



UNIVERSIDAD REGIONAL AMAZÓNICA IKIAM

FACULTAD DE CIENCIAS DE LA VIDA

CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

**PURIFICACIÓN, CARACTERIZACIÓN Y EVALUACIÓN DE LA
ACTIVIDAD ANTIVIBRIO DE UNA FOSFOLIPASA A₂ DE
*BOTHROPS ASPER***

Proyecto de investigación previo a la obtención del título de:

INGENIERA EN BIOTECNOLOGÍA

AUTOR: JOSSELYN ARACELY ORTEGA PILA

TUTOR: PhD. CAROLINA DEL CARMEN PROAÑO BOLAÑOS

Napo – Ecuador

2023

DECLARACIÓN DE DERECHO DE AUTOR, AUTENTICIDAD Y RESPONSABILIDAD

Yo, **JOSSELYN ARACELY ORTEGA PILA**, con documento de identidad N° **1726226655** declaró que los resultados obtenidos en la investigación que presento en este documento final, previo a la obtención del título de **Ingeniera 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, 15 de mayo del 2023



Josselyn Aracely Ortega Pila

C.I: 1726226655

AUTORIZACIÓN DE PUBLICACIÓN EN EL REPOSITORIO INSTITUCIONAL

Yo, Josselyn Aracely Ortega Pila, con documento de identidad N° 1726226655, en calidad de autor y titular de los derechos morales y patrimoniales del trabajo de titulación: **“Purificación, caracterización y evaluación de la actividad antivibrio de una fosfolipasa PLA₂ de *Bothrops asper*”**, de conformidad con el Art. 114 del CÓDIGO ORGÁNICO DE LA ECONOMÍA SOCIAL DE LOS CONOCIMIENTOS, CREATIVIDAD E INNOVACIÓN, reconozco a favor de la Universidad Regional Amazónica Ikiam una licencia gratuita, intransferible y no exclusiva para el uso no comercial de la obra, con fines estrictamente académicos.

Así mismo autorizo a la Universidad Regional Amazónica Ikiam para que realice la publicación de este trabajo de titulación en el Repositorio Institucional de conformidad a lo dispuesto en el Art. 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior. Tena, 17 de noviembre de 2022.

Tena, 15 de mayo del 2023



Josselyn Aracely Ortega Pila

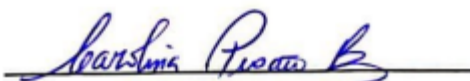
C.I: 1726226655

CERTIFICADO DE DIRECCIÓN DE TRABAJO DE INTEGRACIÓN CURRICULAR

Certifico que el trabajo de integración curricular titulado: **“Purificación, caracterización y evaluación de la actividad antivibrio de una fosfolipasa PLA₂ de *Bothrops asper*”**, en la modalidad de: proyecto de investigación en formato tesis, fue realizado por: **Josselyn Aracely Ortega Pila**, 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, 15 de mayo del 2023



Carolina del Carmen Proaño Bolaños

CI: 1714818760

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a mis padres y mis hermanas por ser un soporte para mí, quienes han sido un pilar fundamental para poder cumplir mis metas y anhelos.

A mis profesores, en especial al Dr. Rafael de Almeida, quien ha sido inspiración y me ha impartido su sabiduría y conocimiento durante este trayecto, sobre todo le agradezco por su paciencia y confianza para desarrollar este proyecto.

A mi tutora, la Dra. Carolina Proaño Bolaños, quien me ha brindado su paciencia, conocimiento y su tiempo para lograr culminar mi tesis de pregrado.

A los técnicos del Laboratorio de Biología Molecular y Bioquímica y Química de Productos Naturales, Nina Espinosa de los Monteros y Joel Medina quienes estuvieron apoyándome en mis ensayos y brindándome su acompañamiento.

A todos los docentes, mi familia y amigos quienes han velado por mí durante mi carrera de pregrado, gracias a todos ustedes por ser luz.

DEDICATORIA

A mis padres y mis hermanas por ser mi inspiración, a ustedes mis personas favoritas por amarme con todas sus células y brindarme su apoyo incondicional para cumplir esta meta.

A mi mejor amigo de toda mi vida, quien me ha apoyado y me ha dado palabras de aliento para no rendirme.

A ustedes mis rayitos de luz que me hacen sentir segura con su calidez y amor.

INDICE GENERAL

DECLARACIÓN DE DERECHO DE AUTOR, AUTENTICIDAD Y RESPONSABILIDAD.....	I
AUTORIZACIÓN DE PUBLICACIÓN EN EL REPOSITORIO INSTITUCIONAL.....	II
CERTIFICADO DE DIRECCIÓN DE TRABAJO DE INTEGRACIÓN CURRICULAR .	III
AGRADECIMIENTOS.....	IV
DEDICATORIA.....	V
INDICE TABLAS.....	VIII
INDICE FIGURAS.....	IX
INDICE ANEXOS.....	X
RESUMEN.....	XI
ABSTRACT.....	XII
1. CAPÍTULO I: PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN.....	1
1. Antecedentes.....	1
1.1.1 Veneno de serpientes.....	1
1.1.1.2 Actividad de antimicrobianad svPLA ₂	3
1.1.1 Producción de camarón blanco (<i>Litopenaeus vannamei</i>).....	5
1.1.2 Enfermedad bacteriana en la acuicultura.....	6
1.2 Planteamiento del problema.....	7
1.3 Justificación de la investigación.....	8
1.4 Objetivos de Investigación.....	9
1.4.1 Objetivo General.....	9
1.4.2 Objetivos Específicos.....	9
2. CAPÍTULO II: MARCO METODOLÓGICO.....	10
2.1 Obtención de Venenos.....	10
2.2 Aislamiento de fosfolipasa A ₂	11
2.3 Liofilización y almacenamiento	12
2.4 Análisis de pureza de la toxina homóloga PLA ₂ Lys-49	12
2.5 Electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE) con dodecilsulfat sódico (SDS)	12
2.6 Digestión de proteína	13
2.6.1 Digestión enzimática en solución.....	13

2.7	Identificación de PLA ₂ Lys 49 por cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas.....	14
2.7.1	<i>Determinación de masa molecular intacta de proteínas por “ESI-MS”..</i>	14
2.7.2	<i>Análisis de la estructura primaria por espectrometría de masas.....</i>	
	<i>.en tándem“LC-MS/MS”.....</i>	15
2.8	Predictor de actividad antimicrobiana de péptidos.....	16
2.9	Evaluación de la actividad antimicrobiana	16
2.9.1	<i>Cepas y condiciones de crecimiento bacteriano.....</i>	16
2.9.2	<i>Ensayo bactericida.....</i>	16
2.10	Análisis Estadístico	17
3.	CAPÍTULO III. PRESENTACIÓN DATOS Y RESULTADOS.....	18
3.1	Caracterización Bioquímica	18
3.2	Análisis de pureza de PLA ₂ Lys-49	20
3.3	Análisis de la estructural primaria de la PLA ₂ Lys-49.....	22
3.3.1	<i>Determinación de masa molecular intacta de PLA₂ Lys-49.....</i>	22
3.3.2	<i>Caracterización parcial de la estructural primaria.....</i>	23
3.4	Predicción de péptidos antimicrobianos	25
3.5	Actividad antimicrobiana en PLA ₂ Lys-49 y veneno puro de <i>B. asper</i>	26
4.	CAPÍTULO IV: INTERPRETACIÓN Y DISCUSIÓN.....	28
5.	CAPÍTULO V: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	33
6.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	39
7.	ANEXOS.....	48

INDICE TABLAS

Tabla 1.	Fragmentos pépticos de Lys C y tripsina de PLA ₂ Lys-49 de <i>B. asper</i> obtenidos por secuenciación LC-MS/MS	23
Tabla 2.	Predicción bioinformática mediante AMPfun del potencial antimicrobiano de los péptidos de PLA ₂ Lys-49	26

INDICE FIGURAS

Figura 1. Flujo de trabajo del enfoque proteómico	5
Figura 2. Sitios de colecta del veneno de <i>B. asper</i> de especímenes ubicados en tres reservas de conservación del Ecuador	11
Figura 3. Perfil cromatográfico mediante RP-HPLC del veneno de <i>B. asper</i>	18
Figura 4. Perfil electroforético en condiciones reductoras de las fracciones separadas por RP-HPLC.....	19
Figura 5. Perfil cromatográfico de la PLA ₂ Lys-49 liofilizada ubicada en la región central obtenida por RP-HPLC.	20
Figura 6. Gel de electroforesis en poliacrilamida (SDS-PAGE, condiciones reductoras) del veneno total desecado y PLA ₂ Lys-49 purificado de <i>B. asper</i>	21
Figura 7. Espectro de masas por ionización electrospray acoplada a espectrometría de masas (ESI-MS) de PLA ₂ básica (Lys-49) aislada de <i>B. asper</i>	22
Figura 8. Alineación de la secuencia de aminoácidos de la isoforma básica de PLA ₂ (Lys-49) de <i>B. asper</i> similares a los venenos de otras serpientes.....	27
Figura 9. Actividad anti Vibrio.....	27

INDICE ANEXOS

Anexo 1. Perfil cromatográfico de los venenos individuales de <i>B. asper</i>	48
Anexo 2. Información de especímenes de <i>B. asper</i>	48

RESUMEN

La resistencia bacteriana en enfermedades infecciosas como la vibriosis en el camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*), ha impulsado la búsqueda de estrategias más eficientes para combatir esta enfermedad en el sector acuícola. Una alternativa para solucionar esta problemática es la búsqueda de nuevos compuestos antimicrobianos, a partir de las toxinas derivadas del veneno de serpientes ecuatorianas. Por lo tanto, el objetivo de este estudio fue purificar y caracterizar un homólogo de la fosfolipasa A₂ (PLA₂ Lys-49), presente en el veneno de *Bothrops asper* y evaluar su efecto antimicrobiano en cepas de *Vibrio* spp. La toxina se purificó y caracterizó a través de cromatografía líquida de alta eficiencia en fase reversa (RP-HPLC) y SDS-PAGE en condiciones reductoras. Debido a su naturaleza monomérica, se observó una masa molecular cercana a los 14 kDa. Luego, se confirmó mediante cromatografía líquida de ultra eficiencia acoplada a espectrometría de masas, obteniéndose una masa molecular de 13.649,17 Da. Mediante la secuenciación parcial de los fragmentos peptídicos se identificaron 82 residuos de aminoácidos que mostraron tener alta similitud con otras fosfolipasas básicas A₂ (PLA₂ Lys-49) del género de *Bothrops*. También, mediante un predictor peptídico (AMPfun), se encontraron dos péptidos con un alcance mayor al 0,9 demostrando tener alto potencial antimicrobiano. En los ensayos preliminares *in vitro*, se evaluó la actividad antivibrio mostrando una inhibición del 85% contra cepas Gram negativas de *Vibrio harveyi*, *V. parahaemolyticus* y *V. vulnificus*; indicando una alta susceptibilidad al estar expuesta a una concentración de 250 µg/mL de PLA₂ Lys-49. Por ende, mediante esta investigación se podrían desarrollar nuevas alternativas terapéuticas en el sector acuícola.

Palabras claves: Veneno, serpiente, fosfolipasa A₂, antimicrobiano, vibriosis, camarón blanco

ABSTRACT

Bacterial resistance in infectious diseases such as vibriosis in white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) has prompted the search for more efficient strategies to combat this disease in the aquaculture sector. An alternative to solve this problem is the search for new antimicrobial compounds based on toxins derived from the venom of Ecuadorian snakes. Therefore, the objective of this study was to purify and characterize a homologue of phospholipase A₂ (PLA₂ Lys-49), present in the venom of *Bothrops asper* and evaluate its antimicrobial effect on strains of *Vibrio* spp. The toxin was purified and characterized by reverse-phase high-performance liquid chromatography (RP-HPLC) and SDS-PAGE under reducing conditions. Due to its monomeric nature, a molecular mass close to 14 kDa was observed. Then, it was confirmed by ultra-efficiency liquid chromatography coupled to mass spectrometry, obtaining a molecular mass of 13,649.17 Da. In addition, by partial sequencing of the peptide fragments, 82 amino acid residues were identified that showed high similarity to other basic phospholipases A₂ (PLA₂ Lys-49) of the *Bothrops* genus. Also, using a peptide predictor (AMPfun), two peptides with a range greater than 0.9 were found to have high antimicrobial potential. In preliminary in vitro assays, antivibrio activity was evaluated showing an 85% inhibition against Gram-negative strains of *Vibrio harveyi*, *V. parahaemolyticus* and *V. vulnificus*; indicating a high susceptibility when exposed to a concentration of 250 µg/mL of PLA₂ Lys-49. Therefore, this research could lead to the development of new therapeutic alternatives in the aquaculture sector.

Keywords: Venom, snake, phospholipase A₂, antimicrobial, vibriosis, white shrimp

1. CAPÍTULO I: PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

1. Antecedentes

1.1.1 Veneno de serpientes

El veneno de serpientes es producido por las glándulas salivales y está diseñado para someter, matar y/o digerir presas [1]. Esta solución acuosa es una secreción exocrina que contiene una amplia complejidad de agentes compuestos por péptidos y toxinas, también contiene aminoácidos, carbohidratos, azúcares fosforilados, lípidos, iones metálicos entre otros [2]. La fracción proteica del veneno representa aproximadamente el 90- 95% del peso seco, y varía según la especie, la edad, sexo y su variabilidad ontogénica [3].

En el veneno de *Bothrops asper* conocida comúnmente como “terciopelo o equis”, se han encontrado al menos ocho familias de proteínas incluyendo metaloproteinasas (SVMP) (41-44%), fosfolipasas A₂ (PLA₂) (29-45%), serina proteasas (SVSP) (4-18%), L-aminoácido oxidasa (LAAO) (5-59%), desintegrinas (1-2%), proteínas lectina tipo C (CTL) (0.5%) y las proteínas ricas en cisteína (CRISP) (0.1%). Además, se han aislado toxinas representativas de cada uno de estas familias [2, 4]. Cada una de estas proteínas tiene diferentes efectos biológicos y contribuyen a los efectos tóxicos y terapéuticos del veneno.

