniatus* (RP-HPLC), cromatograma detectado a 214 nm (UV), en el que se visualiza líneas entrecortadas en color rojo, que señalan el gradiente empleado (Acetonitrilo %).

Realizado por: Freire, Camila, 2023.

La electroforesis SDS-PAGE de cada fracción del veneno confirmó la presencia de diversas enzimas, como se muestra en la **Figura 4**. Al analizar la masa molecular de cada fracción,

se observaron bandas densas en rangos específicos correspondientes a diferentes proteínas, tales como PLA₂, CTL (13-15 kDa), SVSP, PI-SVMP (23-33 kDa), PII-SVMP, PIII-SVMP y LAAO (46-58 kDa) [40,57]. Esto indica la presencia de SVSP y PI-SVMP en las fracciones 4-8 y 9-17. Además, se detectaron PII-SVMP, PIII-SVMP y LAAO en las fracciones 5, 7 y 9-17, mientras que las fracciones 8-17 contenían PI-SVMP. También se identificaron PLA₂ y CTL en las fracciones 3, 5-8 y 10-17.

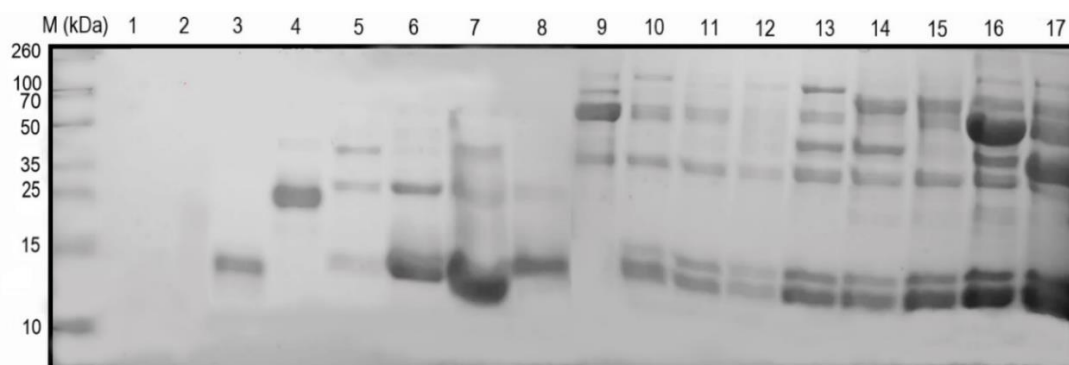


Figura 4. Perfil electroforético del veneno de *B. taeniatus*. Se visualiza el gel de electroforesis SDS-PAGE de las fracciones obtenidas. El marcador molecular (kDa) se encuentra en la parte izquierda.
Realizado por: Freire, Camila, 2023.

3.2. Proteómica del veneno de *B. taeniatus*

En la Figura 5, la abundancia relativa de la familia de cada proteína se ve representada en porcentajes (%), que representan el total del contenido del veneno crudo. Los resultados fueron obtenidos a través de espectrometría de masas, en donde se identificaron: SVSP: serino proteasas de venenos de serpientes, SVMP: Metaloproteasas de veneno de serpiente, LAAO: L-aminooxidasa, VEGF: factores de crecimiento del endotelio vascular, 5'NT: 5'-nucleotidasa, PDE: Fosfodiesterasa, CRiSP: proteína secretora rica en cisteína, CTL: Lectina tipo C, PLA₂: Fosfolipasa A2, BR: Enzima liberadora de bradicinina, BFB: Beta-fibrinogenasa, GPC: Glutaminil-péptido ciclotransferasa, y TEB: Enzima similar a la trombina.

A partir del análisis de digestión trípica de las bandas electroforéticas de cada fracción obtenida a través de RP-HPLC, del veneno de *B. taeniatus*, se pudo verificar la presencia de 13 familias de toxinas diferentes, las cuales se pueden visualizar en la **Figura 5**. El análisis de espectrometría de masas reveló que el grupo de toxinas más abundante fueron las PLA₂, con un total de 44,82% del veneno, seguido por SVMP, cisteínas, y VEG. Las enzimas más relevantes fueron encontradas en su gran mayoría en la zona central del cromatograma (**Figura 3**), desde la fracción 3 – 10.

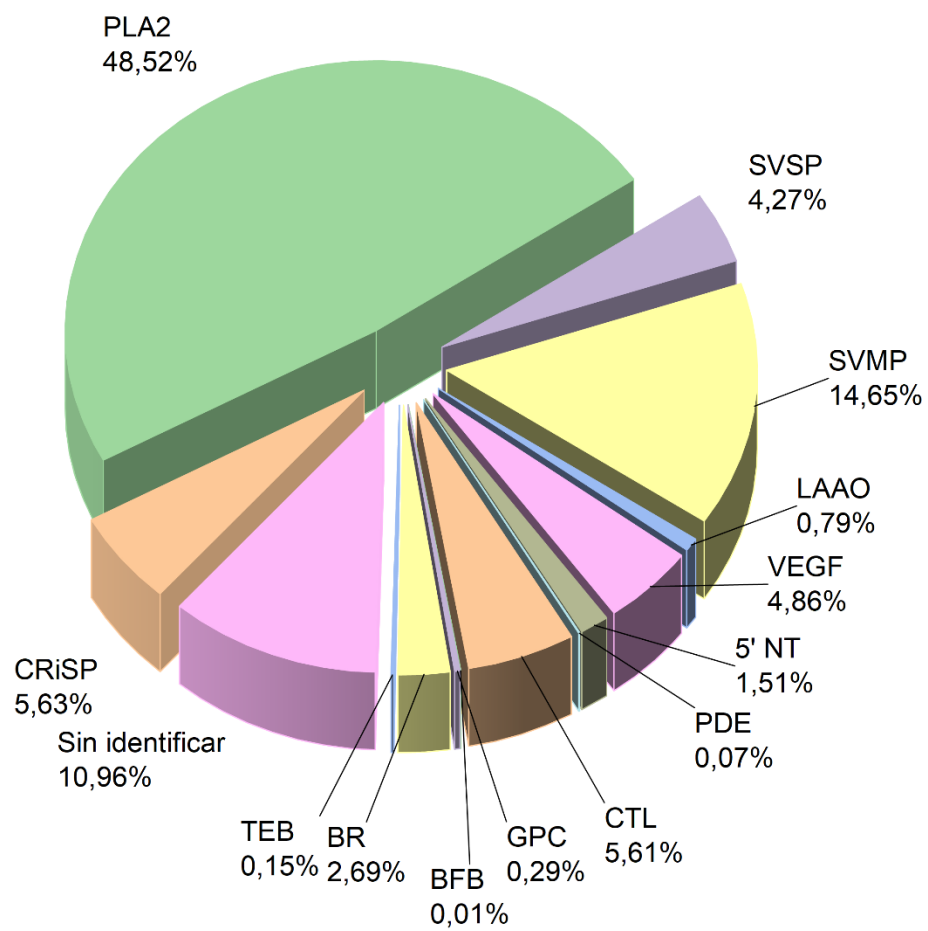


Figura 5. Esquematización del porcentaje de toxinas totales en el veneno de *B. taeniatus*.
Realizado por: Freire, Camila, 2023.

Tabla 1. Familia de proteínas identificadas por LC-MS/MS, en las fracciones del veneno de *B. taeniatus* obtenidas mediante RP-HPLC.
Asignada a diferentes familias de proteínas, mediante secuenciación de LC-MS/MS de iones peptídicos generados a partir de la digestión trípica en gel y en solución.

Fracción	Abundancia Relativa	Ión de peptido		Secuencia del péptido	Proteína relacionada		Entrada Uniprot	Digestión
		m/z	z		Familia	Especie		
1	4,29			No identificado				Solución
2	5,38			No identificado				Solución
	4,86			No identificado				Gel
3		698,96066	3+	EVMQFTEHTDCEDRPR	VEGF	<i>Bothrops erythromelas</i>	Q6J936	Gel
		704,2908	3+	EVMQFTEHTDCECRPR	VEGF	<i>Bothrops erythromelas</i>	Q6J936	Gel
4	5,62	635,67642	3+	KPEIQNEIVDLHNSLR	CRISP	<i>Gloydius blomhoffii</i>	Q8JI40	Gel
		533,8054	2+	IVDLHNSLR	CRISP	<i>Crotalus adamanteus</i>	F8S0Y4	Gel
		581,29846	2+	SVNPTASNMLK	CRISP	<i>Crotalus adamanteus</i>	F8S0Y4	Gel
		589,29986	2+	SVNPTASN(OX)LK	CRISP	<i>Crotalus adamanteus</i>	F8S0Y4	Gel
		777,43292	2+	M(OX)EWYPEAAANAER	CRISP	<i>Agkistrodon piscivorus piscivorus</i>	Q7ZTA0	Gel
		569,75709	2+	SVDFDSESPR	CRISP	<i>Bothrops cotiara</i>	P0DMG5	Gel
5	0,65	509,5743	3+	IIGGDECNICEHR	SVSP	<i>Bothrops fonsecai</i>	P0DMH6	Gel
		490,70162	2+	QICECDR	PLA ₂	<i>Bothrops pirajai</i>	C9DPL5	Gel
	20,93	506,59809	3+	NDDALDKDLMLVR	SVSP	<i>Bothrops jararaca</i>	Q5W959	Gel
6		504,90267	3+	VIGGDECNINEHR	BR	<i>Gloydius ussuriensis</i>	Q7SZE2	Gel
		453,7546	2+	FICPNKK	BR	<i>Gloydius ussuriensis</i>	Q7SZE2	Gel

		490,703	2+	QICECDR	PLA ₂	<i>Bothrops pirajai</i>	C9DPL5	Gel
		412,71348	2+	VAATCFR	PLA ₂	<i>Bothrops pirajai</i>	C9DPL5	Gel
7	0,81	676,83196	2+	SAGQLYEESLQK	LAAO	<i>Bothrops jararacussu</i>	P84907	Gel
		554,74633	2+	KQICECDR	PLA ₂	<i>Bothrops pirajai</i>	C9DPL5	Gel
		490,70345	2+	QICECDR	PLA ₂	<i>Bothrops pirajai</i>	C9DPL5	Gel
		412,71286	2+	VAATCFR	PLA ₂	<i>Bothrops pirajai</i>	C9DPL5	Gel
8	26,3	547,78536	2+	YNSNLNTIR	SVMP	<i>Bothrops jararacussu</i>	Q7T1T4	Gel
		611,82852	2+	YNSNLNTIRK	SVMP	<i>Bothrops jararacussu</i>	Q7T1T4	Gel
		449,76179	2+	ERDLLPR	SVMP	<i>Bothrops jararacussu</i>	Q7T1T4	Gel
		626,79579	2+	GGHGRPQDASDR	PLA ₂	<i>Trimeresurus gramineus</i>	P81478	Gel
		490.69656	2+	QICECDR	PLA ₂	<i>Bothrops pirajai</i>	C9DPL5	Gel
		412,71402	2+	VAATCFR	PLA ₂	<i>Bothrops pirajai</i>	C9DPL5	Gel
9	10,82	863,09203	3+	YSAMALGNHEFDNGLAGLLDPLLK	5'NT	<i>Crotalus adamanteus</i>	F8S0Z7	Gel
		868,42136	3+	YDAM(OX)ALGNHEFDNGLAGLLDPLLK	5'NT	<i>Crotalus adamanteus</i>	F8S0Z7	Gel
		430,25143	2+	IINVGSEK	5'NT	<i>Crotalus adamanteus</i>	F8S0Z7	Gel
		859,94165	2+	ETPVLSNPGPYLEFR	5'NT	<i>Crotalus adamanteus</i>	F8S0Z7	Gel
		423,26203	2+	LTTLGVNK	5'NT	<i>Crotalus adamanteus</i>	F8S0Z7	Gel
		523,30534	2+	VPTYVPLEK	5'NT	<i>Crotalus adamanteus</i>	F8S0Z7	Gel
		430,25143	2+	IINVGSEK	5'NT	<i>Gloydius brevicaudus</i>	B6EWW8	Gel
		630,34176	3+	LLLPSFLAGGGDGYHMLK	5'NT	<i>Gloydius brevicaudus</i>	B6EWW8	Gel
		635,66436	3+	LLLPSFLAGGGDGYHM(OX)LK	5'NT	<i>Gloydius brevicaudus</i>	B6EWW8	Gel