Las toxinas venenosas son cocteles proteicos que exhiben una amplia gama de actividades farmacológicas como neurotoxinas, miotoxinas, cardiotoxinas y hematotoxinas [1]. Esta sustancia tóxica actúa sobre blancos celulares específicos y cumplen funciones como la inmovilización y predigestión de distintas presas [1]. Sin embargo, su efecto toxico no se limita a esto, sino que también causa una variabilidad de alteraciones en un organismo, incluyendo desorganización de canales iónicos, receptores nicotínicos y enzimas, así como alteraciones en los tejidos neurales y cardiovasculares y en el sistema neuromuscular [5]. Debido a la especificidad de sus efectos biológicos, los componentes del veneno se han convertido en un recurso valioso para la investigación relacionado al ofidismo y al desarrollo de nuevos agentes terapéuticos [6].

Dentro del grupo de toxinas se destaca la fosfolipasa A_2 reconocida por ser un componente tóxico y abundante en el veneno de las serpientes. Además de su reconocimiento en sus distintas aplicaciones y propiedades farmacológicas [7].

1.1.1.1 Fosfolipasas A_2

Las fosfolipasas A_2 poseen una gran variedad de actividades biológicas y fisiopatológicas al actuar sobre las membranas celulares. Esta acción induce varios procesos fisiopatológicos como: neurotóxicos, miotóxicos, coagulopatías, cardiotóxicos, produce hipotensión, edema, agregación plaquetaria, anticoagulación, hipotensión y procesos inflamatorios [8]. Sin embargo, también han surgido como un modelo terapéutico, mostrando su actividad biológica como: antimicrobiana, antitumoral, anticancerígena, antiviral y antiparasitaria [2]. Las enzimas de tipo Lys-49 fosfolipasa A_2 (Lys-49 PLA₂) están involucradas en el metabolismo de los lípidos y la alteración de la estructura de las membranas celulares de los patógenos y células cancerosas, presentando un enfoque terapéutico de baja resistencia [7].

Las fosfolipasas A_2 secretadas del veneno de serpientes (svPLA₂), son proteínas que generalmente tienen una masa molecular entre 13-15 kDa con 115-122 residuos. Estas son estables, ubicuas y versátiles; contienen enzimas ricas en enlaces disulfuro, se hidrolizan en la posición de enlaces éster sn-2 de 1,2-diacil-3-fosfolípidos liberando lisofosfolípidos y ácidos grasos [9]. Existen dos grupos svPLA₂, en el grupo I se incluye la familia *Elapidae*, mientras que en el grupo II pertenece a la familia *Viperidae* [10]. De la familia *Viperidae* se han aislado dos subgrupos principales de isoformas svPLA₂ perteneciente al grupo IIA, comúnmente conocidas como homologas a PLA₂ Asp49 y PLA₂ Lys-49 [11].

El primero representa a la variante catalíticamente activa (PLA₂ Asp49), exhibe al residuo del ácido aspártico en la posición 49 (Asp49). Posee hidrofobicidad y unión al calcio (Ca^{2+}) lo que produce la actividad enzimática sobre los fosfolípidos de membrana [12]. Mientras que, el homólogo catalíticamente inactivo (PLA₂ Lys-49) se caracteriza por tener un residuo de lisina en la posición 49 (Lys-49), tiene una carga positiva, baja o nula hidrofobicidad y carece de actividad catalítica [13]. La inactivación catalítica de PLA₂ Lys-49 se basó en un proceso evolutivo, provocado por la sustitución de un residuo de aspartato (Asp/D) en la posición 49 por un residuo de lisina (Lys/K), impidiendo la unión del calcio (Ca^{2+}), el cual es un cofactor esencial en la actividad catalítica [14]. Los

homólogos de PLA₂ Lys-49 poseen una estructura cuaternaria y están constituidos por monómeros altamente tóxicos, que ejercen daño en la membrana plasmática [5]. A pesar de perder su actividad para hidrolizar los fosfolípidos de membrana, esta isoforma mantiene sus propiedades biológicas en especial su actividad antimicrobiana. Por lo anteriormente expuesto, esta toxina se ha convertido en modelos moleculares y estructurales para el diseño de moléculas bioactivas.

1.1.1.2 Actividad de antimicrobiana de svPLA₂

La actividad antimicrobiana de las svPLA₂ es una de las propiedades más prometedoras para mitigar patógenos, debido a la creciente resistencia antibiótica reportada en los últimos años [15]. Según datos del NCBI, aproximadamente 35 svPLA₂ han sido caracterizados y descritas en relación a sus propiedades antimicrobianas, esto representa el 7,8% de todas las svPLA₂ estudiadas. Cabe destacar que no todas las fosfolipasas A₂ han sido aplicadas contra bacterias [7]. Esta actividad implica el reconocimiento de dominios catiónicos que actúan directamente, provocando adelgazamiento y desestabilización de la membrana; en consecuencia, altera morfológicamente produciendo permeabilización y expulsión del contenido celular [16].

Se han realizado varios estudios *in vitro* de la actividad bactericida de las svPLA₂ frente a bacterias Gram negativas como: *Escherichia coli*, *Vibrio cholerae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella* spp. y bacterias Gram positivas como *Staphylococcus aureus* y *B. subtilis*. Por ejemplo, la actividad antibactericida de svPLA₂ del veneno de *Bothrops alternatus* tiene mayor eficacia en contra de *E. coli* y *S. aureus* [17]. En otro estudio, la víbora de Russell (*Daboia russelipulchella*) inhibió el crecimiento de seis cepas de bacterias [13]. Y otras especies como *Crotalus adamanteus* (Catx-II) inhibieron el crecimiento de *S.aureus*, *Burkholderia pseudomallei* y *Enterobacter aerogenes* [18, 19].

Ante este potencial farmacológico y su capacidad de interactuar con membranas celulares, la comunidad científica ha diseñado péptidos sintéticos inspirados en la región C-terminal de las svPLA₂ [20]. Esta región molecular está constituida por aminoácidos catiónicos e hidrofóbicos, con una longitud aproximadamente entre 12-16 aminoácidos y una alta afinidad con los fosfolípidos aniónicos [21]. Se identificó por primera vez el péptido sintético obtenido de PLA₂ del grupo II Lys-49 de la región 115-129 de *B. asper*, teniendo una carga positiva y una naturaleza hidrofóbica con los grupos aromáticos

básicos [21]. Los péptidos derivados de este segmento han demostrado tener actividades mionecróticas, citolíticas y efectos bactericidas como la proteína madre [29].

1.1.1.3 Enfoques proteómicos

En las últimas décadas, la espectrometría de masas ha surgido como una tecnología clave para el análisis proteómico. Existen dos enfoques principales en la espectrometría de masas: ascendente (*bottom up*) y descendente (*top down*). En los enfoques ascendentes (*bottom up*), las proteínas se someten a escisión proteolítica y los productos peptídicos se analizan en MS. Mientras que, en la proteómica de arriba hacia abajo (*top down*) los iones de las proteínas intactas o fragmentos de proteínas se someten a fragmentación en fase gaseosa para el análisis de MS (**Figura 1**).

El método ascendente, conocido como "*bottom up*", es la técnica más utilizada para identificar y cuantificar las proteínas. Este método se compone de varios pasos principales: en primer lugar, se aíslan las proteínas de la muestra; en segundo lugar, se fracciona las proteínas por medio de electroforesis en gel o métodos cromatográficos líquidos; en tercer lugar, se lleva a cabo una escisión proteolítica de las proteínas, generalmente con tripsina. A continuación, se realiza la medición de las masas espectrométricas de los péptidos resultantes y, por último, se realiza una búsqueda basada en la identificación de proteínas [22].

La espectrometría de masas es capaz de identificar los péptidos mediante su masa y carga, esta información se somete a un software que compara los datos con una base de secuencias de proteínas conocidas. La información obtenida a partir de los péptidos puede ser utilizada para identificar isoformas, modificaciones postraduccionales y modelar la estructura tridimensional de la proteína de interés [22, 23].

Los datos de fragmentación de péptidos o proteínas en espectrometría de masas, se adquiere mediante dos métodos: la adquisición dependiente de datos (DDA) y la adquisición independiente de datos (DIA). La técnica conocida como adquisición dependiente de datos (DDA) permite la transición del modo MS al modo MS/MS, se realiza mediante la selección de iones precursores de las moléculas más abundantes en un espectro de masa específico. Por otro lado, la adquisición independiente de datos (DIA) implica en la selección de todos los iones precursores en rango de masa

específico, se adquieren espectros de masa repetidos, lo que da como resultados grandes datos de espectros de fragmentos [24].

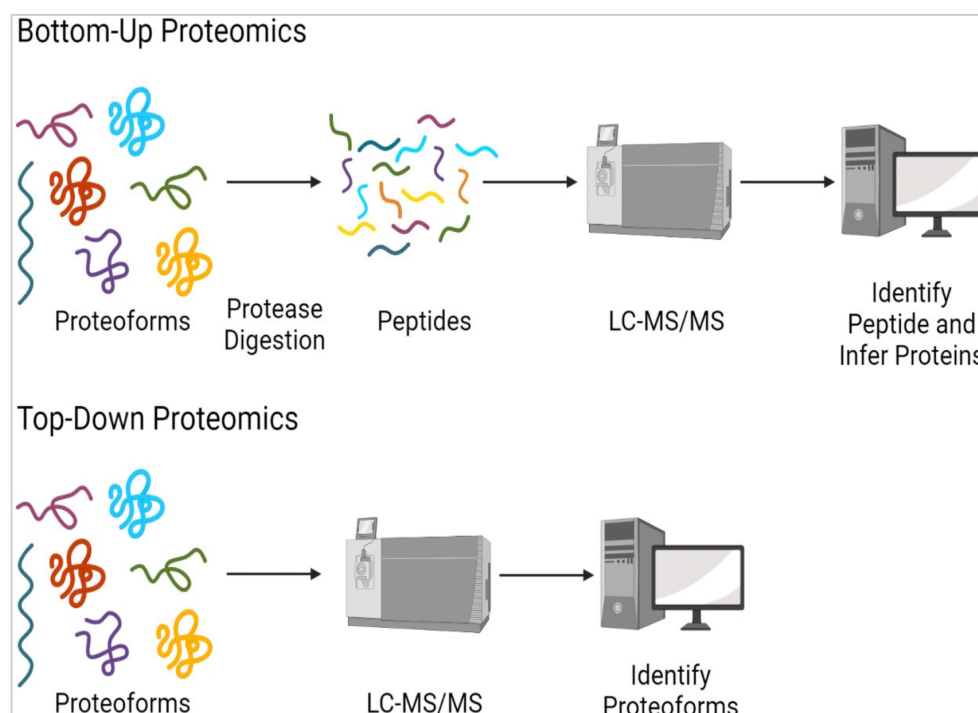


Figura 1. Flujo de trabajo del enfoque proteómico

Fuente: Miller, 2023

Por ello, mediante la purificación y caracterización estructural y funcional se ha obtenido una amplia variedad de svPLA₂ básicas a partir del veneno de múltiples serpientes. De acuerdo con los datos del *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) y Uniprot, se han analizado alrededor de 464 svPLA₂ de diferentes serpientes, como las del género *Bothrops* (*B. asper*, *B. jararacussu*, *B. pirajai* y *B. moojeni*), *Bungarus faciatus* y otras especies como *Crotalus durissus terrificus*, entre otras [25–28]. Estos estudios han permitido una comprensión más profunda de su estructura, función y propiedades bioquímicas, lo que es esencial para desarrollar aplicaciones terapéuticas y diagnósticas basadas en sus actividades biológicas.

1.1.1 Producción de camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*)

En Ecuador, la mayor parte de producción de crustáceos se centra principalmente en dos especies: el camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*) y el langostino tigre (*Penaeus monodon*). El camarón blanco es la especie más cultivada a nivel industrial, representando el 95% de la producción total del camarón en el país [29]. Esta especie se cultiva en granjas acuícolas ubicadas principalmente en las provincias costeras de

Guayas, El Oro y Manabí [30]. El éxito del cultivo de camarón se debe a su rápido crecimiento, alta tasa de conversión alimenticia y resistencia a enfermedades, lo que lo convierte en una especie rentable en la industria acuícola del país.

El camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*) es un crustáceo decápodo, perteneciente a la familia *Penaeidae*, que suele habitar en zonas tropicales y subtropicales y puede alcanzar un tamaño entre 9 y 23 cm [31]. Es la especie más popular en la acuicultura debido a su rápido crecimiento y excelente rendimiento en piscinas industriales. Además de su capacidad de osmorregulación, el camarón blanco tiene la ventaja de mayor tolerancia a condiciones ambientales adversas [32]. Lo que conlleva a que los acuicultores y la industria camaronera impulsen su producción a gran escala.

La industria acuícola se ha incrementado en varias regiones del mundo, con un 67% de la producción procedente del cultivo y el 33% de la captura natural. En el caso de Ecuador, la industria camaronera es una de las actividades no petroleras con mayor impacto en la economía [33]. Según cifras del Banco Central del Ecuador, en el año 2022 se exportaron 704 mil toneladas de camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*), generando ingresos de un total de USD 8.129,9 millones de dólares; lo que la convierte en uno de los ejes económicos más importantes del país. Esta cifra representa el 60,1% de la diversificación anual, siendo la segunda actividad en generar mayor ingreso de divisas, por debajo de la industria bananera [34]. Con los datos expuestos, el sector camaronero constituye un pilar fundamental en las exportaciones ecuatorianas.

1.1.2 Enfermedad bacteriana en la acuicultura

La vibriosis es una de las enfermedades bacterianas más comunes y causan enormes pérdidas en la industria acuícola. Esta enfermedad es causada por bacterias halófilas del género *Vibrio*, que pertenecen a la familia *Vibrionaceae* [32]. Los vibriones son patógenos oportunistas que infectan al huésped cuando los mecanismos de defensa están suprimidos o cuando se enfrentan a factores de estrés como la calidad del agua, el oxígeno disuelto, los niveles anormales de nitratos y nitritos, el pH y la temperatura [35]. Los vibriones usan como nicho la hemolinfa, la hepatopáncreas y el tubo digestivo de las especies acuáticas para proliferarse y mantenerse con vida [36]. La presencia de *Vibrio* spp. puede afectar la supervivencia y el crecimiento del camarón, siendo

responsable de enfermedades como la necrosis hepatopancreática aguda (AHPND) o el síndrome de mortalidad temprana (EMS) [37].

La necrosis hepatopancreática aguda (AHPND) es una enfermedad que ha tenido un impacto devastador en la acuicultura, especialmente en la etapa larvaria [38]. Los síntomas suelen aparecer alrededor de 8 días después de la siembra y pueden provocar una mortalidad cercana al 100% en un período de 20 a 30 días después de la infección [39, 40]. Los camarones infectados por *Vibrio* spp, presentan una serie de signos clínicos, que incluyen decoloración de la hepatopáncreas, hipoxia, enrojecimiento del cuerpo con branquias rojas o marrones, letargia, pérdida de miembros, reducción de alimentación, nado errático, textura blanda del exoesqueleto y muerte súbita [41]. La alta tasa de mortalidad se debe a la rápida proliferación bacteriana provocando una infección global en todo el cultivo.

1.2 Planteamiento del problema

La sobreproducción de camarón blanco ha sido una de las principales causas de pérdidas relacionadas con bacterias y virus, representando un 60%, mientras que el 20% es atribuible a parásitos y hongos [42]. Las afecciones producidas por virus y bacterias pueden ocasionar el fracaso de las cosechas por la alta densidad o biomasa en las piscinas o estanques [43]. Los cultivos enfrentan desafíos en cuanto a infecciones bacterianas, como *Vibrio* spp. el cual presenta una patología crítica con una alta tasa de morbilidad y mortalidad en las granjas camaroneras [44].

La infección por *Vibrio* spp. es altamente mortífera y los primeros casos de AHPND se reportaron en China en el año 2009, propagándose posteriormente a acuicultivos en Malasia, Tailandia y Vietnam [42]. Desde entonces, la enfermedad se ha ido expandiendo rápidamente a otras regiones del mundo, incluyendo América Latina donde los primeros casos se detectaron en 2013 en países como EEUU, México, Perú y Ecuador [42]. La vibriosis ha provocado pérdidas considerables hasta el 60% en la producción de camarón [45, 46]. En Tailandia, por ejemplo, las pérdidas se estiman en más de 11 mil millones de dólares y en toda Asia con más 45 mil millones dólares entre 2009 y 2016 [47]. México y Estados Unidos también han sufrido pérdidas significativas, con algunas regiones importantes de la acuicultura como Sinaloa y Texas reportando hasta un 75% de disminución de producción [48]. En Ecuador, el impacto de la AHPND fue especialmente grave en 2013, se estima que perdieron 70,000 toneladas de

camarones, lo que representó un costo alrededor de \$1.2 mil millones de dólares para la industria camaronera del país [49]. Estas cifras ilustran la gravedad del impacto económico dada por enfermedades infecciosas como la vibriosis en la industria acuícola.

La falta de control sobre factores de riesgo como la carga de nutrientes, mal manejo del agua y el uso excesivo de antibióticos ha contribuido a la resistencia bacteriana, limitando las opciones terapéuticas [48]. La resistencia bacteriana es un asunto preocupante, ya que se han reportado varios casos en países como India, Brasil, Malasia, Perú y Ecuador. En Ecuador, un estudio reciente ha demostrado que ciertos antibióticos, como la oxitetraciclina, enrofloxacin, fosfomicina, tetraciclina, norfloxacin, ampicilina, florfenicol, gentamicina e incluso las cefalosporinas de tercera generación, tienen una eficacia reducida para el tratamiento de vibriosis. Además, se ha encontrado una resistencia del 50-85% a la ampicilina y el 71,4% de oxitetraciclina, siendo el antibiótico con mayor incidencia en Ecuador [50].

El uso inadecuado de antibióticos ha generado graves problemas como resistencia bacteriana, problemas ecológicos y restricciones en las exportaciones debido a la presencia de residuos de antibióticos en los tejidos de camarón [33]. Como resultado, se ha visto una reducción en la producción de camarón y en algunos casos, el cierre de industrias, lo que ha llevado al desempleo y al quebranto de recursos [51]. Es importante destacar que las infecciones en los cultivos ocasionadas por *Vibrio* spp. desencadenan insostenibilidad socioeconómica, problemas ambientales y de salud pública, por lo que se exige soluciones para controlar y combatir esta enfermedad.

1.3 Justificación de la investigación

La bioprospección de compuestos naturales presentes en la biodiversidad ecuatoriana se ha consolidado como una alternativa prometedora para enfrentar patógenos bacterianos en animales acuáticos como el camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*). Por lo que la búsqueda de componentes en el veneno de las serpientes se ha convertido en un recurso valioso para el descubrimiento y desarrollo de estrategias eficaces basada en moléculas bioactivas [25]. En particular, la fosfolipasa (svPLA₂) ha demostrado tener propiedades antimicrobianas, lo que la convierte en una herramienta potencialmente útil para combatir la vibriosis.

La toxina svPLA₂, presente en los venenos bothrópicos es ampliamente conocida y ha sido objeto de números estudios. Los homólogos de la proteína PLA₂ Lys-49 son especialmente interesantes, en base a su estructura primaria se han diseñado, sintetizado y probado péptidos catiónicos enfocadas en la mitigación de bacterias [52]. Esta proteína tiene la capacidad de interactuar sobre la membrana de las bacterias, alterando su estructura y provocando su muerte mediante sus efectos tóxicos. Esto la convierte en una alternativa eficaz para erradicar bacterias Gram positivas y negativas, lo que abre la posibilidad de luchar contra la resistencia antibiótica [53,54]. En este estudio, se evaluó la actividad antimicrobiana de una toxina derivada del veneno de la serpiente *B. asper* del Ecuador con el objeto de purificar y caracterizar una isoforma básica de PLA₂ Lys-49. Se destacará los aspectos bioquímicos y funcionales de la PLA₂ Lys-49 contra de bacterias Gram negativas como el *Vibrio spp*, siendo esta investigación pionera en el sector acuícola.

1.4 Objetivos de Investigación

1.4.1 Objetivo General

Purificar y caracterizar una fosfolipasa A₂ del veneno de *Bothrops asper* y evaluar su efecto contra cepas de *Vibrio spp*. que afectan al camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*).

1.4.2 Objetivos Específicos

- Aislar una fosfolipasa A₂ (PLA₂) a partir del veneno de *B. asper*.
- Caracterizar la estructura primaria parcial de una fosfolipasa A₂ del veneno de *B. asper*
- Determinar la actividad antimicrobiana del veneno desecado y la PLA₂ purificada *in vitro* contra cepas de *Vibrio spp*. que afectan al camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*).

2. CAPÍTULO II: MARCO METODOLÓGICO

2.1 Obtención de Venenos

Los especímenes fueron colectados bajo los permisos de investigación MAE-DNB-CM-2019-0115 y MAE-DNB-CM-2015-001 emitidos por el Ministerio del Ambiente del Ecuador.

Se colectaron dos especímenes del Área Protegida del Bosque y Vegetación Oña-León ubicado en la provincia del Azuay, y otros dos especímenes de la Reserva Ecológica Jama Coaque en la provincia de Manabí y la Reserva Buenaventura Jocotoco, en la provincia del Oro (**Figura 2**). El manejo de las serpientes se realizó con un gancho herpetológico y contenedores para manipularla y extraer su veneno.

La extracción fue llevada a cabo por el Dr. David Salazar, para un manejo seguro de los ejemplares se utilizaron tubos de sujeción, después se tomó la cabeza de las serpientes con un agarre seguro, se les permitió morder un vaso de precipitación cubierto con Parafilm® y se transfirió el veneno a un microtubo.

En la Universidad Tecnológica Indoamérica (UTI), los tubos con el veneno se colocaron abiertos en una cámara sellada al vacío con carbonato de calcio, teniendo como resultado veneno desecado cristalizado.

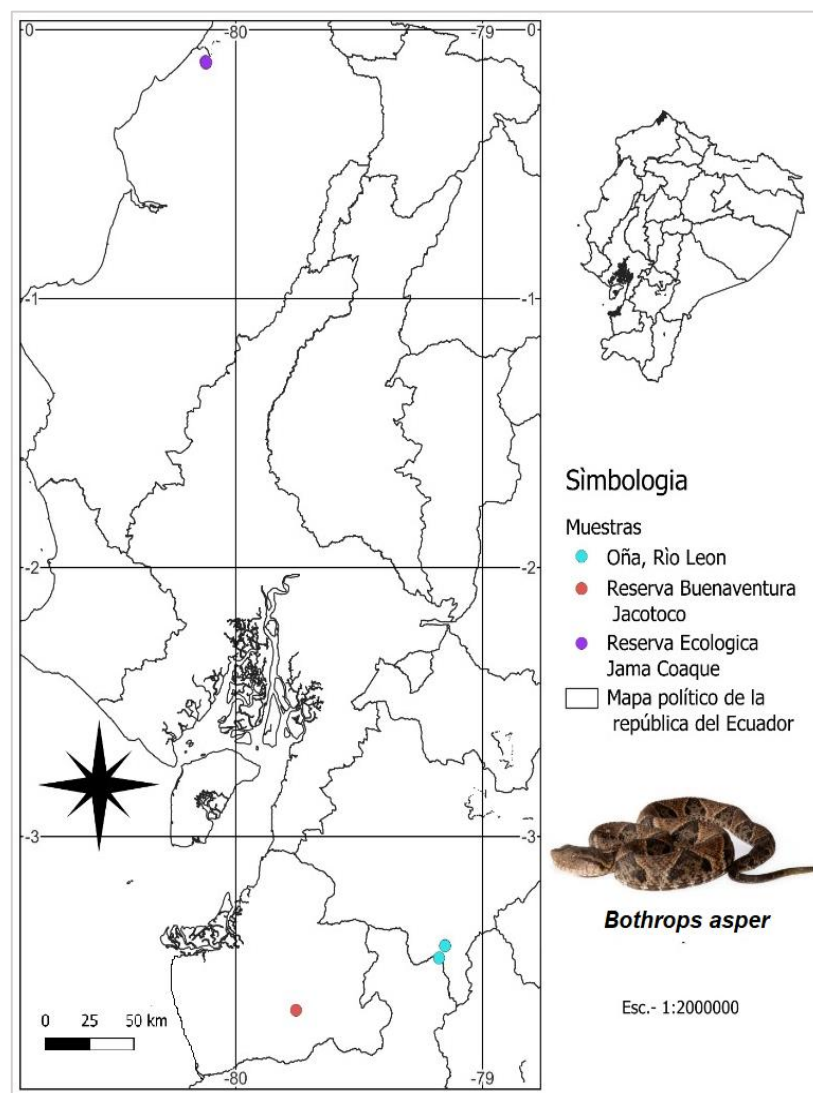


Figura 2. Sitios de colecta del veneno de *B. asper* de especímenes ecuatorianos ubicados en tres reservas de conservación
Realizado por: Ortega, Josselyn, 2023.

2.2 Aislamiento de fosfolipasa A₂

La separación bioquímica de los venenos se realizó mediante cromatografía líquida de alta eficiencia en fase reversa (RP- HPLC), empleando el protocolo descrito por Mora et al. (2020) [55]. Se disolvieron 3 mg del veneno de *B. asper* en 200 µL de solución de ácido trifluoroacético (TFA) al 0.1%, con acetonitrilo (ACN) al 5%. Se homogeneizó y centrifugó (DLab) a 13.000 x g durante 10 minutos a temperatura ambiente. Para la separación de proteínas se empleó una columna C18 Discovery Bio Wide Pore (250 x 4.56 mm, tamaño de la partícula de 5 µm) de fase reversa y el cromatógrafo líquido (HPLC) equipado con un sistema de bombas (Waters 1525), detector HPLC-PDA 991 (Waters) y un automuestreador (Waters 2707). Se emplearon dos solventes, el solvente

A, compuesto por TFA al 0.1% en agua y el solvente B por TFA al 0.1% en 99.9% de ACN. El fraccionamiento se monitoreó en una longitud de onda de 215 nm y la elución se realizó con un gradiente desde 5% a 70% del solvente B, en las siguientes condiciones: 5% de B durante 5 min, 5-25% de B durante 10 min, 25-45% B de durante 60 min, 45-70% de B durante 10 min, 70% durante 5min y 45-5% de 5 min respectivamente. La velocidad de flujo se fijó a 1 mL/min durante 100 min [56]. Finalmente, se colectaron manualmente las fracciones del veneno de las serpientes.

2.3 Liofilización y almacenamiento

La liofilización de las fracciones del veneno fue realizada en tubos cónicos de 15 mL. Previamente las fracciones de fosfolipasa A2 se congelaron por 24 horas a -80°C. Los tubos se cubrieron con Parafilm y se realizaron pequeños agujeros en la parte superior, sin colocar la tapa. Finalmente, se ingresaron al liofilizador (Benchtop Pro, Omnitronics de 9 litros), con las siguientes condiciones a -80°C, presión al vacío de 200 mTorr, durante 4 a 5 días y se almacenaron a -20°C [57].

2.4 Análisis de pureza de la toxina homóloga PLA₂ Lys-49

La pureza de la fracción PLA₂ liofilizada se analizó mediante RP-HPLC, según lo descrito por Almeida et al. (2016) [19]. Se aplicaron los mismos solventes anteriormente descrito en la **sección 2.2**. La velocidad de flujo fue de 1 mL/min durante 60 min. Se empleo el siguiente gradiente: 5% de B durante 5 min, 5-25% de B durante 10 min, 25-45% de B durante 25 min, 45-70% de B durante 5 min, 70% de B durante 5 min y 70-5% de B durante 5 min. El fraccionamiento se monitoreó en una longitud de onda de 215 nm. La abundancia relativa de las moléculas se cuantificó con la ayuda del software “Empower” a través de la integración del área del pico cromatográfico. Se consideró un nivel de pureza mínimo del 95% para los posteriores ensayos de evaluación biológica. Las fracciones fueron almacenadas a -20°C para tener una mayor estabilidad a largo plazo.