		656,36606	3+	YLIDNRPPCILNIPLR	SVMP	<i>Bothrops atrox</i>	C5H5D2	Gel
		613,73156	2+	NPCCDATTCK	SVMP	<i>Bothrops jararaca</i>	Q0NZX8	Gel
	3,17	561,28345	2+	NPFYTSPAK	PDE	<i>Crotalus adamanteus</i>	J3SEZ3	Gel
		523,30033	2+	VPTYVPLEK	5'NT	<i>Gloydius brevicaudus</i>	B6EWW8	Gel
		630,33737	3+	LLLPSFLAGGGDGYHMLK	5'NT	<i>Gloydius brevicaudus</i>	B6EWW8	Gel
		721,86493	2+	LIFFDGEEAFVR	GPC	<i>Boiga dendrophila</i>	A7ISW2	Gel
10		422,75214	2+	ETVLLNR	SVMP	<i>Bothrops atrox</i>	C5H5D2	Gel
		656,36505	3+	YLIDNRPPCILNIPLR	SVMP	<i>Bothrops atrox</i>	C5H5D2	Gel
		613,73282	2+	NPCCDATTCK	SVMP	<i>Bothrops jararaca</i>	Q0NZX8	Gel
		511,91986	3+	NDDALDKDLM(OX)LVR	SVSP	<i>Bothrops jararaca</i>	Q5W959	Gel
		443,91968	3+	MILQETGKNPAK	PLA ₂	<i>Bothrops jararacussu</i>	Q90249	Gel
	0,07	721,86449	2+	LIFFSGEEAFVR	GPC	<i>Boiga dendrophila</i>	A7ISW2	Gel
11		613,73321	2+	NPCCDATTCK	SVMP	<i>Bothrops jararaca</i>	Q0NZX8	Gel
		511,9326	3+	NDDALDKDLM(OX)LVR	SVSP	<i>Bothrops jararaca</i>	Q5W959	Gel
	0,62	826,3878	3+	FGLQLNEFSQENENAWYFIK	LAAO	<i>Bothrops jararacussu</i>	Q6TGQ9	Gel
		676,83512	2+	SAGQLYEESLQK	LAAO	<i>Bothrops jararacussu</i>	Q6TGQ9	Gel
		555,76234	2+	FDEIVGGMDK	LAAO	<i>Bothrops jararacussu</i>	Q6TGQ9	Gel
12		463,56226	3+	KFWEDDGIHGGK	LAAO	<i>Bothrops jararacussu</i>	Q6TGQ9	Gel
		494,76052	2+	NGLSATSNP	LAAO	<i>Bothrops jararacussu</i>	B5AR80	Gel
		676,83773	2+	SAGQLYEESLQK	LAAO	<i>Bothrops jararacussu</i>	B5AR80	Gel
		1111,5182	3+	EGNLSPGAVDMIGDLLNEDSGYYVSFIES	LAAO	<i>Bothrops jararacussu</i>	B5AR80	Gel

13		569,26719	2+	HDDIFAYEK	LAAO	<i>Bothrops jararacussu</i>	B5AR80	Gel
		583,35329	2+	IKFEPPLPPK	LAAO	<i>Bothrops jararacussu</i>	B5AR80	Gel
		547,78381	2+	YNSNLNTIR	SVMP	<i>Bothrops asper</i>	P83512	Gel
		790,38272	2+	VHEMLNTVNGFYR	SVMP	<i>Bothrops asper</i>	P83512	Gel
		882,95679	2+	SVDVHAPLANLEVWSK	SVMP	<i>Bothrops asper</i>	P83512	Gel
		788,08482	3+	SVDVHAPLANLEVWSKQDLIK	SVMP	<i>Bothrops asper</i>	P83512	Gel
		443,91651	3+	MILQETGKNPAK	PLA ₂	<i>Bothrops jararacussu</i>	Q90249	Gel
		449,24624	3+	M(OX)LQETGKNPAK	PLA ₂	<i>Bothrops jararacussu</i>	Q90249	Gel
		443,91573	3+	MILQETGKNPAK	PLA ₂	<i>Bothrops jararacussu</i>	Q90249	Gel
		449,25183	3+	M(OX)LQETGKNPAK	PLA ₂	<i>Bothrops jararacussu</i>	Q90249	Gel
	0,91	443,25349	3+	YIELVIVADHR	SVMP	<i>Gloydius halys</i>	Q8AWX7	Gel
		613,73158	2+	NPCCDATTCK	SVMP	<i>Bothrops jararaca</i>	Q0NZX8	Gel
		871,87935	2+	NLWQFGQMMSDVMR				
		443,91432	3+	MILQETGKNPAK				
		520,30958	3+	KNVITDKDIMLIR	TEB	<i>Bothrops jararaca</i>	P81661	Gel
		443,25442	3+	YIELVIVADHR				
		504,90229	3+	VIGGDECNINEHR	SVSP	<i>Gloydius blomhoffii</i>	Q9PT51	Gel
		759,37947	2+	NDDALDKDLMLVR	SVSP	<i>Bothrops jararaca</i>	Q5W959	Gel
		497,26222	3+	NDEKDKDIMLIR	SVSP	<i>Lachesis muta muta</i>	Q27J47	Gel
	502,59559	3+	NDEKDKDIM(OX)LIR	SVSP	<i>Lachesis muta muta</i>	Q27J47	Gel	
	510,28246	2+	DKDIM(OX)LIR	SVSP	<i>Lachesis muta muta</i>	Q27J47	Gel	

		443,25723	3+	YIELVIVADHR	SVMP	<i>Gloydus halys</i>	Q8AWX7	Gel
		871,88302	2+	NLWQFGQMMSDVMR	PLA ₂	<i>Bothrops asper</i>	P86389	Gel
	4,07	676,83112	2+	SAGQLYEESLQK	LAAO	<i>Bothrops jararacussu</i>	Q6TGQ9	Gel
		443,25538	3+	YIELVIVADHR	SVMP	<i>Gloydus halys</i>	Q8AWX7	Gel
		523,301	2+	VPTYVPLEK	5'NT	<i>Crotalus adamanteus</i>	F8S0Z7	Gel
					No identificado			
14		511,92625	3+	NDDALDKDLM(OX)LVR	SVSP	<i>Bothrops jararaca</i>	Q5W960	Gel
		509,57536	3+	IIGGDECNINEHR	SVSP	<i>Bothrops fonsecai</i>	P0DMH6	Gel
					No identificado			
					No identificado			
	1,66	410,71036	2+	ALQM(OX)ADR	PDE	<i>Crotalus adamanteus</i>	J3SEZ3	Gel
		612,76752	2+	GGTHGYDNEFK	PDE	<i>Crotalus adamanteus</i>	J3SEZ3	Gel
		561,28456	2+	NPFYTPSPAK	PDE	<i>Crotalus adamanteus</i>	J3SEZ3	Gel
		430,25128	2+	IINVGSEK	5'NT	<i>Crotalus adamanteus</i>	F8S0Z7	Gel
					No identificado			
15					No identificado			
		504,90231	3+	VIGGDECNINEHR	SVSP	<i>Gloydus blomhoffii</i>	Q9PT51	Gel
		502,59388	3+	DNEKDKDIM(OX)LIR	SVSP	<i>Crotalus adamanteus</i>	J3SDW9	Gel
		502,28702	2+	DKDIMLIR	SVSP	<i>Crotalus adamanteus</i>	J3SDW9	Gel
		509,57194	3+	IIGGDECNINEHR	SVSP	<i>Bothrops fonsecai</i>	P0DMH6	Gel
					No identificado			

		No identificado						
		496,71688	2+	MNWADAER	CTL	<i>Bothrops jararaca</i>	Q56EB1	Gel
16	6,05	410,70628	2+	ALQM(OX)ADR	PDE	<i>Crotalus adamanteus</i>	J3SEZ3	Gel
		561,28613	2+	NPFYTPSPAK	PDE	<i>Crotalus adamanteus</i>	J3SEZ3	Gel
		430,25245	2+	IINVGSEK	5'NT	<i>Gloydius brevicaudus</i>	B6EWW8	Gel
		521,79851	2+	SSGNPILLNK	5'NT	<i>Gloydius brevicaudus</i>	B6EWW8	Gel
		523,30249	2+	VPTYVPLEK	5'NT	<i>Gloydius brevicaudus</i>	B6EWW8	Gel
		630,33525	3+	LLLPSFLAGGGDGYHMLK	5'NT	<i>Gloydius brevicaudus</i>	B6EWW8	Gel
		811,46054	2+	IYEIVNILNVIYR	SVMP	<i>Macrovipera lebetina</i>	Q4VM08	Gel
		811,45868	2+	IYEIVNILNVIYR	SVMP	<i>Macrovipera lebetina</i>	Q4VM08	Gel
		443,25688	3+	YIELVIVADHR	SVMP	<i>Gloydius halys</i>	Q8AWX7	Gel
		504,90264	3+	VIGGDECNINEHR	SVSP	<i>Gloydius blomhoffii</i>	Q9PT51	Gel
		511,92328	3+	NDDALDKDLM(OX)LVR	SVSP	<i>Bothrops jararaca</i>	Q5W960	Gel
		509,57908	3+	IIGGDECNINEHR	SVSP	<i>Bothrops fonsecai</i>	P0DMH6	Gel
		443,26011	3+	YIELVIVADHR				
		443,92525	3+	MILQETGKNPAK	PLA ₂	<i>Bothrops jararacussu</i>	Q90249	Gel
		No identificado						
17	3,78	410,70896	2+	ALQM(OX)ADR	PDE	<i>Crotalus adamanteus</i>	J3SEZ3	Gel
		546,79268	2+	TLGMLMEGLK	PDE	<i>Crotalus adamanteus</i>	J3SEZ3	Gel
		562,78715	2+	TLGM(OX)LM(OX)EGLK	PDE	<i>Crotalus adamanteus</i>	J3SEZ3	Gel
		612,76601	2+	GGTHGYDNEFK	PDE	<i>Crotalus adamanteus</i>	J3SEZ3	Gel

641,31164	2+	SAGQLYEESLGK	LAAO	<i>Bothriechis schlegelii</i>	A0A024BTN9	Gel
1111,5048	3+	EGNLSPGAVDMIGDLLNEDSGYYVSFIESLK	LAAO	<i>Bothriechis schlegelii</i>	A0A024BTN9	Gel
720,90824	2+	LVIVADYIM(OX)FLK	SVMP	<i>Macrovipera lebetina</i>	Q4VM08	Gel
811,45508	2+	IYEIVNILNVIYR	SVMP	<i>Macrovipera lebetina</i>	Q4VM08	Gel
438,58419	3+	YIELVVADHR	SVMP	<i>Agkistrodon contortrix contortrix</i>	Q9IAB0	Gel
532,77898	2+	YNGNLNTIR	SVMP	<i>Agkistrodon contortrix contortrix</i>	Q9IAB0	Gel
664,37173	2+	YIELVIVADHR	SVMP	<i>Gloydius halys</i>	Q8AWX7	Gel
443,25433	3+	YIELVIVADHR	SVMP	<i>Gloydius halys</i>	Q8AWX7	Gel
504,90142	3+	VIGGDECNINEHR	BFB	<i>Gloydius blomhoffii</i>	Q9PT51	Gel
459,73851	2+	KNDDALDK	SVSP	<i>Bothrops jararaca</i>	Q5W960	Gel
765,34767	3+	TNPDVPHCANINLLDDAVCR	SVSP	<i>Bothrops jararaca</i>	Q5W960	Gel
No identificado						
581,29876	2+	SVNPTASNMLK	CRISP	<i>Agkistrodon piscivorus piscivorus</i>	Q7ZTA0	Gel
506,5923	3+	NDDALDKDLMLVR	SVSP	<i>Bothrops jararaca</i>	Q5W960	Gel
511,92184	3+	NDDALDKDLMLVR	SVSP	<i>Bothrops jararaca</i>	Q5W960	Gel
496,7255	2+	MNWADAER	CTL	<i>Bothrops jararaca</i>	Q56EB1	Gel

Elaborado por: Freire, Camila, 2023.

3.3. Ensayos enzimáticos

En la **Figura 6** se observa la actividad a) caseinolítica, b) fosfolipásica, c) de SVSP, y d) LAAO del veneno de *B. taeniatus*. Se compararon las actividades específicas entre cada muestra utilizando una prueba de Tukey para identificar diferencias significativas. Los resultados de esta prueba estadística se ven representados en los símbolos utilizados en la última columna, e indican la diferencia significativa encontrada entre las actividades enzimáticas del veneno de *B. taeniatus* y las otras muestras empleadas para cada ensayo: Δ (CN - control negativo), $^{\circ}$ (veneno de *B. atrox*), y $\bullet$ (veneno de *B. asper*).

Los ensayos enzimáticos revelaron la capacidad de las toxinas del veneno de *B. taeniatus*, para catalizar reacciones hidrolíticas con sustratos cromogénicos específicos, como se muestra en la **Figura 6**. Además, se realizó un análisis ANOVA y prueba Tukey, para comparar las medias entre el control negativo y los venenos de *B. atrox*, *B. asper* y *B. taeniatus* en todos los ensayos, como se describe en el **Capítulo II**.

Los resultados de la actividad caseinolítica (**Figura 6 a**) indicaron diferencias entre las medias de los grupos estudiados, cuyo valor $p < 0,05$. Al realizar pruebas de comparación de medias (prueba de Tukey) entre cada grupo estudiado, se observaron diferencias significativas entre *B. taeniatus* con el control negativo y los venenos de *B. asper* y *B. atrox*, lo que sugiere que este veneno tiene actividad caseinolítica. Sin embargo, como se muestra en la **Figura 6 a**, esta es inferior a la de los venenos de *B. asper* y *B. atrox*. Por otro lado, en los ensayos de actividad fosfolipásica, aunque el valor p obtenido en el ANOVA fue mayor que el nivel de significancia, esta sustancia tóxica mostró diferencias significativas en todas las medias de los otros grupos estudiados y una mayor actividad específica en comparación con *B. asper* y *B. atrox* (**Figura 6 b**).

En relación a las SVSPs, el ANOVA mostró un valor de $p > 0,05$, lo que sugiere que ninguno de los venenos presentó actividad (**Figura 6 c**). Por otro lado, en cuanto a los ensayos de LAAO, el análisis ANOVA reveló diferencias entre las medias ($p < 0,05$). Sin embargo, al observar la **Figura 6 d**, se puede inferir que el veneno de *B. taeniatus* no muestra diferencias significativas con respecto al control negativo, lo que sugiere que esta sustancia no posee actividad para esta toxina.

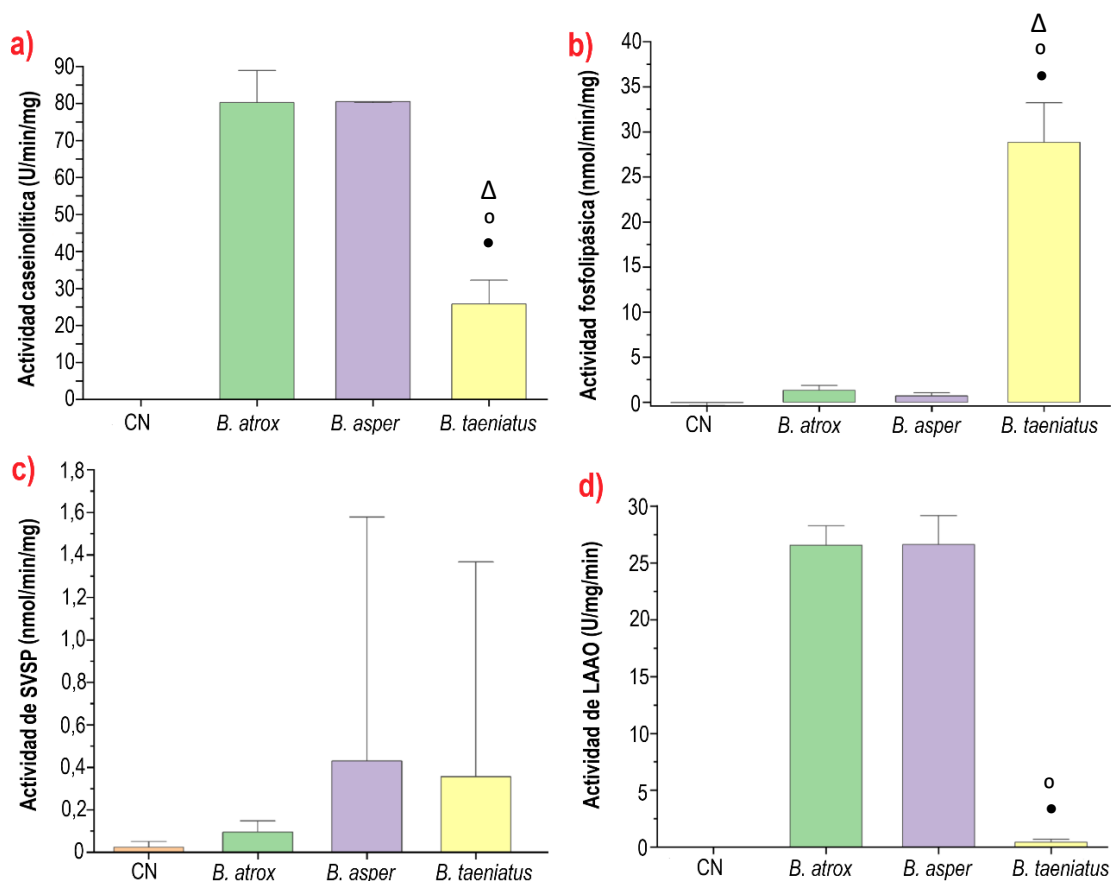


Figura 6. Actividades enzimáticas del veneno de *B. taeniatus*: a) caseinolítica, b) fosfolipásica, c) SVSP, y d) LAAO
Realizado por: Freire, Camila, 2023.

3.4. Ensayos biológicos

3.4.1. Ensayo de edema

La **Figura 7 a)** demuestra una gráfica de barras de medias agrupadas, esta muestra la actividad en porcentaje para diferentes concentraciones de veneno a lo largo del tiempo. Cada barra representa la actividad del veneno para una concentración específica en un tiempo determinado. Este porcentaje refleja el cambio relativo en el grosor de la pata de los ratones debido al edema inducido por el veneno, en comparación con el grosor de la pata inyectada con PBS, que actúa como control. Además, en la imagen se visualiza **b)** el efecto edemogénico en la pata de un ratón, posterior a la inyección.

El efecto edemogénico de este veneno fue observado en el incremento del grosor de las patas de los ratones inyectados, así como un cambio notorio de coloración en el área afectada (**Figura 7 b**). Este resultado demostró una elevada generación de edema durante las primeras horas, en comparación con el control, que consistió únicamente de la

inyección de PBS. Igualmente, se pudo verificar que, al cabo de 24 horas, se redujo, progresivamente el edema generado. Se pudo constatar (**Figura 7 a**) que a medida que transcurrió el tiempo, hubo variaciones en la actividad edemogénica, respectivo a las diferentes concentraciones de veneno inyectadas. De esta forma, se notó que las concentraciones más altas tienen una mayor actividad inicialmente, pero esta actividad disminuye, progresivamente, con el tiempo.

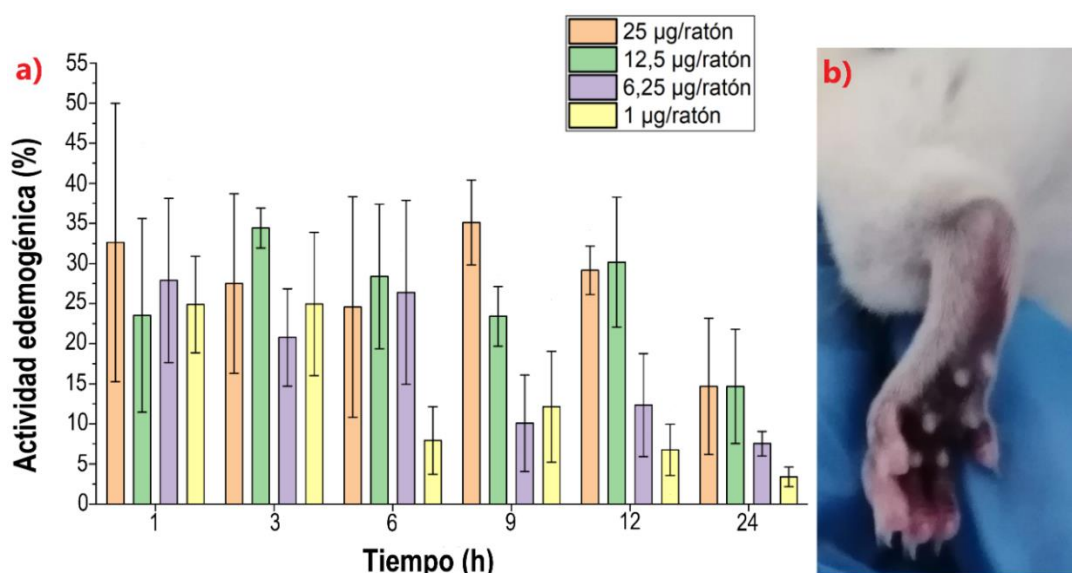


Figura 7. Actividad edemogénica del veneno de *B. taeniatus*: a) actividad para diferentes concentraciones de veneno a lo largo del tiempo, b) efecto en la pata de un ratón después de la inyección del veneno.

Realizado por: Freire, Camila, 2023.