2.5 Electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE) con dodecilsulfato sódico (SDS)

La separación de proteínas se realizó según la metodología de Laemmli (1970), con algunas modificaciones [58]. Las fracciones del RP-HPLC se concentraron hasta eliminar el exceso del solvente mediante el concentrador al vacío (Genevac, miVac Duo)

a 30°C durante 24 horas. En las fracciones concentradas se añadieron 45 µl de buffer de carga (0,075 M Tris-HCl; pH 6,8; 10% (v:v) glicerol, 4% (m:v) SDS, 0,001% (m/v) azul de bromofenol). Se separaron las muestras en condiciones reductoras, se añadieron 5 µL de ditriotreitol (DTT) 1M. Luego, se homogeneizó y se llevó a 95°C al termobloque (Thermo Scientific™) durante 5 minutos. La separación por electroforesis se realizó en una cámara vertical BIO RAD Mini-PROTEAN Tetra con Buffer de corrida 1X (0,075M Tris-HCL (pH 8,3); 0,192 M glicerol; 0,1% (m/v) SDS. En primer lugar, se construyó un gel de apilamiento compuesto de bis-acrilamida 5% (30:0,8), Tris-HCl 0,067M, SDS 0,1% (m/v), persulfato de amonio 0,15% (m:v), TEMED 0,02%(v:v), 6,8 de pH y otro gel de corrida compuesto de bis-acrilamida 12% (30:0,8), Tris-HCl 0,55M, SDS 4% (m:v), persulfato de amonio 0,05% (m/v), TEMED 0,35% (v:v) a pH 8,8 de acuerdo a la metodología de Almeida et al. (2016) [19]. Se colocaron 20 µl de cada muestra en los pocillos del gel de corrida. La separación inició con una intensidad inicial de 35 mA y luego se aumentó cada hora a 70, 110 y 120 mA. Para visualizar las bandas los geles fueron teñidos con azul de Coomassie (Blue brilliant R-250) y se destiñó con una solución decolorante con 40% (v:v) de metanol y 10% (v:v) de ácido acético [59]. Se repitió el mismo procedimiento para elaborar otro gel con el veneno total desecado y la fracción de interés purificada y liofilizada de PLA₂.

2.6 Digestión de proteína

2.6.1 Digestión enzimática en solución

Las fracciones colectadas directamente del RP-HPLC correspondiente a PLA₂ Lys-49 se sometieron a digestión enzimática proteolítica. Para lo cual, se añadieron 5 µl de bicarbonato de amonio (AMBIC 10X) a la muestra correspondiente a PLA₂ Lys-49 hasta completar 20 µl. Se agregaron 6 µl ditriotreitol (DTT 100mM), se incubó a 56°C durante 30 min. Luego se alquiló el producto en una solución de 3 µl de yodoacetamida (IAA) en la oscuridad por 20 min y se colocó nuevamente 3 µL de ditriotreitol (DTT 100mM) por 20 minutos a temperatura ambiente [60].

Posteriormente, se realizaron dos digestiones proteolíticas con tripsina y endoproteinasa LysC (Promega). Para ello se digirió durante toda la noche a 37°C con 3 µl de una solución de 20 µg de cada enzima (tripsina y endoproteinasa Lys C) en 200 µl de bicarbonato de amonio (AMBIC 0,1M) respectivamente. A continuación, se agregaron 0,2 µl de ácido fórmico 0,4% concentrado para detener la reacción enzimática.

Posteriormente, se evaporaron los solventes en el centrifuga al vacío casi a sequedad. Finalmente, se transfirieron 25 µl al vial de cromatografía y se añadieron 100 µl de ácido fórmico al 0.1% y se almacenó de 4-8°C hasta inyectar en el sistema LC-ESI-QTOFMS.

2.7 Identificación de PLA₂ Lys 49 por cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas

2.7.1 Determinación de masa molecular intacta de proteínas por “ESI-MS”

La determinación de la masa molecular intacta de la fosfolipasa A₂ Lys-49 se determinó por cromatografía de ultra eficiencia acoplado a un espectrómetro de masas, como interfaz un sistema de ionización por electrospray (ESI). A partir de una columna BEH C18 (2.1 Mm × 50 mm, tamaño de partícula de 1,7µm) con un sistema de espectrometría de masas Waters Xevo G2-XS QTOF. Inicialmente, se tomaron las fracciones libres de solventes y se disolvieron en 150 µL de AF al 0.1% [61]. Posteriormente se inyectaron 10 µL de las fracciones disueltas en el equipo. Se emplearon dos solventes, el solvente A consiste de ácido fórmico al 0,1% en agua y el solvente B de ácido fórmico al 0,1% con acetonitrilo (ACN). El perfil del gradiente fue de 1% de B durante 1 min, 1-12% de B durante 1 min, 12- 40% de B durante 15 min, 40-85% de B durante 2 min. Se estableció los parámetros como el caudal se fijó de 300 µL/min con una presión de 15000 psi, durante 24 minutos. La elución del cromatograma se monitoreó en rangos espectrales (MS1) de 600 a 1700 m/z, obtenidos en modo de ion positivo. Los cálculos de masa intacta se realizaron mediante la metodología de Munuera (2016) [62], se utilizó la siguiente fórmula para calcular las masas:

$$M_1 = M_2$$

Donde M es igual a:

$$M = \left(\frac{m}{z}\right) * z - z$$

Siendo (m/z) la relación masa-carga de la proteína y z es la carga.

2.7.2 Análisis de la estructura primaria por espectrometría de masas en tándem “LC-MS/MS”

La determinación de la estructura primaria de PLA₂ Lys-49 se llevó a cabo mediante cromatografía líquida de ultra eficiencia UPLC ACQUITY I-Class en fase reversa con una columna CSH C18 (100 mm x 100 mm, tamaño de la partícula 1,7 µm), acoplado a espectrometría de masas Waters Xevo G2-XS QToF con fuente Lockspray (LC-ESI-QTOF). Se inyectaron 10 µL de la muestra de los péptidos digeridos con las enzimas proteolíticas realizado en la **sección 2.6.1**, y en la separación se emplearon dos solventes, el solvente A consiste de ácido fórmico al 0,1% en agua y el solvente B de ácido fórmico al 0,1% con acetonitrilo (ACN). Los péptidos eluyeron en un gradiente lineal, el cual fue establecido al 1% B durante 1 min, 1-70% de B durante 29 min y finalmente se mantuvo al 70% de B por 2 min. La velocidad de flujo fue de 300 µL/min con un tiempo de corrida de 40 min [60]. El espectrómetro de masas operó con un voltaje capilar de 0.5 KV, 450 °C de temperatura desolvatación, 900 L/h de flujo de gas de solvatación, 40 V de tensión de cono, 30 L/h de flujo de gas del cono, 120°C de la temperatura de la fuente.

Los datos de espectrometría de masas (MS) fueron obtenidos a través del método de adquisición dependiente de datos (DDA) en modo positivo con una resolución que utiliza un barrido de masa de 400 a 1900 de la región m/z. Los iones precursor más abundantes en los espectros MS1 con cargas +2 y +3 fueron seleccionados automáticamente para la fragmentación MS2 mediante disociación por colisión inducida de los iones más intensos.

Los espectros de masa de los péptidos se analizaron a través del software Mascot Distiller (Versión 2.7), con parámetros como carbamidometilación de la cisteína y oxidación de la metionina, en las bases de datos SwissProt. Posteriormente, se buscó similitud con un porcentaje del 90 al 100% mediante BLAST del NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) y las secuencias de PLA₂ aislada de *B. asper* se obtuvieron por Uni-Prot. Se realizó la alineación con Clustal Omega (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>) [63] y mediante el software T-coffee se corroboró la alineación de secuencias y el porcentaje de similitud en otras especies (<https://tcoffee.crg.eu/apps/tcoffee/do:expresso>) [64].

2.8 Predictor de actividad antimicrobiana de péptidos

El análisis bioinformático para la predicción de actividad antimicrobiana de los péptidos se realizó mediante la herramienta AMPfun (<http://fdblab.csie.ncu.edu.tw/AMPfun/index.html>) [65].

2.9 Evaluación de la actividad antimicrobiana

2.9.1 Cepas y condiciones de crecimiento bacteriano

Para determinar la actividad antimicrobiana se utilizó el método descrito por Páramo et al (1998) en cepas de *Vibrio spp* [16]. Se utilizaron tres especies: *V. harveyi*, *V. parahaemolyticus* y *V. vulnificus*, obtenidas del cepario del Centro Nacional de Acuicultura e Investigaciones Marinas (CENAIM). Las bacterias se cultivaron en caldo de agar tripticasa de soja (TSA) durante 8 horas a 30°C. Posteriormente, se realizó un pase de bacterias para inocularlas en caldo de soja tripticaseína (TSB), el cual estuvo en agitación durante 2 h. A continuación, se ajustó la concentración hasta 1×10^5 unidades formadoras de colonias/mL (UFC/mL) a partir de la medición de densidad (OD) mediante un espectrofotómetro GloMax (Promega, Madison, WI, USA) a 620 nm.

2.9.2 Ensayo bactericida

Se tomaron 180 μ L de las suspensiones bacterianas (1×10^5 UFC/mL) y fueron incubadas en una microplaca con 20 μ L a cuatro concentraciones diferentes (250, 125, 62.5 y 31.25 μ g/mL) para el veneno desecado y de PLA₂ Lys-49 durante 12 h a 30°C. Para cuantificar se realizaron diluciones seriadas con un factor de dilución de 10^{-5} - 10^{-7} , se sembraron 100 μ L de cada dilución en agar tripticasa (TSA). Por último, se contaron las colonias luego de 24 h a 30°C y se aplicó la siguiente formula:

$$\frac{UFC}{mL} = \frac{(n^{\circ} \text{ de colonias} \times \text{factor de dilución})}{\text{volumen inoculado (mL)}}$$

Además, se incluyó un control negativo de 200 μ L de suspensión bacteriana sin ningún tratamiento y un control positivo con 20 μ L de antibiótico de ácido clavulánico y amoxicilina a 300 μ g/mL. Este ensayo se realizó por triplicado y los resultados se

expresaron en porcentaje, considerando el 100% de lo observado en el control negativo [66].

2.10 Análisis Estadístico

Los datos analizados entre las cepas de *Vibrio* spp. tuvieron un análisis estadístico de ANOVA y prueba de Tukey con un nivel de significancia de $p \leq 0.05$ se utilizó el programa GraphPad-Prism 9.

3. CAPÍTULO III. PRESENTACIÓN DATOS Y RESULTADOS

3.1 Caracterización Bioquímica

Las fracciones obtenidas por cromatografía en fase reversa (RP-HPLC) se usaron para identificar y aislar las familias proteicas del veneno, y particularmente para caracterizar la toxina de interés (PLA₂ Lys-49) aplicando tres criterios: i) el tiempo de retención de cada familia; ii) la masa a partir de las bandas presentes en los geles electroforéticos, y iii) estudios previos proteómicos de venenos bothrópicos. A partir de la información del perfil cromatográfico y electroforético se identificó la presencia de las fosfolipasas (svPLA₂). En el perfil cromatográfico se presentó un pico relevante que eluyó en el minuto ≈40 (**Figura 3**). En la región central del cromatograma se encontró la isoforma catalíticamente inactiva PLA₂ Lys-49, mientras que la isoforma ácida PLA₂ Asp49 eluyó en el minuto 55 aproximadamente.

Se aisló la PLA₂ Lys-49 de los especímenes anteriormente descritos en la **sección 2.1**, se procedió a liofilizar el pool de fracciones de cada espécimen. Sin embargo, no todos los especímenes proporcionaron suficiente cantidad de PLA₂ Lys-49 liofilizado, por lo que solo se consideró el espécimen ubicado en la Reserva Oña-León de la provincia del Azuay con el código (0736) (Anexo 1). En el cromatograma de la **Figura 3**, se visualiza un pico con mayor incidencia denominado PLA₂, el cual fue aislado realizando 11 corridas cromatográficas obteniendo así, la fosfolipasa A₂ Lys-49 de *B. asper*, para su caracterización estructural y funcional. Cabe destacar para evitar contaminaciones se procedió a coleccionar solo la parte central del pico. Se obtuvieron 1.5 mg PLA₂ Lys-49 liofilizado, siendo la única muestra considerada para este estudio (Anexo 2).

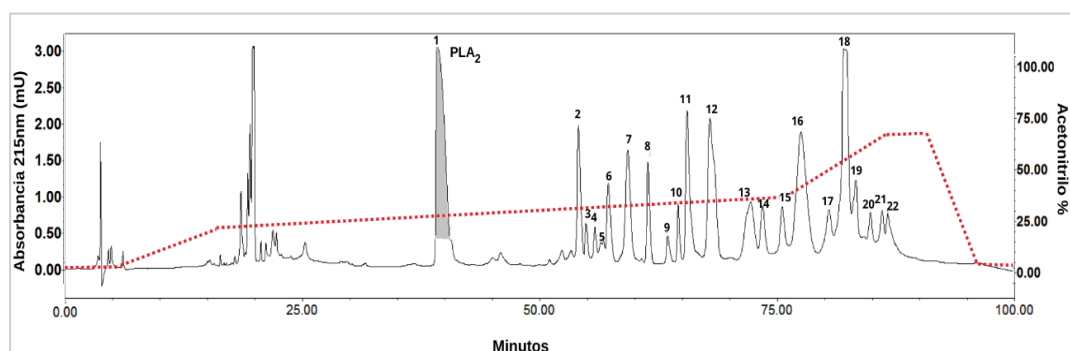


Figura 3. Perfil cromatográfico mediante RP-HPLC del veneno de *B. asper*.
Realizado por: Ortega, Josselyn, 2023.