3.4.2. Ensayo hemorrágico

Gracias a los datos obtenidos por medio de las pruebas de evaluación de la capacidad del veneno de *B. taeniatus* para inducir sangrado, se ha verificado que esta sustancia puede provocar hemorragias graves a concentraciones de 12,5 y 25 µg/ratón (**Figura 8 g, f**), moderada a 1 y 6,25 µg/ratón (**Figura 8 e, d**), y leves - nulas a 0,5 y 0,25 µg/ratón (**Figura 8 c, b**). Al calcular la DMH (Dosis Mínima Hemorrágica - nivel más bajo de veneno capaz de causar una hemorragia detectable), se obtuvo un valor de 0,469 µg/ratón. Este valor de DMH, al ser pequeño confirma la alta actividad hemorrágica del veneno de *B. taeniatus*. Por otra parte, como se puede observar en la gráfica (**Figura 8**), existe un aumento gradual en el diámetro hemorrágico, a medida que la concentración incrementa. Esta tendencia también se refleja visualmente en las imágenes individuales de la **Figura 8 b-g**, donde cada imagen corresponde a una concentración específica de veneno (0,25, 0,5, 1, 6,25, 12,5, 25 µg/ratón).

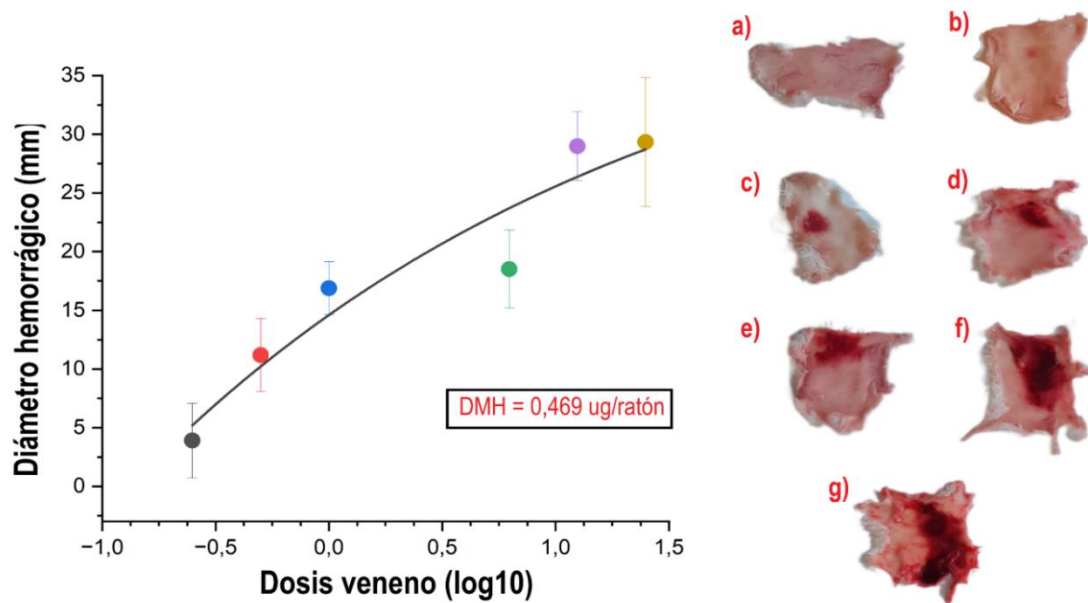


Figura 8. Curva de dosis-respuesta para la actividad hemorrágica del veneno de *B. taeniatus*, halo hemorrágico a diferentes concentraciones: a) Control, b) 0,25; c) 0,5; d) 1; e) 6,25; f) 12,5; g) 25 µg/ratón. Realizado por: Freire, Camila, 2023.

3.4.3. Curva de dosis - respuesta

Al administrar una dosis de 200 µg de veneno a los ratones, se observaron principalmente síntomas como aletargamiento, aturdimiento, debilidad, respiración acelerada, limitada capacidad de movimiento y, eventualmente, la muerte. Una vez se produjo el deceso de los individuos, se procedió a realizar disecciones, revelando daños severos en el tejido muscular y especialmente en los órganos del sistema digestivo. Asimismo, el veneno, en su concentración más alta (200 µg/ratón), produjo la muerte de todos los individuos al cabo de 2 h. Igualmente se verificó una acelerada mortalidad en las siguientes concentraciones (100, 50 y 25 µg/ratón). Por otra parte, no se presenciaron muertes de ratones en las concentraciones más bajas ni en el control, que solo constaba de PBS.

En la **Figura 9** se observa, en el eje Y la dosis del veneno en escala logarítmica (log10), y el eje X la proporción de muertes. Los puntos rojos en la gráfica representan la media de los datos recopilados en diferentes intervalos de tiempo (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 24, 48 horas), y las líneas verticales en cada punto reflejan el error estándar correspondiente.

Al analizar la curva de dosis-respuesta (**Figura 9**), se observó inicialmente una respuesta baja a dosis pequeñas. Luego, se produjo un rápido aumento en la respuesta a medida que la dosis se incrementaba, hasta alcanzar una meseta donde se alcanzó la máxima

respuesta. A partir de esta gráfica, se calculó el LD₅₀, que fue igual a 21,69 µg/ratón. Con base en estos resultados, al ser una dosis relativamente baja, se puede inferir que este veneno posee una alta letalidad. Cabe recalcar que, esta representación dosis-respuesta permite observar cómo la proporción de muertes varía con respecto a la dosis administrada.

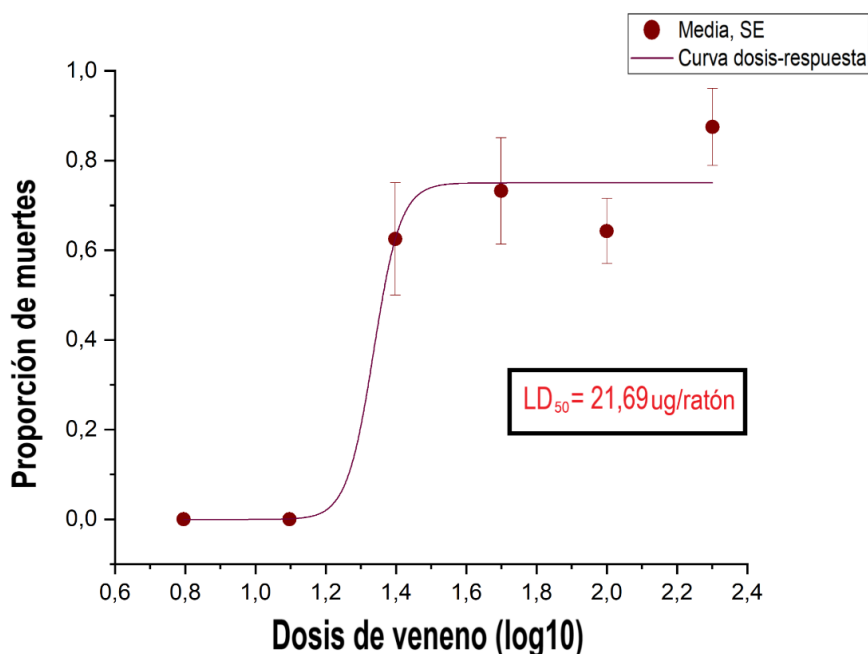


Figura 9. Curva de dosis-respuesta del veneno de *B. taeniatus*.
Realizado por: Freire, Camila, 2023.

3.4.4. Ensayos de Neutralización

Después de los ensayos toxicológicos del veneno de *B. taeniatus*, se evaluó la capacidad neutralizante del antiveneno polivalente comercial del INS de Colombia, disponible en las instalaciones del INSPI. En líneas generales, el suero antiofídico, posee inmunoglobulinas efectivas para inhibir los efectos hemorrágicos de este veneno (**Figura 10 a**). Por lo que, la **Figura 10 a** sugiere que al haber empleado 1 ml de antiveneno por cada mg de veneno, se logró inhibir totalmente la hemorragia en ratones. Además, se pudo observar visualmente una reducción significativa en la capacidad del veneno para provocar sangrado (**Figura 10 b**).

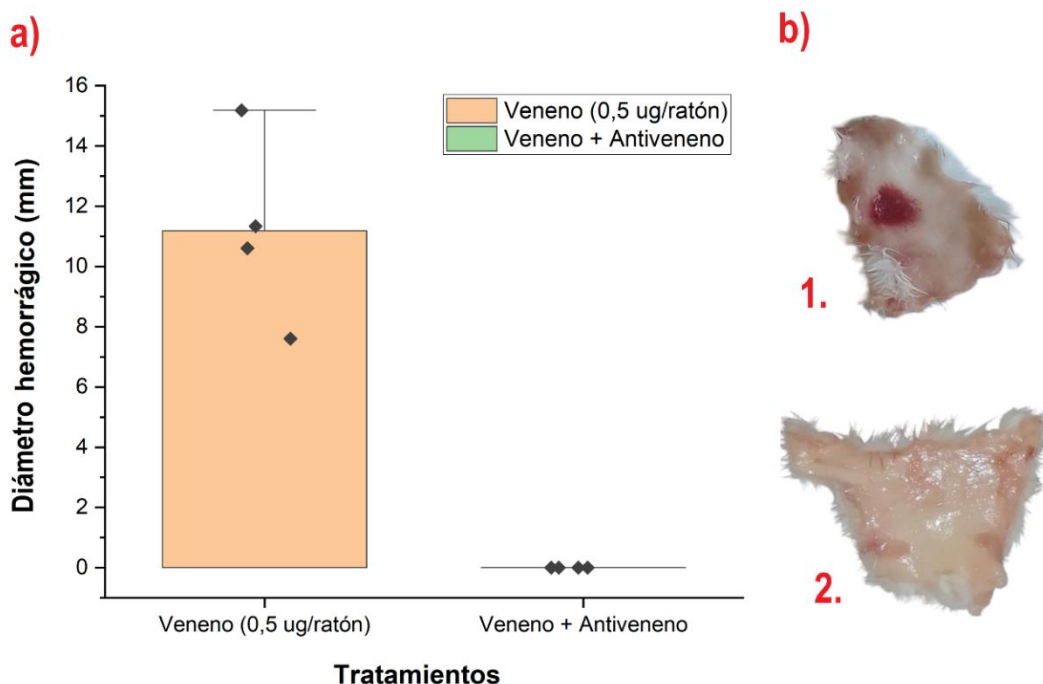


Figura 10. Neutralización del efecto hemorrágico de *B. taeniatus* por suero antiofídico, a) efecto sobre el diámetro del halo hemorrágico, b) impacto en la piel de ratón: 1. Con veneno, 2. con veneno y antiveneno.

Realizado por: Freire, Camila, 2023.

Por otro lado, se evaluó el impacto del suero antiofídico polivalente en la letalidad inducida por el veneno de *B. taeniatus*. Para este propósito, se empleó una concentración de referencia del veneno (25 $\mu\text{g}/\text{ratón}$), evidenciándose el fallecimiento de todos los individuos en un período de 6 horas (**Figura 11**). Sin embargo, al administrar este antiveneno, se constató una completa inhibición del efecto letal, manteniendo una tasa de supervivencia constante en 1 a lo largo del tiempo. Este análisis pone de manifiesto la habilidad de este suero para reducir la letalidad del veneno de *B. taeniatus*, resaltando su potencial en el tratamiento de mordeduras ocasionadas por esta especie de víbora.

En la **Figura 11** se puede observar el eje Y, que representa la tasa de supervivencia, mientras que el eje X indica el tiempo en horas. La línea y puntos rojos representan el efecto inhibitor del antiveneno empleado, mientras que los cuadros y línea negra demuestra la letalidad del veneno a una concentración 25 $\mu\text{g}/\text{ratón}$.

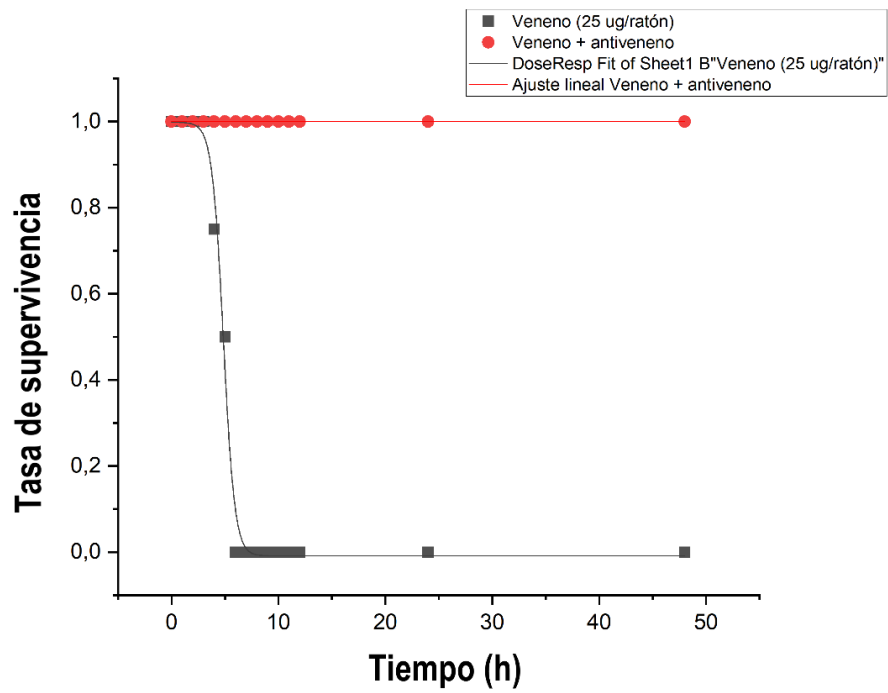


Figura 11. Neutralización de la letalidad del veneno de *B. taeniatus* por el suero antiofídico polivalente del INS.
Realizado por: Freire, Camila, 2023.

CAPITULO IV: DISCUSIÓN E INTERPRETACIÓN

El género *Bothrops* comprende a varias víboras de fosa que se encuentran distribuidas a lo largo de Centro y Sudamérica. Este género representa los taxones de la región con mayor importancia médica, y es el responsable de un elevado número de envenenamientos [44]. Sin embargo, el conocimiento acerca de la caracterización de sus venenos es bastante limitado, e incluso llega a ser inexistente para ciertas especies [26]. Entre estas serpientes se encuentra *B. taeniatus*, la cual es una víbora de foseta amazónica de tamaño mediano. Este animal se localiza en los países que contienen regiones amazónicas, y se la visibiliza muy rara vez por su coloración críptica [58].

Las serpientes del género *Bothrops* son conocidas principalmente por su capacidad de envenenamiento severo en humanos y otros animales. Es así como *B. taeniatus* ha sido reconocida como una de las serpientes más tóxicas a nivel global [60]. Por lo tanto, es de vital importancia llevar a cabo un estudio que comprenda la caracterización bioquímica y biológica de sus toxinas, así como la capacidad de neutralización por sueros antiofídicos comercializados en Ecuador. Estos datos son fundamentales para desarrollar estrategias terapéuticas y producir antivenenos eficaces. Por lo tanto, en este estudio se ha buscado caracterizar el veneno de *B. taeniatus* con el fin de ampliar el conocimiento sobre su toxicidad. Los resultados obtenidos proporcionan una base sólida para futuras investigaciones y la implementación de medidas preventivas y terapéuticas en casos de envenenamiento, especialmente en áreas menos favorecidas del país.

En la presente investigación se llevó a cabo el análisis del perfil cromatográfico de *B. taeniatus*, mediante RP-HPLC. Se identificaron 17 fracciones distintas, las cuales pueden señalar la posible presencia de ciertas toxinas como PLA₂, CTL, SVSP, CRiSP, NGF, VEGF, SVMP, LAAO, PDE, 5'NT, HA y PLB. De forma más específica, el perfil electroforético de SDS-PAGE, demostró abundancia en proteínas de bajo, mediano y alto peso molecular, tales como PLA₂, CTL (13-15 kDa), SVSP, PI-SVMP (23-33 kDa), PII-SVMP, PIII-SVMP y LAAO (46-58 kDa). En conjunto, el perfil bioquímico posiblemente indica la presencia, sobre todo, de PLA₂, CTL, SVSP, SVMP y LAAO. Justamente estas enzimas son características del veneno del género *Bothrops*. Según Sousa et al. (2018) [43], los venenos de este género de víboras contienen principalmente: SVMP, SVSP, PLA₂ y CTL. Igualmente, existen otros componentes que frecuentemente pueden ser encontrados en estos venenos, los cuales son: LAAO, 5'-NT, y HA [44]. Se conoce que la

mayoría de las proteínas del veneno de *Bothrops* al ser separadas en electroforesis con gel de poliacrilamida, migran entre 10 y 80 kDa. Sin embargo, se ha documentado la presencia de proteínas con una masa molecular superior a 100 kDa [44]. Según Calvete et al. (2007) [38], los venenos de viperinos, como *B. taeniatus*, pueden contener más de 100 componentes proteicos, los cuales pertenecen a unas pocas principales familias de proteínas como son SVSP, SVMP, LAAO, PLA₂, CTL, CRISP, DIS, ohanina, miotoxinas, y KUN.

Al llevar a cabo los ensayos enzimáticos, se encontró que el veneno de *B. taeniatus* ecuatoriana, presentaba elevados niveles de actividad fosfolipásica, mayores a los observados en *B. atrox* y *B. asper*, lo que puede señalar abundancia de esta toxina, principalmente isoformas acídicas o mayor capacidad catalítica. Sin embargo, estudios realizados por Kuch et al. (1996) [63], en Ecuador, demostraron que el veneno de *B. taeniatus* posee una actividad para PLA₂ menor a la observada en *B. asper* y *B. atrox*. Esto puede explicarse ya que este estudio fue realizado únicamente con el veneno extraído de dos individuos [63]. Por lo que, no necesariamente generaliza la actividad enzimática y biológica de esta sustancia. Por otro lado, en Brasil, Lomonte et al. (2020) [26] mencionan que *B. taeniatus* posee un veneno con una alta actividad fosfolipásica, incluso superior a la obtenida para *B. atrox* y *B. asper*. Al contrario, Guerra-Duarte et al. (2015) [62], señalan que *B. atrox* posee una capacidad fosfolipásica superior a *B. taeniatus*, aunque su diferencia es insignificante.

Las SVMPs son una de las toxinas más abundantes en los venenos de serpientes, representando alrededor del 35% del contenido total de proteínas. En los venenos del género *Bothrops*, las SVMPs constituyen el 75% de su contenido [86]. Bajo este contexto, se evidenció, en estos ensayos, que el veneno de *B. taeniatus* presentó actividad caseinólítica, lo cual según Shrivastava et al. (2017) [87], indica la presencia de SVMP, que representan un grupo diverso multifuncional. Asimismo, las SVMPs tienen la capacidad de hidrolizar los enlaces peptídicos de la caseína, al igual que pueden degradar otros componentes de la matriz extracelular de los tejidos. Contrariamente, estudios desarrollados en Perú por Guerra-Duarte et al. (2015) [62], indican que la actividad específica de SVMP para *B. taeniatus* fue extremadamente baja.

En adición, en el presente estudio no se obtuvo actividad ni de SVSP, así como para LAAO. De acuerdo con investigaciones previas por Porto et al. (2007), en la Amazonía brasilera [60], el veneno crudo de los géneros *Bothrops* y *Bothriopsis*, presentan elevada actividad

proteolítica (capacidad de una enzima para degradar una proteína. Ej. SVMP y SVSP). En particular, se observó una marcada potencia del veneno de *B. taeniatus* de Brasil en relación a la calicreína, la cual es una enzima perteneciente a la familia de las SVSP, capaz de desencadenar una cascada de coagulación [60,88]. Estos resultados son contrarios a los actuales encontrados en Ecuador. Esto puede deberse principalmente a la variación de la composición en los venenos de serpientes explicada por Dhananjaya et al. (2014) [14], quienes mencionan que estas sustancias pueden tener variaciones en sus toxinas, en función de su sexo, dieta y ubicación geográfica. En base a lo mencionado, en Perú el veneno de *B. taeniatus* presenta una moderada actividad específica tanto para SVSP como LAAO [62].

En este sentido, tanto los resultados expuestos en el perfil bioquímico del veneno, así como en los ensayos enzimáticos, fueron finalmente corroborados por medio de los análisis proteómicos. En los cuales se detectaron principalmente la presencia de PLA₂, en gran abundancia (48,52%) y SVMP (14,65%), lo cual puede explicar la actividad elevada fosfolipásica, y moderada de SVMPs. Por otro lado, se verificó un bajo porcentaje de SVSP y LAAO, lo que demuestra la baja actividad para ambas familias de toxinas.

Por otra parte, en la proteómica del veneno se verificó la existencia de otras familias como: CRiSP, VEGF, 5' NT, PDE, CTL, GPC, BFB, BR, y TEB. Según Mamede et al. (2020) [45], los venenos bothrópicos poseen algunos componentes en menor cantidad, como lo son PDE, CRiSP, DIS, y péptidos. Por otro lado, Gren et al. (2019) [44], menciona que en los venenos de serpientes se pueden identificar 5' NT, LAAO, y HA. Asimismo, Queiroz et al. (2008) [89], proponen que generalmente los venenos de *Bothrops*, incluyen SVSP, SVMP, PLA₂, LAAO, 5' NT, y CTL, que representan más del 90% de su peso seco. Mismas familias de proteínas dentro del veneno de *B. taeniatus* representaron el 68,04%.

Durante los análisis proteómicos realizados, se detectaron diversas proteínas en las fracciones 3-8, entre las cuales se identificaron mayoritariamente VEGF, CRiSP, SVSP, PLA₂, y BR. Según los tiempos de elución mencionados por Lomonte y Calvete (2017) [85], estas fracciones coinciden con PLA₂, CTL, SVSP, CRiSP, NGF y VEGF. Adicionalmente, en las fracciones 8-17 se identificaron SVMP, 5' NT, PDE, GPC, LAAO, PLA₂, TEB y CTL. Lomonte y Calvete [85], aseguran que, en el cromatograma, en los minutos de elución entre 60 y 90, que coinciden precisamente con las fracciones analizadas en este estudio, se pueden encontrar SVMP, LAAO, PDE, 5' NT y PLB. Estos resultados confirman la

presencia de estas proteínas en el veneno y respaldan la concordancia con los hallazgos de investigaciones anteriores.