El pico prominente etiquetado como 1, se recolectó y posteriormente se identificó como PLA₂ perteneciente a la isoforma catalíticamente inactiva Lys-49 tinturada de color gris, mientras que el pico 2 pertenece a PLA₂ Asp49 catalíticamente activo. El gradiente de acetonitrilo (ACN) aplicado para la elución se mostró como una línea discontinua roja.

Las fracciones obtenidas por RP-HPLC se analizaron por SDS-PAGE en condiciones reductoras y se evidenció la presencia de varias familias de proteínas del veneno de *B. asper*. En el gel electroforético se observaron al menos ocho familias. Entre ellas, se observaron las desintegrinas (3-5 kDa), las fosfolipasas (PLA₂) que poseen una masa de (13-15 kDa), las metaloproteinasas tipo I (PI-SVMP's) (20-30 kDa), serinproteasa (SVSP's) (35-40 kDa), metaloproteinasas II (PII-SVMP's) (45 kDa), las L-Amino oxidasa (LAAO's) y las metaloproteinasas tipo III (PIII-SVMP's) (70-90 kDa) (**Figura 4 y 6**). La fracción 1 correspondiente a PLA₂ Lys-49, en condiciones desnaturalizantes, mostró ser un monómero con una masa molecular de alrededor de 13 a 15 kDa (**Figura 3 y 4**).

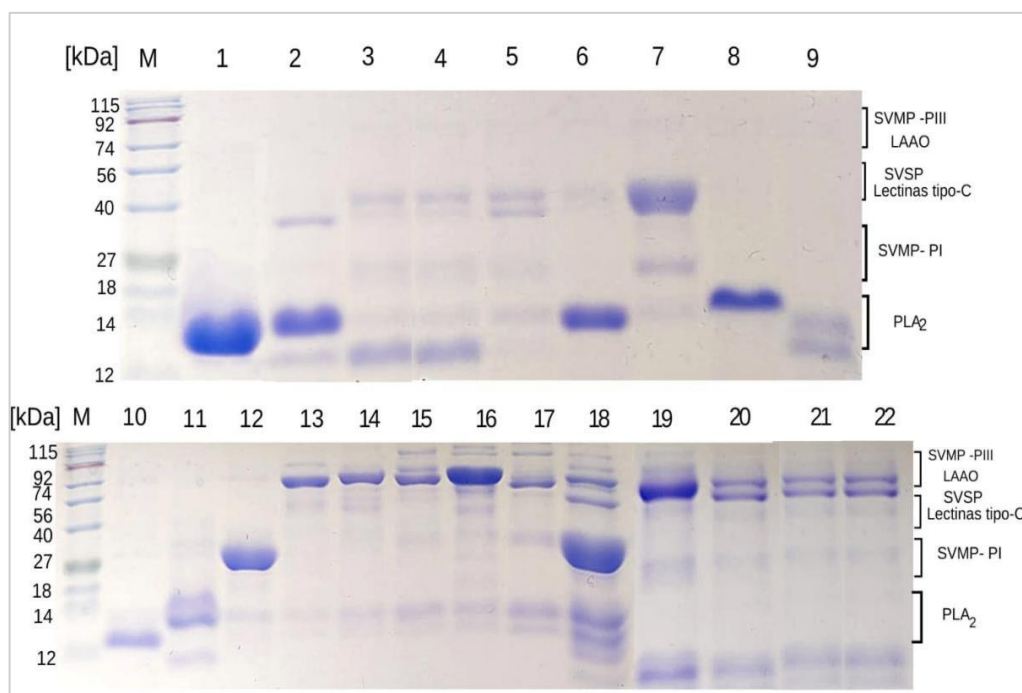


Figura 4. Perfil electroforético en condiciones reductoras de las fracciones separadas por RP-HPLC.

Realizado por: Ortega, Josselyn, 2023

En los geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) de las fracciones obtenidas por RP-HPLC del veneno de *B. asper*, se evidenciaron las masas moleculares de las familias proteicas del veneno. M: marcador de masa molecular y al borde derecho del gel la identificación de familias.

3.2 Análisis de pureza de PLA₂ Lys-49

La homogeneidad y la pureza de la fracción fueron confirmadas nuevamente por RP-HPLC, mostrando un único pico bien resuelto en la región central con un tiempo de elución de 33 minutos, correspondiente a la proteína PLA₂ Lys-49 (**Figura 5**). La cuantificación de la abundancia relativa de la proteína se midió a partir de la integración del área bajo la curva, mostrando una pureza del 99.06%, siendo idóneo para los posteriores ensayos.

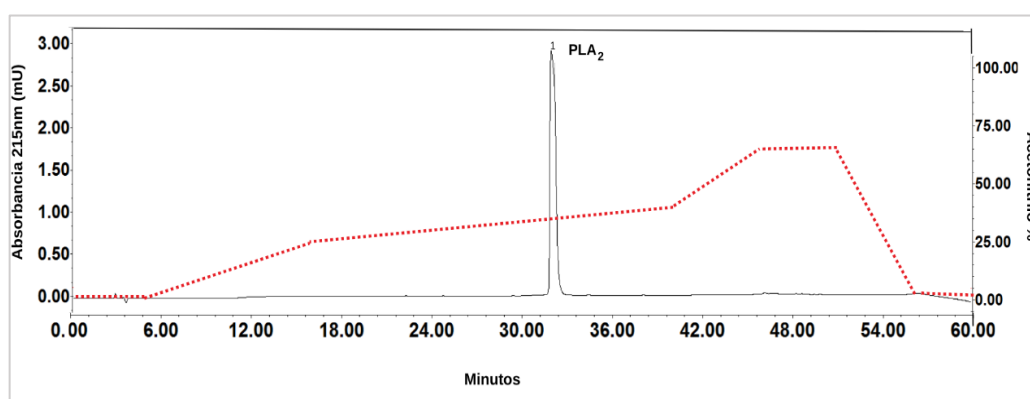


Figura 5. Perfil cromatográfico de la PLA₂ Lys-49 liofilizada ubicada en la región central obtenida por RP-HPLC.

Realizado por: Ortega, Josselyn, 2023.

La corrida fue monitoreada a 215 nm y el gradiente del solvente empleado se muestra con la línea discontinua roja durante 60min.

Por otro lado, se analizó el veneno total desecado proporcionando información acerca de todo el contenido proteico del veneno de *B. asper* y la fracción de interés aislada y liofilizada correspondiente PLA₂ Lys-49 revelando una banda electroforética bajo condiciones reductoras con masa molecular aproximadamente de ~14 kDa, lo que confirma el nivel de pureza y su naturaleza monomérica (**Figura 6**).

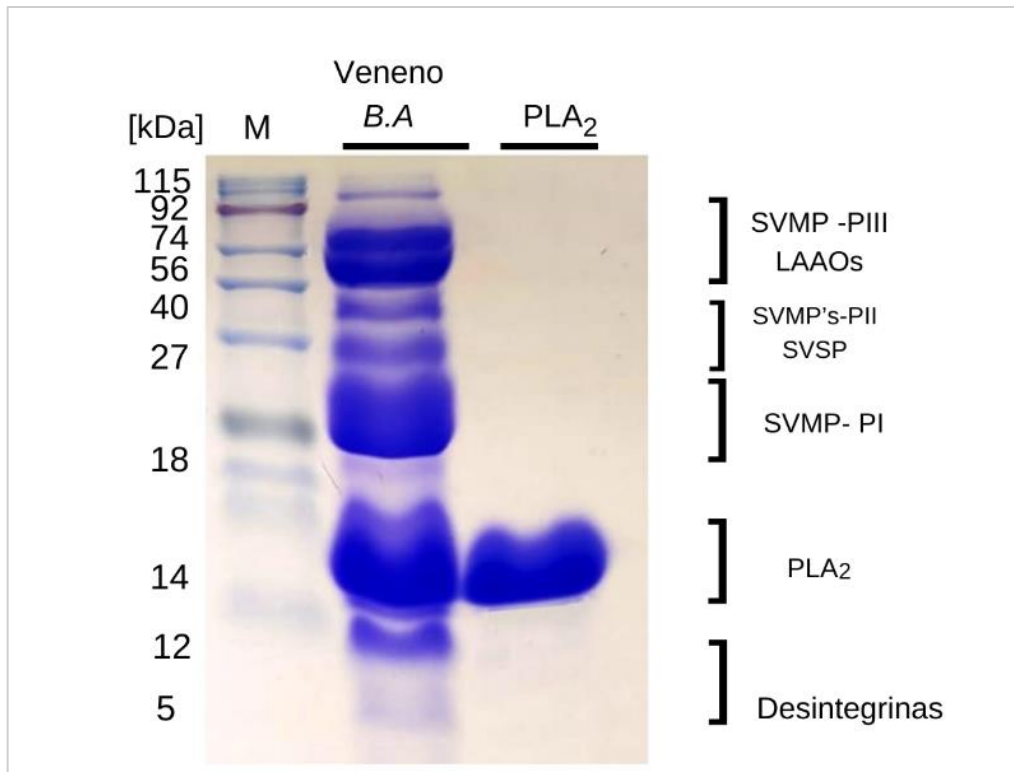


Figura 6. Gel de electroforesis en poliacrilamida (SDS-PAGE, condiciones reductoras) del veneno total desecado y PLA₂ Lys-49 purificado de *B. asper*.

Realizado por: Ortega, Josselyn, 2023.

Se etiquetó el veneno total desecado y la toxina purificada en la parte superior. En el lado izquierdo se describen como M: marcadores de masa molecular (kDa), mientras que en la parte derecha se encuentra las familias de proteínas más abundantes.

3.3 Análisis de la estructural primaria de la PLA₂ Lys-49

3.3.1 Determinación de masa molecular intacta de PLA₂ Lys-49

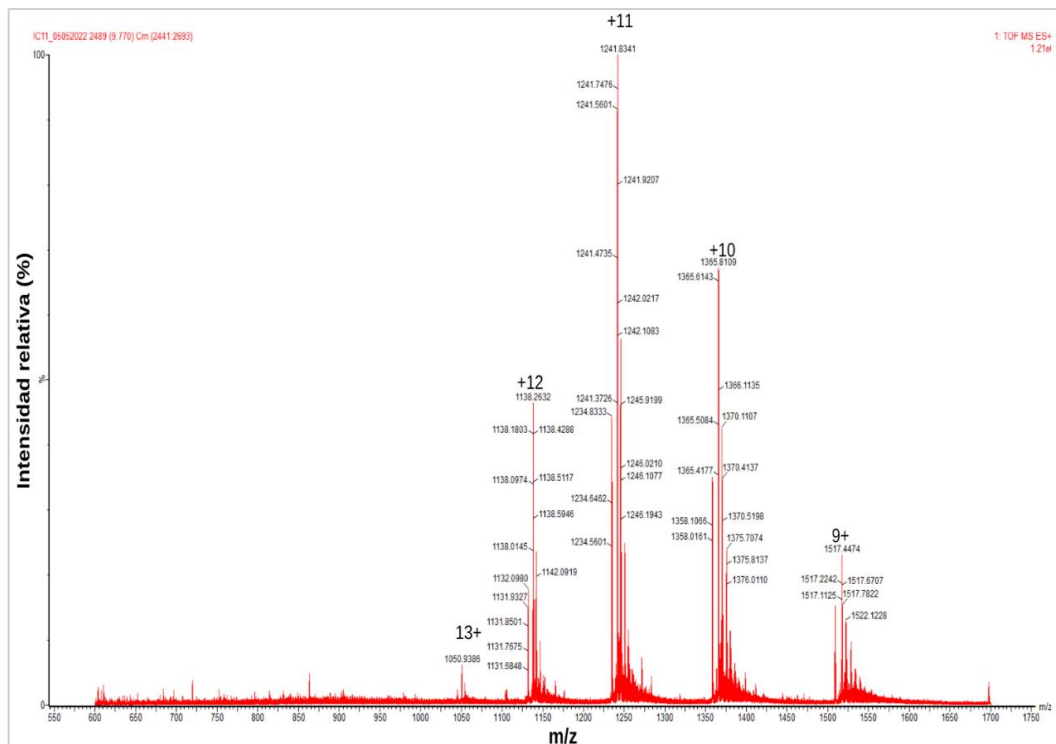


Figura 7. Espectro de masas por ionización electrospray acoplada a espectrometría de masas (ESI-MS) de PLA₂ básica (Lys-49) aislada de *B. asper*.

Realizado por: Ortega, Josselyn, 2023.

La PLA₂ Lys-49 purificada se analizó por cromatografía de ultra eficiencia acoplado a espectrometría de masas mediante la interfaz de ionización electrospray (ESI-MS) en modo scan (**Figura 7**). En el espectro de masa se observan los iones de carga múltiple m/z: desde 9+ m/z=13.657,02, 10+ m/z= 13.658,10, 11+ m/z= 13.660,17, 12+ m/z= 13.659.16 y 13+ m/z= 13.662,20. El ion con carga 11+ m/z tuvo mayor intensidad relativa. Además, mediante el análisis de desconvolución se obtuvo la masa molecular de 13.649,17 Da. de PLA₂ Lys-49, lo que coincide con la masa molecular relativa observado por SDS-PAGE.

3.3.2 Caracterización parcial de la estructural primaria

Para llevar a cabo la identificación molecular y el estudio del homólogo, se realizó una caracterización parcial de la proteína PLA₂ mediante digestión proteolítica seguida de una combinación de técnicas analíticas de cromatografía líquida (LC) con espectrometría de masas en tándem y análisis bioinformático. Para el proceso de descomposición de la proteína en péptidos y su posterior análisis por espectrometría de masas, se empleó una digestión enzimática en solución con tripsina y endoproteinasa (Lys-C). Esta técnica permitió la identificación y cuantificación de la isoforma de PLA₂ para obtener secuencias de aminoácidos de iones peptídicos dobles y triples cargados. La interpretación de los espectros se realizó utilizando el programa MASCOT DISTILLER 2.7 y se compararon con la base de datos Swiss-Prot/TrEMBL para identificar la toxina. Se identificaron trece péptidos (**Tabla 1**) a partir de la proteína digerida, lo que permitió confirmar y clasificarla como una isoforma básica de PLA₂ Lys-49. Se obtuvieron 82 residuos de aminoácidos conformados por los trece péptidos, lo que representa una caracterización parcial del 70% de la secuencia de PLA₂ Lys-49. Los resultados obtenidos proporcionan información valiosa para comprender mejor las propiedades y la estructura de la proteína PLA₂ Lys-49 de *B. asper*.