Generalmente los venenos de viperinos se encuentran compuestos por toxinas hemorrágicas y mionecróticas. Se conoce que este tipo de venenos inducen una compleja reacción inflamatoria, con efectos locales como hemorragia, edema, dolor, y necrosis. Estas manifestaciones son resultado de sinergia entre toxinas y factores hemorrágicos, presentes en el veneno. Asimismo, se sabe que estas sustancias pueden desencadenar una respuesta inflamatoria celular [60]. Los efectos clínicos principales del envenenamiento por *Bothrops* incluyen edema, hemorragia, mionecrosis, y trastornos de coagulación sanguínea [43]. Los datos obtenidos tanto en el perfil bioquímico del veneno *B. taeniatus*, así como durante los ensayos enzimáticos, fueron verificados al llevar a cabo los análisis biológicos con ratones CD-1. Según Sousa et al. (2018) [43], las principales familias de proteínas involucradas en los efectos coagulopáticos sistémicos provocados por estos venenos son: SVMP, SVSP, PLA₂ y CTL. Estas toxinas tienen la capacidad de afectar los componentes de la cascada de coagulación, lo cual promueve la generación de hemorragia e interfiere en la agregación plaquetaria. Por otra parte, Porto et al. (2007) [62], mencionan que los venenos de este género de víboras se componen principalmente por toxinas capaces de interferir en los procesos de coagulación.

Principalmente los envenenamientos por mordeduras de este género causan lesiones locales. Específicamente, el veneno de *B. taeniatus* está caracterizado por ser hemorrágico, anticoagulante y miotóxico. En el presente estudio se dilucidó efectos hemorrágicos causados por esta sustancia. En los resultados se pudieron observar que este veneno puede provocar efectos hemorrágicos muy altos, calculándose una DMH de 0,469 µg/ratón, inferior a la presenciada en otras investigaciones. Estudios llevados a cabo en Brasil señalan que *B. taeniatus* posee una DMH equivalente a 1,8 mg/ratón, lo cual implica que esta sustancia venenosa provoca sangrado desmedido, superando a los efectos causados por *B. atrox* (DMH = 18,2 mg/ratón) [90]. La hemorragia se refiere a la salida repentina de sangre de un vaso sanguíneo que ha sufrido daño [91]. Este malestar es común y relevante en las mordeduras de serpientes viperinas, causando sangrado en varios órganos y siendo una de las consecuencias más graves del envenenamiento [92]. Se cree que los efectos hemorrágicos causados por estas sustancias se deben principalmente a la actividad de proteinasas, en específico a SVMPs. Según Gutierrez, et al. (2016) [92], las SVSPs y las SVMPs reducen la capacidad de coagulación al imitar a la trombina y activar factores coagulantes. En algunos casos, los componentes

procoagulantes o el daño al revestimiento vascular pueden causar trombosis regional y eventos isquémicos. Estos procesos complican la fisiopatología cardiovascular [92]. Por otro lado, los análisis hechos por Porto et al. (2007) [60], señalan que el veneno de *B. taeniatus* demuestra actividad hemorrágica en ratones inyectados, la cual está asociada a la actividad enzimática proteolítica presente en los venenos de serpientes de la familia *Viperidae*.

Además, este veneno también presentó actividad edematogénica, lo cual fue visible con el incremento en el grosor del área afectada (pata), posterior a la administración de esta sustancia. Igualmente se pudo observar una variación en la coloración de esta zona. El edema es una acumulación de líquido en los tejidos, resultando en la hinchazón y aumento del volumen de la zona afectada. Las toxinas presentes en los venenos de serpientes influyen a la permeabilidad de los vasos sanguíneos y los tejidos circundantes, lo que conduce a la salida y acumulación de líquido [93]. Los venenos de serpiente del género *Bothrops* son capaces de inducir diferentes eventos inflamatorios, entre estos se incluye los edemas. Estos eventos pueden evolucionar a una respuesta inflamatoria excesiva dependiendo del volumen de veneno inyectado [94].

De acuerdo a Texeira et al. (2019) [94], la respuesta edematogénica a los venenos de estas serpientes, depende de la liberación de reguladores inflamatorios sinérgicos, que aumentan la permeabilidad vascular y la vasodilatación. Por otra parte, otros autores atribuyen este efecto a la presencia de SVMPs y PLA₂. Según Olaoba et al. (2020) [95], las SVMPs tienen la capacidad de inducir: hemorragia, degradación proteolítica de fibrinógeno y fibrina, apoptosis, e inhibir la agregación plaquetaria, como ya ha sido explicado anteriormente. Mientras Carregari et al. (2016) [96], ha reportado que las PLA₂s son capaces de catalizar la hidrólisis del enlace éster acílico de los 1,2-di-acil-3-sn-fosfoglicéridos en la posición sn-2, estas enzimas poseen una amplia gama de actividades como neurotoxicidad, miotoxicidad, y cardiotoxicidad. Además, pueden ser anticoagulantes y hemolíticas, e inducen principalmente a hemorragias y edemas. Cabe destacar que el edema local es una manifestación clínica significativa en las personas que han sufrido una mordedura de serpiente del género *Bothrops*. Esto se debe a que a menudo estos accidentes ofídicos resultan en la compresión de los nervios, lo que contribuye a la pérdida de tejido y discapacidad [94].

Bajo lo mencionado anteriormente, en el presente estudio, se evaluó la letalidad del veneno de *B. taeniatus*, mediante la administración de diferentes dosis a ratones de laboratorio. Al

administrar una dosis de 200 µg de veneno, se observaron síntomas como aletargamiento, aturdimiento, debilidad, dificultades en la respiración, limitada capacidad de movimiento y muerte. Los venenos de serpiente del género *Bothrops* provocan coagulopatía, trombocitopenia, edema, inflamación, shock y diferentes tipos de hemorragias. Estos efectos son causados por la compleja composición de toxinas, los cuales son utilizadas para inmovilizar, por medio del fallo respiratorio o cardíaco, y matar a sus presas [97]. En este sentido, la hemorragia puede conducir a choque cardiovascular, falla renal aguda secundaria, necrosis tubular aguda y glomerulonefritis, lo que finalmente desemboca en la muerte. Esta sintomatología es el resultado tanto de la actividad de cada toxina como de la sinergia entre los diferentes componentes del veneno [50].

La curva de dosis-respuesta del veneno de *B. taeniatus* en ratones mostró que a medida que las concentraciones aumentaron, el veneno produjo un incremento rápido en la respuesta por parte de los individuos estudiados. El cálculo de la LD₅₀ reveló que una dosis relativamente baja del veneno puede ser mortal para los ratones (21,69 µg/ratón). Por otro lado, Kuch et al. (1996) [63], encontraron que el veneno de *B. taeniatus* tuvo una LD₅₀ bastante baja, lo que sugiere, según estos autores, que el veneno de esta especie de *Bothrops* es altamente letal (4,5 mg/Kg). Sin embargo, el obtenido en la actual investigación es mucho más inferior que el presentado en el estudio llevado a cabo por Kuch et al. En el mismo sentido, la LD₅₀ calculado por Porto et al. (2007) [60], en especies brasileras fue de 1,47 mg/Kg. Esto sugiere que en el caso del veneno de *B. taeniatus* ecuatoriana, este es altamente tóxico, incluso más que el de otras especies como *B. atrox*, cuya LD₅₀ reportado ha sido de 3,39 mg/Kg [61], e incluso, más letal que el veneno de la misma especie, proveniente de otras zonas geográficas. Estos resultados resaltan la complejidad de los venenos de serpiente y la necesidad de investigaciones adicionales para comprender completamente sus efectos.

La alta toxicidad de este veneno puede deberse no únicamente a la acción de cada una de sus toxinas, si no al sinergismo entre ellas. Es importante destacar que *B. taeniatus* pertenece a la familia de serpientes *Viperidae*, la cual se caracteriza por la complejidad de sus venenos. Principalmente, la formación de enlaces disulfuro y la proteólisis, contribuyen a la oligomerización de los componentes de estas sustancias. Algunas proteínas de los venenos de estas serpientes pueden combinarse específicamente a través de interacciones covalentes o no covalentes para generar complejos (homodímeros o heterodímeros). Estas toxinas conocidas por estar compuestas por múltiples cadenas polipeptídicas unidas por enlaces disulfuro en venenos viperinos incluyen PLA₂, CTL,

SVMP, LAAO, y DIS [98]. Precisamente, se ha observado sinergia entre las SVMP y otros componentes del veneno en el género *Bothrops*. Incluyendo SVMP no hemorrágicas que degradan la matriz extracelular. Además, se ha descrito un fenómeno en el que las PLA₂s son capaces de potenciar el efecto de desprendimiento celular inducido por SVMPs hemorrágicas. Asimismo, el panorama inflamatorio generado por varios componentes tras la inyección del veneno probablemente promueve alteraciones vasculares que podrían potenciar el efecto de estas enzimas sobre la microvasculatura [92]. Por ello, se puede mencionar que, en conjunto, estos resultados demuestran que el veneno de *B. taeniatus* posee una alta letalidad, lo que lo convierte en una sustancia altamente tóxica. Estos hallazgos son consistentes con la toxicidad conocida de las serpientes del género *Bothrops* y resaltan la importancia de investigar métodos que permitan generar sueros capaces de neutralizar sus toxinas.

El presente estudio investigó la capacidad de neutralización del suero antiofídico colombiano del INS sobre el veneno de *B. taeniatus*. Los resultados revelaron una neutralización total de la letalidad y de los efectos hemorrágicos del veneno. Esto fue evidenciado en el aumento al 100% de la supervivencia de los individuos estudiados, y en una reducción significativa de la capacidad del veneno para causar sangrado. Estos hallazgos indican que el antiveneno utilizado posee una alta eficacia para neutralizar tanto la actividad hemorrágica como la letalidad del veneno de *B. taeniatus*. Los estudios llevados a cabo en el Instituto de Butantan, en Brasil, demostraron una neutralización pobre, de algunas toxinas del veneno de esta especie de víbora [61]. En contraparte, Theakston et al. (1995) [99], mencionan que un antisuero producido en Brasil para especies de *Bothrops*, resultó ser más efectivo en neutralizar los principales venenos del Ecuador, seguido por los sueros colombianos. Asimismo, Romero Vargas (2014) [90], menciona que un antiveneno desarrollado mediante la preincubación de venenos de *B. atrox* y *B. taeniatus* de las cuencas del Amazonas y Maranhão, respectivamente, fue capaz de neutralizar la actividad hemorrágica de esta sustancia tóxica. Por lo tanto, la comprensión de los mecanismos de acción y los efectos del veneno de serpiente es crucial para el desarrollo de tratamientos efectivos en casos de envenenamiento. Es fundamental contar con estrategias de tratamiento adecuadas para abordar los efectos potencialmente dañinos de accidentes ofídicos [50].

CAPITULO V: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

- El perfil bioquímico del veneno de *B. taeniatus* demostró la presencia de toxinas de importancia médica dentro de cada una de las 17 fracciones obtenidas mediante RP-HPLC. Estas familias de enzimas fueron corroboradas mediante los análisis proteómicos, en donde se dilucido elevada abundancia de PLA₂, mismas que representan un 48,52%, y SVMP que son de 14,65%, del total de la composición del veneno. Mediante los análisis proteómicos, se pudieron observar otras familias de proteínas en menor proporción: CTL, VEGF, LAAO, PDE, CRiSP, GPC, BFB, BR, y TEB.
- Asimismo, mediante ensayos enzimáticos se demostró que el veneno de esta especie de víbora de fosa posee una elevada actividad fosfolipásica, incluso mayor que otras especies como *B. atrox* y *B. asper*. Igualmente, se verificó la existencia de actividad para SVMP. En contra parte se pudo evidenciar bajos niveles de actividad específica para LAAO y SVSP. Estos resultados pueden ser respaldados con los obtenidos en los análisis proteómicos mencionados previamente.
- En otro sentido, mediante los ensayos en ratones CD-1, se observó alta actividad hemorrágica y edematogénica, causada principalmente por la abundancia de SVMP y PLA₂s respectivamente, las cuales están principalmente relacionados con el daño vascular e inflamación. De igual forma, el veneno de *B. taeniatus*, ha demostrado ser altamente toxico, y su envenenamiento puede ir acompañado de diferentes sintomatologías como aletargamiento, aturdimiento, debilidad, dificultades en la respiración, y limitada capacidad de movimiento. Finalmente, se verifico una eficaz neutralización del veneno de esta serpiente, tanto para la letalidad, como para la actividad hemorrágica, por parte del suero antiofídico del INS proveniente de Colombia.
- La presente investigación abre paso a diferentes estudios a futuro que permitan la compresión de la estructura, modo de acción e interacción de las toxinas caracterizadas en este veneno.

REFERENCIAS

1. Still KR, Watson KD, Wexler P. History of toxicology. Information resources in toxicology. Elsevier; 2020. pp. 11–32. doi:10.1016/B978-0-12-813724-6.00002-5
2. Toxicology, n. Oxford English Dictionary. Oxford University Press; 2023. doi:10.1093/OED/5321578781
3. Pope C, Liu J. An introduction to interdisciplinary toxicology from molecules to man. Londres; 2020.
4. Stine KE, Brown TM. Principles of toxicology. 3rd ed. CRC Press; 2015.
5. Doull J, Casette. Toxicology: The basic science of poisons. Klaassen C, editor. Kansas; 2019.
6. Maestri E. The 3Rs principle in animal experimentation: A legal review of the state of the art in Europe and the case in Italy. BioTech. 2021;10: 9. doi:10.3390/biotech10020009
7. Roberts S, James R, Williams P. Principles of toxicology environmental and industrial applications. Wiley; 2022.
8. Gopalakrishnakone P, Balali-Mood M, Llewellyn L. Biological toxins and bioterrorism. Singh B, editor. Springer Netherlands; 2015.
9. Kem WR. Marine Venoms and Toxins. Encyclopedia of toxicology. Elsevier; 2014. pp. 160–163. doi:10.1016/B978-0-12-386454-3.00035-X
10. Cruz L, Luo S. Toxins and drug discovery. Gopalakrishnakone P, editor. Dordrecht: Springer Netherlands; 2017. doi:10.1007/978-94-007-6452-1
11. Real Academia Española: Diccionario de la lengua española. 23rd ed.
12. Malhotra A. Evolution of venomous animals and their toxins. Gopalakrishnakone P, editor. Springer Netherland; 2017.
13. Wilcox C. Venomous: How Earth's deadliest creatures mastered biochemistry. 1st Ed. Farrar, Straus, Giroux, editors. Nueva York; 2017.
14. Dhananjaya BL, Menon JC, Joseph JK, Kumar DA, Oommen O V. Snake venom detection Kit (SVDK): Update on current aspects and challenges. Clinical Toxinology. Dordrecht: Springer Netherlands; 2014. pp. 1–19. doi:10.1007/978-94-007-6288-6_39-1
15. Valencia J, Garzón-Tello K, Barragán-Paladines M, Oxford P, Delgado M, Ruiz V. Serpientes venenosas del ecuador: Sistemática, taxonomía, historia natural, conservación, envenenamiento y aspectos antropológicos. Fundación Herpetológica Gustavo Orcés, editor. 2016.
16. Waheed H, Moin SF, Choudhary MI. Snake venom: From deadly toxins to life-saving therapeutics. Curr Med Chem. 2017;24. doi:10.2174/0929867324666170605091546
17. King G. Venoms to drugs: Translating venom peptides into therapeutics. Special technical feature. 2013.
18. Bhattacharjee P, Bhattacharyya D. Therapeutic use of snake venom components: A Voyage from ancient to modern India. Organic Chemistry. 2014.
19. Utkin YN. Animal venom studies: Current benefits and future developments. World J Biol Chem. 2015;6: 28. doi:10.4331/wjbc.v6.i2.28
20. Slagboom J, Kool J, Harrison RA, Casewell NR. Haemotoxic snake venoms: their functional activity, impact on snakebite victims and pharmaceutical promise. Br J Haematol. 2017;177: 947–959. doi:10.1111/bjh.14591

21. Gutiérrez JM, Calvete JJ, Habib AG, Harrison RA, Williams DJ, Warrell DA. Snakebite envenoming. *Nat Rev Dis Primers*. 2017;3: 17063. doi:10.1038/nrdp.2017.63
22. Chippaux J-P. Incidence and mortality due to snakebite in the Americas. *PLoS Negl Trop Dis*. 2017;11: e0005662. doi:10.1371/journal.pntd.0005662
23. Patiño RSP, Salazar-Valenzuela D, Robles-Loaiza AA, Santacruz-Ortega P, Almeida JR. A retrospective study of clinical and epidemiological characteristics of snakebite in Napo Province, Ecuadorian Amazon. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2023;117: 118–127. doi:10.1093/trstmh/trac071
24. Calvete JJ, Sanz L, Angulo Y, Lomonte B, Gutiérrez JM. Venoms, venomics, antivenomics. *FEBS Lett*. 2009;583: 1736–1743. doi:10.1016/j.febslet.2009.03.029
25. Mohamed Abd El-Aziz, Garcia Soares, Stockand. Snake venoms in drug discovery: Valuable therapeutic tools for life saving. *Toxins (Basel)*. 2019;11: 564. doi:10.3390/toxins11100564
26. 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. doi:10.1016/j.toxcx.2020.100044
27. Tasoulis T, Pukala TL, Isbister GK. Investigating toxin diversity and abundance in snake venom proteomes. *Front Pharmacol*. 2022;12. doi:10.3389/fphar.2021.768015
28. Patiño RSP, Salazar-Valenzuela D, Medina-Villamizar E, Mendes B, Proaño-Bolaños C, da Silva SL, et al. *Bothrops atrox* from Ecuadorian Amazon: Initial analyses of venoms from individuals. *Toxicon*. 2021;193: 63–72. doi:10.1016/j.toxicon.2021.01.007
29. Valenta J. Venomous Snakes - envenoming, therapy. Nova Science; 2008.
30. Pucca MB, Cerni FA, Janke R, Bermúdez-Méndez E, Ledsgaard L, Barbosa JE, et al. History of envenoming therapy and current perspectives. *Front Immunol*. 2019;10. doi:10.3389/fimmu.2019.01598
31. Knudsen C, Laustsen A. Recent Advances in next generation snakebite antivenoms. *Trop Med Infect Dis*. 2018;3: 42. doi:10.3390/tropicalmed3020042
32. Alangode A, Rajan K, Nair BG. Snake antivenom: Challenges and alternate approaches. *Biochem Pharmacol*. 2020;181: 114135. doi:10.1016/j.bcp.2020.114135
33. Morais V. Antivenom therapy: efficacy of premedication for the prevention of adverse reactions. *Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases*. 2018;24: 7. doi:10.1186/s40409-018-0144-0
34. Patikorn C, Ismail AK, Abidin SAZ, Blanco FB, Blessmann J, Choumlivong K, et al. Situation of snakebite, antivenom market and access to antivenoms in ASEAN countries. *BMJ Glob Health*. 2022;7: e007639. doi:10.1136/bmjgh-2021-007639
35. Lalloo* DG, Theakston RDG. Snake Antivenoms. *J Toxicol Clin Toxicol*. 2003;41: 277–290. doi:10.1081/CLT-120021113
36. Slagboom J, Kaal C, Arrahman A, Vonk FJ, Somsen GW, Calvete JJ, et al. Analytical strategies in venomics. *Microchemical Journal*. 2022;175: 107187. doi:10.1016/j.microc.2022.107187
37. Tan CH. Snake venomics: Fundamentals, recent updates, and a look to the next decade. *Toxins (Basel)*. 2022;14: 247. doi:10.3390/toxins14040247
38. Calvete JJ, Juárez P, Sanz L. Snake venomics. Strategy and applications. *Journal of Mass Spectrometry*. 2007;42: 1405–1414. doi:10.1002/jms.1242
39. Tasoulis T, Isbister G. A review and database of snake venom proteomes. *Toxins (Basel)*. 2017;9: 290. doi:10.3390/toxins9090290
40. Escoubas P, King GF. Venomics as a drug discovery platform. *Expert Rev Proteomics*. 2009;6: 221–224. doi:10.1586/epr.09.45

41. Resiere D, Monteiro W, Houcke S, Pujo JM, Mathien C, Mayence C, et al. *Bothrops* snakebite envenomings in the Amazon Region. *Curr Trop Med Rep*. 2020;7: 48–60. doi:10.1007/s40475-020-00203-4
42. da Silva Aguiar W, da Costa Galizio N, Sant'Anna SS, Silveira GPM, de Souza Rodrigues F, Grego KF, et al. Ontogenetic study of *Bothrops jararacussu* venom composition reveals distinct profiles. *Toxicon*. 2020;186: 67–77. doi:10.1016/j.toxicon.2020.07.030
43. Sousa L, Zdenek C, Dobson J, op den Brouw B, Coimbra F, Gillett A, et al. Coagulotoxicity of *Bothrops* (Lancehead Pit-Vipers) venoms from Brazil: Differential biochemistry and antivenom efficacy resulting from prey-driven venom variation. *Toxins (Basel)*. 2018;10: 411. doi:10.3390/toxins10100411
44. Gren ECK, Kitano ES, Andrade-Silva D, Iwai LK, Reis MS, Menezes MC, et al. Comparative analysis of the high molecular mass subproteomes of eight *Bothrops* snake venoms. *Comp Biochem Physiol Part D Genomics Proteomics*. 2019;30: 113–121. doi:10.1016/j.cbd.2019.01.012
45. Mamede CCN, de Sousa Simamoto BB, da Cunha Pereira DF, de Oliveira Costa J, Ribeiro MSM, de Oliveira F. Edema, hyperalgesia and myonecrosis induced by Brazilian bothropic venoms: overview of the last decade. *Toxicon*. 2020;187: 10–18. doi:10.1016/j.toxicon.2020.08.016
46. Oyama E, Takahashi H. Structures and functions of snake venom metalloproteinases (SVMP) from *Protobothrops* venom Collected in Japan. *Molecules*. 2017;22: 1305. doi:10.3390/molecules22081305
47. Mahjoub Y, Malaquin S, Ducancel F. Structural and functional diversity of snake Sarafotoxins. *Snake Venoms*. Dordrecht: Springer Netherlands; 2016. pp. 1–12. doi:10.1007/978-94-007-6648-8_1-1
48. Markland FS, Swenson S. Snake venom metalloproteinases. *Toxicon*. 2013;62: 3–18. doi:10.1016/j.toxicon.2012.09.004
49. Larréché S, Chippaux J-P, Chevillard L, Mathé S, Résière D, Siguret V, et al. Bleeding and Thrombosis: Insights into pathophysiology of *Bothrops* venom-related hemostasis disorders. *Int J Mol Sci*. 2021;22: 9643. doi:10.3390/ijms22179643
50. Hatakeyama DM, Tasima LJ, Bravo-Tobar CA, Serino-Silva C, Tashima AK, Rodrigues CFB, et al. Venom complexity of *Bothrops atrox* (common lancehead) siblings. *Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases*. 2020;26. doi:10.1590/1678-9199-jvatitd-2020-0018
51. Hedstrom L. Serine protease mechanism and specificity. *Chem Rev*. 2002;102: 4501–4524. doi:10.1021/cr000033x
52. Matsui T, Fujimura Y, Titani K. Snake venom proteases affecting hemostasis and thrombosis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology*. 2000;1477: 146–156. doi:10.1016/S0167-4838(99)00268-X
53. Tani K, Kogure T, Inoue H. The intracellular phospholipase A1 protein family. *Biomol Concepts*. 2012;3: 471–478. doi:10.1515/bmc-2012-0014
54. Murakami M, Sato H, Taketomi Y. Updating phospholipase A2 biology. *Biomolecules*. 2020;10: 1457. doi:10.3390/biom10101457
55. LU Q, CLEMETSON JM, CLEMETSON KJ. Snake venoms and hemostasis. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 2005;3: 1791–1799. doi:10.1111/j.1538-7836.2005.01358.x
56. 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. doi:10.1016/j.jprot.2016.10.006
57. Amorim F, Costa T, Baiwir D, De Pauw E, Quinton L, Sampaio S. Proteopeptidomic, Functional and immunoreactivity characterization of *Bothrops moojeni* snake venom: Influence of snake gender on venom composition. *Toxins (Basel)*. 2018;10: 177. doi:10.3390/toxins10050177