Tabla 1. Fragmentos pépticos de Lys C y tripsina de PLA₂ Lys-49 de *B. asper* obtenidos por secuenciación LC-MS/MS

No.	Fragmento del péptido	Masa Molecular (Da)		Precisión (ppm)
		Mono isotópica	Teórica	
1	MILQETGK	918.4738	918.4844	-0.0107
2	SYGAYGCNCGVLGRGKPK	1942.9350	1942.9142	0.0208
3	DATDRCCYVHK	1423.6167	1433.5973	0.0194
4	KLTGCNPKK	1044.5734	1044.5750	-0.0016
5	DRYSYSWKDK	1346.6113	1346.6255	-0.0142
6	DRYSYSWK	11a03.5066	11035036	0.0031
7	TIVCGENNSCLK	1393.6519	13936330	0.0189
8	ELCECDK	9523.581	952.3630	-0.0049

9	SYGAYGCNCGVLGR	1532.6955	15326.500	0.0455
10	KLTGCNPK	9164.832	916.4800	0.0032
11	TIVCGENNSCLK	1393.6717	1393.6363	0.0387
12	ELCECDKAVAICLR	1735.8324	1735.8055	0.0269
13	AVAICLR	801.4483	801.4531	-0.0048

Realizado por: Ortega, Josselyn, 2023

La isoforma PLA₂ Lys-49 de *B. asper* aislada se redujo, alquiló y digirió con enzimas proteolíticas como: Lys C se obtuvo 8 péptidos y con la enzima tripsina se obtuvo 5 péptidos marcados con color gris.

Se construyó la secuencia consenso de PLA₂ Lys-49 a partir de los fragmentos peptídicos, con lo cual se obtuvo una secuencia parcial que abarca el 70% de toxina. Esto se realizó, a partir de la plantilla obtenida de Uniprot de la proteína básica aislada de *B. asper* perteneciente a la isoforma catalíticamente inactiva Lys-49. Los péptidos se compararon con otras proteínas similares obtenidas del veneno de serpiente desde la base de Blast del NCBI, revelando similitudes con otras PLA₂ básicas de la familia *Viperidae* del grupo IIA que han sido purificadas y caracterizadas en estudios anteriores.

La alineación múltiple de secuencias de proteínas se realizó con programas bioinformáticos como Clustal Omega y T-coffee, permitiendo realizar comparaciones estructurales y validaciones de porcentaje entre homologías con otras fosfolipasas A₂. Evidenciándose con una alta similitud con otras serpientes del género *Bothrops*, en especial con *Bothrops alternus*, con un 98% de conservación de residuos perteneciente a la secuencia PLA₂ Lys-49. La alineación respalda la similitud entre el modelo generado y la proteína de *B. asper* (**Figura 8**).

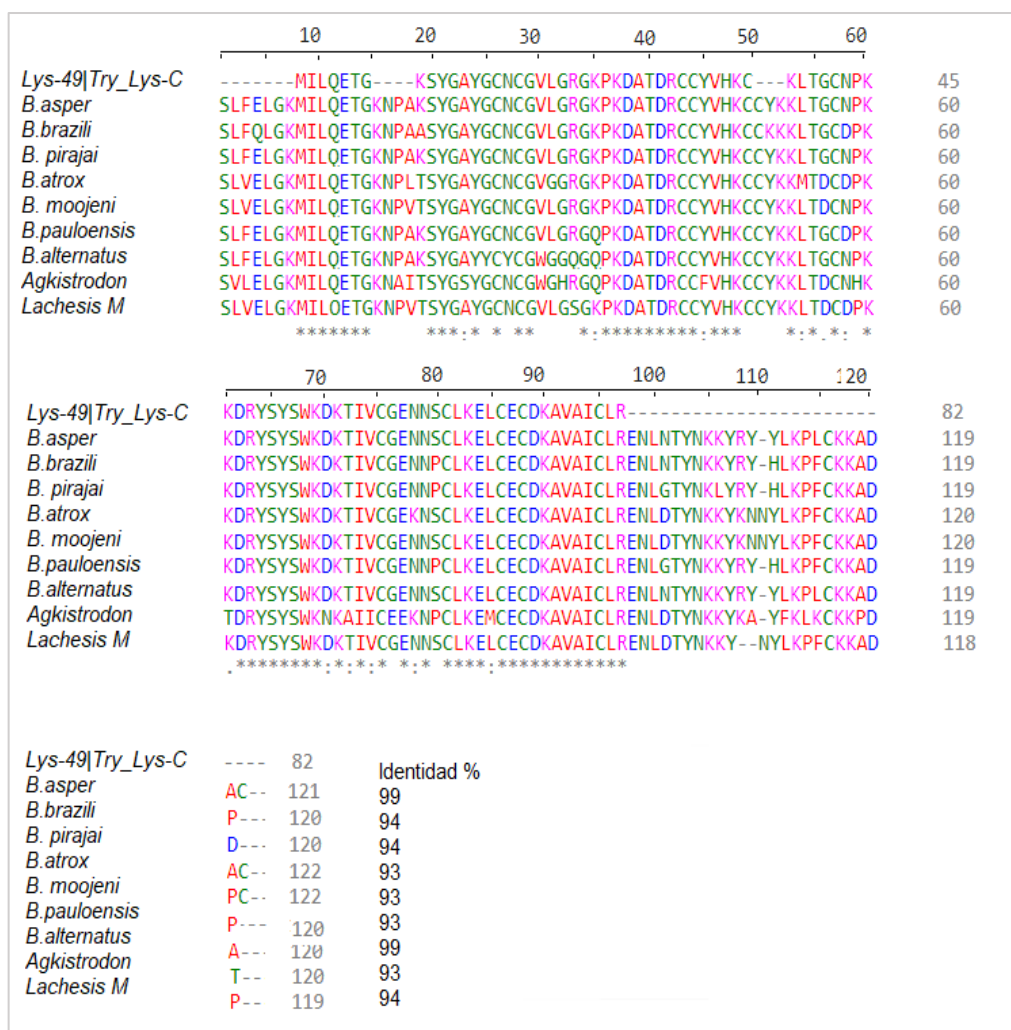


Figura 8. Alineación de la secuencia de aminoácidos de la isoforma básica de PLA₂ (Lys-49) de *B. asper* similares a los venenos de otras serpientes
Realizado por: Ortega, Josselyn, 2023.

Las secuencias similares se adquirieron a través de Blast/p y el modelamiento y alineación se realizó mediante Cluster Omega y el software T-Coffee. Los asteriscos indican (*): residuos idénticos, (:): residuos similares y (.): residuos semiconservados con propiedades poco similares. Se indica a la izquierda la especie y en el lado inferior derecho el porcentaje de identidad con los homólogos de la PLA₂.

3.4 Predicción de péptidos antimicrobianos

La herramienta “AMPfun” predice los posibles péptidos antimicrobianos (AMP), los cuales se obtuvieron de la secuenciación de PLA₂ Lys-49 con las enzimas proteolíticas. Se evaluaron trece péptidos mediante una métrica basada en el área bajo la curva ROC, el cual mide la capacidad de modelo para distinguir entre péptidos AMP y no-AMP. Además, se utilizó una combinación de características físicas, químicas y descriptores

secuenciales para confirmar si los péptidos eran antimicrobianos. En la **Tabla 2** se observó que los péptidos con una puntuación alta ≥ 0.80 posiblemente tengan actividad antimicrobiana destacando su actividad como AMP. Sin embargo, para bacterias Gram positivas y negativas, la puntuación alcanzó un valor ≤ 0.75 , cabe recalcar que se debe considerar un valor >0.7 para una discriminación adecuada. Se destacaron dos péptidos con alto valor de predicción para AMP, bacterias Gram positivas y negativas, lo que los convierte en posibles candidatos ideales para futuras investigaciones.

Tabla 2. Predicción bioinformática mediante AMPfun del potencial antimicrobiano de los péptidos de PLA₂ Lys-49

Nº	Secuencia	AMP	Gram positive bacteria	Gram negative bacteria
1	MILQETGK	0.967	0.525	0.443
2	SYGAYGCNCGVLGRGKPK	0.9374	0.6417	0.706
3	DATDRCCYVHK	0.9449	0.45	0.488
4	KLTGCNPKK	0.9915	0.7333	0.7009
5	DRYSYSWKDK	0.9653	0.525	0.5738
6	DRYSYSWK	0.9364	0.4917	0.5907
7	TIVCGENNSCLK	0.9458	0.575	0.4511
8	ELCECDK	0.8842	0.525	0.4669
9	SYGAYGCNCGVLGR	0.9499	0.65	0.6572
10	KLTGCNPK	0.9907	0.7333	0.645
11	TIVCGENNSCLK	0.9458	0.575	0.4511
12	ELCECDKAVAICLR	0.9182	0.5	0.4075
13	AVAICLR	0.9897	0.775	0.7566

Realizado por: Ortega, Josselyn, 2023.

Se han resaltado de color gris a los valores de predicción que superan el umbral de >0.7 para bacterias Gram positivas y negativas. Además, se ha destacado el número del péptido con valores elevados para estos parámetros.

3.5 Actividad antimicrobiana en PLA₂ Lys-49 y veneno puro de *B. asper*

En cuanto a los resultados del ensayo preliminar de la actividad antimicrobiana, se observó alta susceptibilidad frente a las cepas de *Vibrio* spp. ante las diferentes concentraciones tanto para el veneno total desecado y la toxina de interés aislada PLA₂ Lys-49. El veneno total desecado indujo una inhibición total de las colonias bacterianas aplicada a todas las concentraciones analizadas teniendo 100% de inhibición. Mientras

que, PLA₂ Lys-49 aislada mostró tener actividad antimicrobiana, reduciendo el porcentaje de unidades formadoras de colonias (UFC) al 15.61% a una dosis de 250 µg/mL es decir, un 85% de inhibición en un periodo de 24 horas. De igual manera, el análisis de varianza y prueba de Tukey mostraron que la interacción entre la dosis y la especie es significativa. Esto quiere decir que sí existe diferencia en la susceptibilidad de las especies de *Vibrio* spp. ante las diferentes dosis. Por ejemplo, la cepa de *Vibrio harveyi* mostró mayor resistencia al estar a diferentes concentraciones, lo cual se evidencia en **Figura 9**.

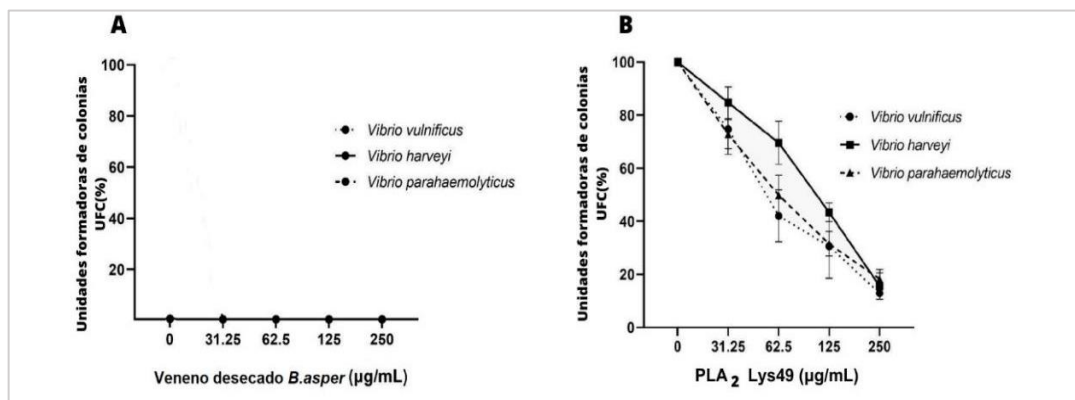


Figura 9. Actividad anti *Vibrio*
Realizado por: Ortega, Josselyn, 2023.

(A) Efecto antivibrio del veneno total desecado a diferentes concentraciones, B) PLA₂ Lys-49 purificada frente cepas de *Vibrio* como: *V. harveyi*, *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus*. Se evaluó la inhibición del crecimiento bacteriano en diferentes concentraciones (0; 31,5; 62,5; 125; 250 µg/mL) de PLA₂ Lys-49 mediante técnica dilución en placa contando las (UFC): unidades formadoras de colonia.

4. CAPÍTULO IV: INTERPRETACIÓN Y DISCUSIÓN

La resistencia a antibióticos en la industria acuícola, particularmente en el caso de los camarones blancos (*Litopenaeus vannamei*), se ha desarrollado en respuesta al uso excesivo e inapropiado de los fármacos, lo que dificulta la eficacia de los tratamientos actuales en enfermedades como la vibriosis. Para encontrar nuevos compuestos antimicrobianos, se ha explorado en la biodiversidad ecuatoriana [67]. Entre ellos, se ha encontrado que el veneno de serpientes contiene moléculas de interés terapéutico, como la proteína básica de la fosfolipasa Lys-49. Esta proteína presenta efectos citotóxicos y miotóxicos que permiten interactuar con la membrana celular bacteriana, lo que confiere su actividad antimicrobiana [68].

En este sentido, se realizó la caracterización proteómica del veneno de *B.asper*, utilizando una combinación de herramientas analíticas las cuales involucran técnicas de cromatografía líquida (LC) de alta eficiencia y ultra eficiencia junto a espectrometría de masas y electroforesis SDS-PAGE (unidimensional). Siendo fundamentales para conocer la complejidad de los venenos [69]. Asimismo, se llevó a cabo un estudio preliminar sobre la actividad antimicrobiana de la toxina aislada y purificada para combatir cepas de *Vibrio* spp.