58. Powell RL, Eversole CB, Lizarro D, Crocker A V., Calderón Vaca G, Surovic EA. *Bothrops taeniatus* Wagler, 1824 (serpentes, viperidae): additional country record and list of voucher specimens for Bolivia. Check List. 2020;16: 1143–1147. doi:10.15560/16.5.1143
59. Torres-Carvajal O, Pazmiño-Otamendi G, Ayala-Varela F, Salazar-Valenzuela D. Reptiles del Ecuador. In: *Bothrops taeniatus*. 2021.
60. Porto BN, Telli CA, Dutra TP, Alves LS, Bozza MT, Fin CA, et al. Biochemical and biological characterization of the venoms of *Bothriopsis bilineata* and *Bothriopsis taeniata* (Serpentes: Viperidae). Toxicon. 2007;50: 270–277. doi:10.1016/j.toxicon.2007.03.020
61. Furtado M de FD, Cardoso ST, Soares OE, Pereira A Pietro, Fernandes DS, Tambourgi DV, et al. Antigenic cross-reactivity and immunogenicity of *Bothrops* venoms from snakes of the Amazon region. Toxicon. 2010;55: 881–887. doi:10.1016/j.toxicon.2009.12.014
62. Guerra-Duarte C, Lopes-Peixoto J, Fonseca-de-Souza BR, Stransky S, Oliveira D, Schneider FS, et al. Partial in vitro analysis of toxic and antigenic activities of eleven Peruvian pitviper snake venoms. Toxicon. 2015;108: 84–96. doi:10.1016/j.toxicon.2015.09.007
63. 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. doi:10.1016/0041-0101(96)00016-5
64. Ortiz-Prado E, Yeager J, Andrade F, Schiavi-Guzman C, Abedrabbo-Figueroa P, Terán E, et al. Snake antivenom production in Ecuador: Poor implementation, and an unplanned cessation leads to a call for a renaissance. Toxicon. 2021;202: 90–97. doi:10.1016/j.toxicon.2021.09.014
65. 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:10.1016/j.toxcx.2020.100051
66. Ledsgaard L, Jenkins T, Davidsen K, Krause K, Martos-Esteban A, Engmark M, et al. Antibody cross-reactivity in antivenom research. Toxins (Basel). 2018;10: 393. doi:10.3390/toxins10100393
67. Jain D, Kumar S. Snake venom: A potent anticancer agent. Asian Pacific Journal of Cancer Prevention. 2012;13: 4855–4860. doi:10.7314/APJCP.2012.13.10.4855
68. Bernardes CP, Menaldo DL, Camacho E, Rosa JC, Escalante T, Rucavado A, et al. Proteomic analysis of *Bothrops pirajai* snake venom and characterization of BpirMP, a new P-I metalloproteinase. J Proteomics. 2013;80: 250–267. doi:10.1016/j.jprot.2013.01.021
69. LAEMMLI UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature. 1970;227: 680–685. doi:10.1038/227680a0
70. Almeida MT de, Freitas-de-Sousa LA, Colombini M, Gimenes SNC, Kitano ES, Faquim-Mauro EL, et al. Inflammatory reaction induced by two metalloproteinases isolated from *Bothrops atrox* venom and by fragments generated from the hydrolysis of basement membrane components. Toxins (Basel). 2020;12: 96. doi:10.3390/toxins12020096
71. Sanz L, de Freitas-Lima LN, Quesada-Bernat S, Graça-de-Souza VK, Soares AM, Calderón L de A, et al. Comparative venomomics of Brazilian coral snakes: *Micrurus frontalis*, *Micrurus spixii spixii*, and *Micrurus surinamensis*. Toxicon. 2019;166: 39–45. doi:10.1016/j.toxicon.2019.05.001
72. 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. doi:10.3390/ijms232314686
73. Almeida JR, Mendes B, Patiño RSP, Pico J, Laines J, Terán M, et al. Assessing the stability of historical and desiccated snake venoms from a medically important Ecuadorian collection. Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology. 2020;230: 108702. doi:10.1016/j.cbpc.2020.108702
74. Lomonte B, Gutiérrez JM. Proteolytic activity of snake venoms of Costa Rica on casein. Rev Biol Trop. 1983;31: 37–40.

75. Holzer M, Mackessy SP. An aqueous endpoint assay of snake venom phospholipase A2. *Toxicon*. 1996;34: 1149–1155. doi:10.1016/0041-0101(96)00057-8
76. Almeida JR, Lancellotti M, Soares AM, Calderon LA, Ramírez D, González W, et al. CoaTx-II, a new dimeric Lys49 phospholipase A2 from *Crotalus oreganus abyssus* snake venom with bactericidal potential: Insights into its structure and biological roles. *Toxicon*. 2016;120: 147–158. doi:10.1016/j.toxicon.2016.08.007
77. Almeida JR, Resende LM, Silva AG, Ribeiro RIMA, Stábeli RG, Soares AM, et al. Biochemical and functional studies of ColTx-I, a new myotoxic phospholipase A2 isolated from *Crotalus oreganus lutosus* (Great Basin rattlesnake) snake venom. *Toxicon*. 2016;117: 1–12. doi:10.1016/j.toxicon.2016.03.008
78. 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. doi:10.1016/S0305-0491(97)00294-0
79. Vilca-Quispe A, Ponce-Soto LA, Winck FV, Marangoni S. Isolation and characterization of a new serine protease with thrombin-like activity (TLBm) from the venom of the snake *Bothrops marajoensis*. *Toxicon*. 2010;55: 745–753. doi:10.1016/j.toxicon.2009.11.006
80. Costal-Oliveira F, Stransky S, Guerra-Duarte C, Naves de Souza DL, Vivas-Ruiz DE, Yarlequé A, et al. L-amino acid oxidase from *Bothrops atrox* snake venom triggers autophagy, apoptosis and necrosis in normal human keratinocytes. *Sci Rep*. 2019;9: 781. doi:10.1038/s41598-018-37435-4
81. Wei X-L, Wei J-F, Li T, Qiao L-Y, Liu Y-L, Huang T, et al. Purification, characterization and potent lung lesion activity of an L-amino acid oxidase from *Agkistrodon blomhoffii ussurensis* snake venom. *Toxicon*. 2007;50: 1126–1139. doi:10.1016/j.toxicon.2007.07.022
82. 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. doi:10.7883/yoken1952.13.43
83. Universidad de Costa Rica, Facultad de Microbiología, Instituto Clodomiro Picado. Determinación de actividades tóxicas de venenos de serpientes y su neutralización por antivenenos. 2007.
84. Lomonte B, Tarkowski A, Hanson L. Host response to *Bothrops asper* snake venom. *Inflammation*. 1993;17: 93–105. doi:10.1007/BF00916097
85. 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: 26. doi:10.1186/s40409-017-0117-8
86. Torres-Huaco FD, Maruñak S, Teibler P, Bustillo S, Acosta de Pérez O, Leiva LC, et al. Local and systemic effects of BtaMP-1, a new weakly hemorrhagic Snake Venom Metalloproteinase purified from *Bothriopsis taeniata* Snake Venom. *Int J Biol Macromol*. 2019;141: 1044–1054. doi:10.1016/j.ijbiomac.2019.09.032
87. Shrivastava R, Singh P, Yasir M, Hazarika R, Sugunan S. A Review on venom enzymes neutralizing ability of secondary metabolites from medicinal plants. *J Pharmacopuncture*. 2017;20: 173–178. doi:10.3831/KPI.2017.20.020
88. Patel S. A critical review on serine protease: Key immune manipulator and pathology mediator. *Allergol Immunopathol (Madr)*. 2017;45: 579–591. doi:10.1016/j.aller.2016.10.011
89. Queiroz GP, Pessoa LA, Portaro FCV, Furtado M de FD, Tambourgi D V. Interspecific variation in venom composition and toxicity of Brazilian snakes from *Bothrops* genus. *Toxicon*. 2008;52: 842–851. doi:10.1016/j.toxicon.2008.10.002
90. RomeroVargas FF. Biochemical Characterization of a PLA2 Btae TX-I Isolated from *Bothriopsis taeniata* snake venom: A pharmacological and morphological study. *J Clin Toxicol*. 2014;04. doi:10.4172/2161-0495.1000197
91. Johnson AB, Burns B. Hemorrhage. 2023.

92. Gutiérrez J, Escalante T, Rucavado A, Herrera C. Hemorrhage caused by snake venom metalloproteinases: A journey of discovery and understanding. *Toxins (Basel)*. 2016;8: 93. doi:10.3390/toxins8040093
93. Gasanov SE. Snake venom cytotoxins, phospholipase A2s, and Zn²⁺-dependent Metalloproteinases: Mechanisms of action and pharmacological relevance. *J Clin Toxicol*. 2014;4. doi:10.4172/2161-0495.1000181
94. Teixeira C, Fernandes CM, Leiguez E, Chudzinski-Tavassi AM. Inflammation induced by platelet-activating viperid snake venoms: Perspectives on thromboinflammation. *Front Immunol*. 2019;10. doi:10.3389/fimmu.2019.02082
95. Olaoba OT, Karina dos Santos P, Selistre-de-Araujo HS, Ferreira de Souza DH. Snake venom metalloproteinases (svmps): A structure-function update. *Toxicon X*. 2020;7: 100052. doi:10.1016/j.toxcx.2020.100052
96. Carregari VC, Dai J, Verano-Braga T, Rocha T, Ponce-Soto LA, Marangoni S, et al. Revealing the functional structure of a new PLA2 K49 from *Bothriopsis taeniata* snake venom employing automatic “de novo” sequencing using CID/HCD/ETD MS/MS analyses. *J Proteomics*. 2016;131: 131–139. doi:10.1016/j.jprot.2015.10.020
97. Luna K, da Silva M, Pereira V. Clinical and immunological aspects of envenomations by *Bothrops* snakes. *Journal of venomous animals and toxins including tropical diseases*. 2011;17: 130–141. doi:10.1590/S1678-91992011000200003
98. Doley R, Kini RM. Protein complexes in snake venom. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2009;66: 2851–2871. doi:10.1007/s00018-009-0050-2
99. Theakston RDG, Laing GD, Fielding CM, Lascano AF, Touzet J-M, Vallejo F, et al. Treatment of snake bites by *Bothrops* species and *Lachesis muta* in Ecuador: laboratory screening of candidate antivenoms. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1995;89: 550–554. doi:10.1016/0035-9203(95)90105-1