El primer paso fue el fraccionamiento del veneno mediante RP-HPLC, donde PLA₂ Lys-49 tuvo un tiempo de elución de 40 minutos aproximadamente, lo cual se evidenció en el perfil cromatográfico (**Figura 3**) [70]. En los análisis proteómicos, la PLA₂ Lys-49 se aprecia con una banda electroforética, evidenciando su naturaleza monomérica y una masa molecular relativa de ~14 kDa, lo que concuerda con lo encontrado en el gel electroforético (**Figura 6**), al igual que otros estudios que han purificado esta proteína del veneno de serpientes [71]. Cabe destacar que en el perfil cromatográfico la toxina Lys-49 posee una bifurcación en el pico. En otros estudios se evidencia esta tendencia, corroborando el análisis con lo expuesto en los resultados. Es posible que la toxina presente esta bifurcación o hombro por su heterogeneidad, es decir los venenos a menudo contienen una mezcla compleja de varias variantes de miotoxinas como las isoformas codificadas por genes distintos por duplicación y divergencia [20]. Lomonte y colaboradores [72], mencionan que la presencia de múltiples isoformas parece ser un hallazgo común para las PLA₂ el veneno de serpientes, incluso en el veneno de serpientes individuales como se mostró en *B.asper*. Los cambios evolutivos y ecológicos

a menudo implican la modificación de rasgos fenotípicos, morfológicos y moleculares en una especie. A pesar de que la complejidad genética del veneno de serpiente es moderada en términos del número de genes involucrados, la variabilidad en su composición es una característica común en todos los niveles taxonómicos. Esta variabilidad en la composición del veneno puede estar influenciada por factores como la edad, el sexo, la ontogenia y la geografía de las serpientes [3].

La masa intacta de la PLA₂ Lys-49 en el veneno de *B. asper* fue determinada mediante cromatografía de ultraeficiencia acoplada a espectrometría de masas mediante la interfaz de ionización electrospray (ESI-MS). En un estudio realizado por Mora et al [55], se encontró que la ubicación geográfica de las serpientes puede estar relacionada con la variación de masas de esta enzima. En la ruta Colombia- Costa Rica (incluyendo Ecuador), se caracterizaron PLA₂ Lys-49 con una masa molecular de entre 13.532,5 Da a 14.033,8 Da. En base a esto, se puede decir que la masa molecular de la proteína de serpientes ecuatorianas fue la esperada, con un valor de 13.649,17 Da. Dado que las PLA₂ del veneno de serpientes no muestran modificaciones postraduccionales, por lo que sus valores de masa intacta deberían coincidir con la secuencia de aminoácidos como marcadores fiables de identidad [73].

La proteómica ascendente, en la que se utilizan proteasas para descomponer las proteínas en péptidos con un terminal predicho, fue el método que se empleó para determinar la estructura principal de PLA₂ Lys-49. Después, los péptidos se sometieron a una serie de pruebas que implicaban la combinación de otros tipos de métodos analíticos, como la cromatografía líquida de ultraeficiencia acoplada a espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS). Empleamos un método denominado adquisición dependiente de datos (DDA), que consistía en un barrido de iones precursores [69]. Este modo incluye un barrido de iones precursores (espectros MS1), que tiene lugar en el rango de masas cuadrupolar (Q) (m/z), y está determinado por la abundancia de iones peptídicos con carga +2 y +3 en el ESI. Mediante disociación inducida por colisión de alta energía (CID), los iones más intensos encontrados en este barrido inicial se separan sucesivamente y luego se fragmentan (espectros MS2). El analizador de tiempo de vuelo (TOF) se encarga de la detección de los fragmentos producidos. Los espectros MS/MS se introducen en la base de datos y se evalúa allí para deducir la secuencia del péptido y determinar su identidad (**Tabla 1**) [74].

Por lo que, de manera parcial se obtuvo 82 residuos de aminoácidos por secuenciación, en comparación de la molécula primaria que tiene 122 aminoácidos de PLA₂ Lys-49 de *B. asper*, adquirido desde Uniprot [75]. Por lo que, se creó un modelo útil para la identificación de estructuras similares a otras especies de serpientes relacionadas a PLA₂ Lys-49. Gutiérrez et al [76], mencionan que la secuencia venómica parcial es un grave inconveniente para la identificación de proteínas en el veneno. No obstante, los espectros de fragmentación de iones peptídicos en espectrometría de masas en tándem (MS/MS) son una herramienta importante para proporcionar información e identificar una proteína similar en la base de datos actual [70]. Por lo tanto, aunque el modo DDA mejora la cantidad de la información en el análisis, es importante tener en cuenta que algunos precursores pueden ser ignorados debido a la limitación de rango de masa [74]. Se debe considerar otros enfoques alternativos para lograr una cobertura más completa del proteoma.

La alineación múltiple, se basó en el 70% de la secuencia primaria parcial relacionada a una PLA₂ Lys-49 del veneno de *B. asper*, siendo una proteína catalíticamente inactiva al tener una singularidad en la posición 49 de la secuencia (PLA₂ Lys-49) junto al catalizador residual [77]. Además, según estudios, se menciona que la conservación estructural y plegamiento proteico de svPLA₂ tiene una identidad entre el 40-90% [78].

La mayoría de los péptidos encontrados en este estudio mostraron múltiples alineaciones similares con otras especies de *Bothrops* relacionados a PLA₂ Lys-49 [79]. La secuenciación parcial mostró alta similitud con la proteína de Lys-49, con un 98% de identidad con *Bothrops alternatus*. Se observó en la alineación la conservación de residuos y una gran cantidad de residuos de Lys(K), Try(Y), Gly(G), demostrando características del veneno de una toxina básica como svPLA₂, lo que se puede evidenciar en la **Figura 8** [12]. Además, a partir del análisis comparativo con otros PLA₂ Lys-49 del género *Bothrops*, también tuvieron similitud con la PLA₂ Lys-49 aislada con especies como: *B. brazili*, *B. piraja*, *B. atrox*, *B. pauloensis*, *B. moojeni*, además de otras especies como *Lachesis muta muta*, y *Agkistrodon piscivorus piscivorus* [80,82].

En el estudio preliminar de la actividad antimicrobiana, se expuso que el veneno total desecado y PLA₂ Lys-49 sobre las colonias de *Vibrio* spp en ensayos *in vitro* tuvieron efectos significativos. Al aplicar el veneno total, este contiene una variedad de componentes, se observó una inhibición total sobre la unidad formadora de colonias bacterianas (UFC). Se cree que esto se debe a la sinergia de las proteínas tóxicas

presentes en el veneno, como las fosfolipasas A₂, que afecta radicalmente la estructura de la bicapa lipídica y conduce a la degeneración intracelular y muerte celular necrótica [83, 84]. Otro posible componente del veneno, que pudo estar inmerso son la mitigación bacteriana son las metaloproteinasas, las cuales pueden afectar la capacidad de las bacterias al adherirse a la superficie y formar biopelículas, lo que podría ser útil en el tratamiento de infecciones bacterianas resistentes [85]. Es decir, la letalidad del veneno podría provenir de una acción combinada de varias toxinas y mecanismos endógenos nocivos para las bacterias [86, 87].

En cuanto al tratamiento contra bacterias Gram negativas como el *Vibrio* spp. frente a PLA₂ Lys-49 fue la esperada, ya que inhibió el crecimiento de colonias de bacterias al 85% al estar expuesto a esta toxina (**Figura 9**). La acción de svPLA₂ mantiene sus propiedades biológicas como miotoxicidad, edema, actividad anticoagulante, antitumoral y antimicrobial. Algunos autores han propuesto que la presencia y la abundancia de svPLA₂, confiere ventajas evolutivas en procesos adaptativos de las glándulas venenosas para evitar la proliferación bacteriana en sus presas [4, 88]. Además, al ser una toxina multifuncional induce a efectos mediante la interacción de las regiones moleculares, esto se atribuye a su mayor afinidad con la membrana. La PLA₂ Lys-49 es la responsable de la perturbación de la membrana bacteriana y degeneración celular permanente [66]. Un estudio realizado por Páramo et al [16], demostró la reducción de colonias bacterianas con PLA₂ Lys-49 de *B. asper* tuvo una inhibición en Gram negativas de (*Vibrio cholerae*) del 90%, mientras que en *E. coli* tuvo mayor inhibición 95.4%, siendo el primer mecanismo bactericida independiente de la catálisis ejercido por un homólogo de svPLA₂. Otras PLA₂ Lys-49 del género *Bothrops*, también mostraron efectos bactericidas, como BthTX-i (*B. jararacussu*) sobre cepas de *Enterococcus faecalis* y *E. coli* [89, 90]

El efecto antimicrobiano de PLA₂ Lys-49 en cepas de *Vibrio* spp. probablemente se asocia a procesos de adelgazamiento y desestabilización lipídica. Esta proteína se ancla a los sitios de carga negativa de la membrana, lo que lleva a su rotura, permeabilidad celular, explosión del contenido celular y finalmente la muerte [60]. Estudios realizados por Páramo y colaboradores [16], han demostrado el proceso degenerativo de las cepas bacterianas al estar expuesta a la toxina (PLA₂ Lys-49) de *B. asper*, se provocó el desprendimiento de la membrana interna junto a la formación de gránulos y vacuolización en *V. cholera*, lo que produjo una descomposición celular grave e irreversible. Además, Ward et al [91] ha demostrado que el bucle de la región C-terminal

de PLA₂ Lys-49 posee residuos positivos y aromáticos, lo que permite la hidrólisis independiente de calcio y fosfolípidos. Debido a probables interacciones electrostáticas entre los residuos catiónicos del dominio C-terminal de la PLA₂ Lys-49 y los residuos cargados negativamente en la membrana, lo que causa un colapso membranar, promoviendo a la desorganización de las bicapas, provocando un influjo de Ca²⁺ [92]. En conjunto, estos hallazgos sugieren que PLA₂ Lys-49 podría ser crucial para la actividad antivibrica en contra diversos tipos de vibriones [4].

El uso de herramientas bioinformáticas no solo es útil en el diseño de nuevos péptidos, sino también para la predicción de su funcionalidad [52]. El uso de predictores peptídicos como AMPfun, reveló su capacidad para identificar actividades funcionales en péptidos, como su actividad antimicrobiana, antiviral, antiparasitarias, entre otras [93]. En el estudio se identificaron trece péptidos y se empleó este predictor, sin embargo, dos péptidos destacaron debido a su alto valor tanto para AMP, bacterias Gram positivas y negativas, lo que demostró la importancia de los predictores peptídicos en el diseño de posibles péptidos antimicrobianos (Tabla 2). Esta herramienta se destaca al proporcionar información relevante para desarrollar nuevos compuestos con aplicación terapéutica.

Los péptidos antimicrobianos (AMP) encontrados en este estudio podrían ser una alternativa para frenar la propagación de patógenos, sin desencadenar resistencia bacteriana [94]. Como mencionó Páramo et al [16], al proponer el primer péptido sintético de la región C-terminal 115-129 (p115-W3) de la toxina II de *B. asper*, llamó la atención al ser un líder potencial antimicrobiano y antiendotóxico. La reducción de colonias para *E. coli* con un 99% de susceptibilidad, *mostrando* mayor letalidad que la toxina de origen. Otro estudio, comprobó su efectividad al permeabilizar las membranas en base a su región C-terminal teniendo interacciones catiónicas e hidrofóbicas [54]. Esta propiedad convierte a esta proteína esencial para convertir a pequeños fragmentos en modelos moleculares interesantes, para la obtención de posibles nuevos péptidos funcionales contra diversas bacterias. Además, los péptidos de los venenos podrían usarse *in vivo* en animales acuáticos como los camarones, centrándose en activar la respuesta inmune a la infección y evitar la resistencia bacteriana como un posible y valioso fármaco antivibrico [18, 94].

5. CAPÍTULO V: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

En este estudio, se llevó a cabo la purificación y caracterización bioquímica de una isoforma básica de PLA₂ derivada del veneno de *Bothrops asper*, utilizando técnicas de separación como RP-HPLC y SDS-PAGE en condiciones reductoras. Se evidenció un pico y una única banda perteneciente a la PLA₂ Lys-49, con un peso molecular de aproximadamente 14 kDa, lo que fue corroborado por cromatografía de ultra eficiencia (UPLC) acoplada a espectrometría de masas (ESI-MS) con un peso molecular de 13.659,172 Da. Además, por LC-MS/MS se obtuvo el 70% de la secuencia, que consta de 82 residuos de aminoácidos mediante la caracterización parcial de la estructura primaria PLA₂ Lys-49. Esta secuencia se alineó con otras isoformas de PLA₂ Lys-49 de diferentes especies, destacando las del género *Bothrops*. Asimismo, en el estudio preliminar se demostró una actividad antimicrobiana significativa, con la capacidad de inhibir hasta el 85% de las cepas de *Vibrio* spp. probadas. Por el contrario, con el veneno total desecado se obtuvo un 100% de susceptibilidad, debido a la combinación sinérgica de todas las proteínas presentes en el veneno crudo.

Esta investigación podría tener un gran impacto en el sector acuícola, ya que se podría evitar las pérdidas de producción de camarón causada por patógenos y posiblemente sustituir el uso de antibióticos convencionales. Sin embargo, se requiere más investigación para determinar el mecanismo de acción de la toxina en las bacterias y evaluar su grado de toxicidad en modelos *in vivo*. También es importante destacar que los péptidos derivados del veneno de serpiente poseen gran diversidad antimicrobiana, por lo que sugiere que los péptidos identificados podrían ser una fuente propicia para la exploración de nuevos compuestos antimicrobianos.

En investigaciones futuras, se sugiere sintetizar los péptidos hallados y determinar la actividad antivíbrica para cepas resistentes a antibióticos. Además, se recomienda extraer el veneno de especímenes adultos, ya que poseen una mayor abundancia de fosfolipasa Lys-49 PLA₂ y presentan una mayor actividad miotóxica y citotóxica, en comparación con individuos neonatos o juveniles, lo que ayudara a mejorar el rendimiento del aislado de Lys-49 PLA₂.

Esta investigación establece las bases para el aprovechamiento de los recursos genéticos y biológicos del Ecuador, como el veneno de serpientes que se considera un

tesoro por sus numerosas propiedades terapéuticas. Demostrando ser valioso para el descubrimiento de nuevos agentes antimicrobianos y enfrentar problemáticas de interés médico, económico y social.

6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] J. J. Calvete, P. Juárez, and L. Sanz, "Snake venomomics. Strategy and applications," in *Journal of Mass Spectrometry*, Nov. 2007, pp. 1405–1414. doi: 10.1002/jms.1242.
- [2] A. Alape-Girón *et al.*, "Studies on the venom proteome of *Bothrops asper*: Perspectives and applications," *Toxicon*, vol. 54, no. 7, pp. 938–948, Dec. 2009, doi: 10.1016/j.toxicon.2009.06.011.
- [3] A. Alape-giro *et al.*, "Snake Venomomics of the Lancehead Pitviper *Bothrops asper* : Geographic , Individual , and Ontogenetic Variations research articles," pp. 3556–3571, 2008.
- [4] Y. Angulo and B. Lomonte, "Biochemistry and toxicology of toxins purified from the venom of the snake *Bothrops asper*," *Toxicon*, vol. 54, no. 7, pp. 949–957, 2009, doi: 10.1016/j.toxicon.2008.12.014.
- [5] N. G. de Oliveira Junior, M. H. E Silva Cardoso, and O. L. Franco, "Snake venoms: Attractive antimicrobial proteinaceous compounds for therapeutic purposes," *Cellular and Molecular Life Sciences*, vol. 70, no. 24, pp. 4645–4658, 2013, doi: 10.1007/s00018-013-1345-x.
- [6] B. Lomonte, Y. Angulo, M. Sasa, and J. María Gutiérrez, "The Phospholipase A₂ Homologues of Snake Venoms: Biological Activities and Their Possible Adaptive Roles," 2009.
- [7] J. R. Almeida *et al.*, "Harnessing snake venom phospholipases A₂ to novel approaches for overcoming antibiotic resistance," *Drug Dev Res*, vol. 80, no. 1, pp. 68–85, 2019, doi: 10.1002/ddr.21456.
- [8] L. M. Resende *et al.*, "Exploring and understanding the functional role, and biochemical and structural characteristics of an acidic phospholipase A₂, ApITx-I, purified from *Agkistrodon piscivorus leucostoma* snake venom," *Toxicon*, vol. 127, pp. 22–36, Mar. 2017, doi: 10.1016/j.toxicon.2017.01.002.
- [9] R. Mora *et al.*, "A Lys-49 phospholipase A₂ homologue from *Bothrops asper* snake venom induces proliferation , apoptosis and necrosis in a lymphoblastoid cell line," vol. 45, pp. 651–660, 2005, doi: 10.1016/j.toxicon.2005.01.008.
- [10] R. H. Schaloske and E. A. Dennis, "The phospholipase A₂ superfamily and its group numbering system," *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*, vol. 1761, no. 11, pp. 1246–1259, Nov. 2006, doi: 10.1016/j.bbalip.2006.07.011.
- [11] J. Fernández *et al.*, "Muscle phospholipid hydrolysis by *Bothrops asper* Asp49 and Lys-49 phospholipase A₂ myotoxins - Distinct mechanisms of action," *FEBS Journal*, vol. 280, no. 16, pp. 3878–3886, 2013, doi: 10.1111/febs.12386.

- [12] E. A. Corrêa *et al.*, "Isolation, structural and functional characterization of a new Lys-49 phospholipase A2 homologue from *Bothrops neuwiedi* urutu with bactericidal potential," *Toxicon*, vol. 115, pp. 13–21, Jun. 2016, doi: 10.1016/j.toxicon.2016.02.021.
- [13] S. Sudarshan and B. L. Dhananjaya, "The Antimicrobial Activity of an Acidic Phospholipase A2 (NN-XIa-PLA2) from the Venom of *Naja naja naja* (Indian Cobra)," *Appl Biochem Biotechnol*, vol. 176, no. 7, pp. 2027–2038, 2015, doi: 10.1007/s12010-015-1698-8.
- [14] E. A. Dennis, J. Cao, Y. H. Hsu, V. Magrioti, and G. Kokotos, "Phospholipase A2 enzymes: Physical structure, biological function, disease implication, chemical inhibition, and therapeutic intervention," *Chemical Reviews*, vol. 111, no. 10, pp. 6130–6185, Oct. 12, 2011. doi: 10.1021/cr200085w.
- [15] R. P. Samy, G. Sethi, and L. H. K. Lim, *A brief update on potential molecular mechanisms underlying antimicrobial and wound-healing potency of snake venom molecules*, vol. 115. Elsevier Inc., 2016. doi: 10.1016/j.bcp.2016.03.006.
- [16] L. Páramo, B. Lomonte, J. Pizarro-cerdá, J. A. Bengoechea, J. P. Gorvel, and E. Moreno, "Bactericidal activity of Lys-49 and Asp49 myotoxic phospholipases A2 from *Bothrops asper* snake venom: Synthetic Lys-49 myotoxin II-(115-129)- peptide identifies its bactericidal region," *Eur J Biochem*, vol. 253, no. 2, pp. 452–461, 1998, doi: 10.1046/j.1432-1327.1998.2530452.x.
- [17] S. Bustillo, L. C. Leiva, L. Merino, O. Acosta, E. Bal De Kier Joffé, and J. O. Gorodner, "Antimicrobial activity of *Bothrops alternatus* venom from the Northeast of Argentina." [Online]. Available: www.medigraphic.com
- [18] N. Oguiura, L. Sanches, P. v. Duarte, M. A. Sulca-López, and M. T. Machini, "Past, Present, and Future of Naturally Occurring Antimicrobials Related to Snake Venoms," *Animals*, vol. 13, no. 4, p. 744, Feb. 2023, doi: 10.3390/ani13040744.
- [19] J. R. Almeida *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*, vol. 117, pp. 1–12, Jul. 2016, doi: 10.1016/j.toxicon.2016.03.008.
- [20] B. Lomonte, "Lys-49 myotoxins, secreted phospholipase A2-like proteins of viperid venoms: A comprehensive review," *Toxicon*, vol. 224. Elsevier Ltd, Mar. 01, 2023. doi: 10.1016/j.toxicon.2023.107024.
- [21] B. Lomonte, Y. Angulo, and E. Moreno, "Synthetic Peptides Derived from the C-Terminal Region of Lys-49 Phospholipase A2 Homologues from Viperidae Snake Venoms: Biomimetic Activities and Potential Applications," *Curr Pharm Des*, vol. 16, no. 28, pp. 3224–3230, 2010, doi: 10.2174/138161210793292456.

- [22] E. J. Dupree, M. Jayathirtha, H. Yorkey, M. Mihasan, B. A. Petre, and C. C. Darie, "A Critical Review of Bottom-Up Proteomics: The Good, the Bad, and the Future of This Field," *Proteomes*, vol. 8, no. 3, p. 14, Jul. 2020, doi: 10.3390/proteomes8030014.
- [23] R. M. Miller and L. M. Smith, "Overview and considerations in bottom-up proteomics," *Analyst*, vol. 148, no. 3, pp. 475–486, 2023, doi: 10.1039/D2AN01246D.
- [24] L. Xin *et al.*, "A streamlined platform for analyzing tera-scale DDA and DIA mass spectrometry data enables highly sensitive immunopeptidomics," *Nat Commun*, vol. 13, no. 1, Dec. 2022, doi: 10.1038/s41467-022-30867-7.
- [25] M. S. Peña-Carrillo *et al.*, "Dissection of phospholipases A2 reveals multifaceted peptides targeting cancer cells, Leishmania and bacteria," *Bioorg Chem*, vol. 114, no. May, 2021, doi: 10.1016/j.bioorg.2021.105041.
- [26] S. Posada Arias *et al.*, "Isolation and Functional Characterization of an Acidic Myotoxic Phospholipase A₂ from Colombian Bothrops asper Venom," *Toxins (Basel)*, vol. 9, no. 11, pp. 38–48, 2017, doi: 10.3390/toxins9110342.
- [27] C. Galizio *et al.*, "Comparative compositional and functional analyses of Bothrops moojeni specimens reveal several individual variations," pp. 1–26, 2019.
- [28] S. Huancahuire-Vega, L. A. Ponce-Soto, D. Martins-De-Souza, and S. Marangoni, "Biochemical and pharmacological characterization of PhTX-I a new myotoxic phospholipase A2 isolated from Porthidium hyoprora snake venom," *Comparative Biochemistry and Physiology - C Toxicology and Pharmacology*, vol. 154, no. 2, pp. 108–119, 2011, doi: 10.1016/j.cbpc.2011.03.013.
- [29] Á. N. Gonzabay Crespín, H. A. Vite Cevallos, V. J. Garzón Montealegre, and P. F. Quizhpe Cordero, "Análisis de la producción de camarón en el Ecuador para su exportación a la Unión Europea en el período 2015-2020," *Polo del Conocimiento*, vol. 6, no. 9, pp. 1040–1058, 2021, doi: 10.23857/pc.v6i9.3093.
- [30] L. E. Trujillo *et al.*, "Natural strategies to Improve Growth and Health in Massive Shrimp Cultures in Ecuador," *Bionatura*, vol. 2, no. 2, 2017, doi: 10.21931/RB/2017.02.02.9.
- [31] L. L. Mohny, D. v. Lightner, and T. A. Bell, "An Epizootic of Vibriosis in Ecuadorian Pond-Reared Penaeus vannamei Boone (Crustacea: Decapoda)," *J World Aquac Soc*, vol. 25, no. 1, pp. 116–125, 1994, doi: 10.1111/j.1749-7345.1994.tb00811.x.
- [32] J. Paredes-Mendieta, "Patologías asociadas al cultivo intensivo de camarón blanco litopenaeus vannamei en sistemas cerrados de recirculación (RAS)," pp. 01–62, 2017, [Online]. Available: [http://repositorio.ug.edu.ec/bitstream/redug/21001/1/TESIS DAVID PAREDES.pdf](http://repositorio.ug.edu.ec/bitstream/redug/21001/1/TESIS%20DAVID%20PAREDES.pdf)
- [33] F. Y. Vega Jaramillo, N. Apolo Vivanco, and J. G. Sotomayor Pereria, "La productividad del sector camaronero en la provincia del oro y su impacto al medio ambiente," *Revista científica agroecosistemas*, vol. 7, no. 1, pp. 39–44, 2019, [Online]. Available: <https://aes.ucf.edu.cu/index.php/aes>

- [34] J. J. Prado *et al.*, "Informe Mensual." [Online]. Available: www.produccion.gob.ec
- [35] A. Farmacéutica Mexicana, A. H. México Santiago, M. Luisa, and M. del Carmen, "Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas," *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, vol. 40, no. 3, pp. 22–32, 2009, [Online]. Available: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=57912963005>
- [36] M. Vaiyapuri, S. Pailla, M. Rao Badireddy, D. Pillai, R. Chandragiri Nagarajao, and M. Prasad Mothadaka, "Antimicrobial resistance in *Vibrios* of shrimp aquaculture: Incidence, identification schemes, drivers and mitigation measures," *Aquaculture Research*, vol. 52, no. 7. Blackwell Publishing Ltd, pp. 2923–2941, Jul. 01, 2021. doi: 10.1111/are.15142.
- [37] J. Cuéllar-Anjel *et al.*, *Enfermedades virales de los camarones*. 2014. [Online]. Available: https://utm.edu.ec/fcv/acuicultura/images/acuicultura/pdf_revistas/Guia_Tecnica_Patologia_Inmunologia_de_Camarones_Penaeidos.pdf
- [38] P. de Schryver, T. Defoirdt, and P. Sorgeloos, "Early Mortality Syndrome Outbreaks: A Microbial Management Issue in Shrimp Farming?," *PLoS Pathog*, vol. 10, no. 4, pp. 10–12, 2014, doi: 10.1371/journal.ppat.1003919.
- [39] K. F. J. TANG and M. G. BONDAD-REANTASO, "Impacts of acute hepatopancreatic necrosis disease on commercial shrimp aquaculture," *Revue Scientifique et Technique de l'OIE*, vol. 38, no. 2, pp. 477–490, Sep. 2019, doi: 10.20506/rst.38.2.2999.
- [40] L. Li, H. Meng, D. Gu, Y. Li, and M. Jia, "Molecular mechanisms of *Vibrio parahaemolyticus* pathogenesis," *Microbiological Research*, vol. 222. Elsevier GmbH, pp. 43–51, May 01, 2019. doi: 10.1016/j.micres.2019.03.003.
- [41] X. Hong, L. Lu, and D. Xu, "Progress in research on acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND)," *Aquaculture International*, vol. 24, no. 2, pp. 577–593, 2016, doi: 10.1007/s10499-015-9948-x.
- [42] C. P. Rocha, H. N. Cabral, J. C. Marques, and A. M. M. Gonçalves, "A Global Overview of Aquaculture Food Production with a Focus on the Activity's Development in Transitional Systems—The Case Study of a South European Country (Portugal)," *J Mar Sci Eng*, vol. 10, no. 3, 2022, doi: 10.3390/jmse10030417.
- [43] Jose, "UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR DE INGENIERIA AGRONÓMICA Y DEL MEDIO NATURAL," 2015.
- [44] N. Peña-Navarro and A. Varela-Mejías, "Prevalence of the principal infectious diseases in cultured white shrimp *Penaeus vannamei* in nicoya Gulf, Costa Rica," *Rev Biol Mar Oceanogr*, vol. 51, no. 3, pp. 553–564, Dec. 2016, doi: 10.4067/s0718-19572016000300007.
- [45] L. H. Tran, P. N. Hoang, and K. Fitzsimmons, "Research progress on acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) in Vietnam," *Asian Fish Sci*, vol. 31, no. Special Acute Hepatopancreatic Necrosis Disease (AHPND), pp. 270–273, 2018, doi: 10.33997/j.afs.2018.31.s1.019.

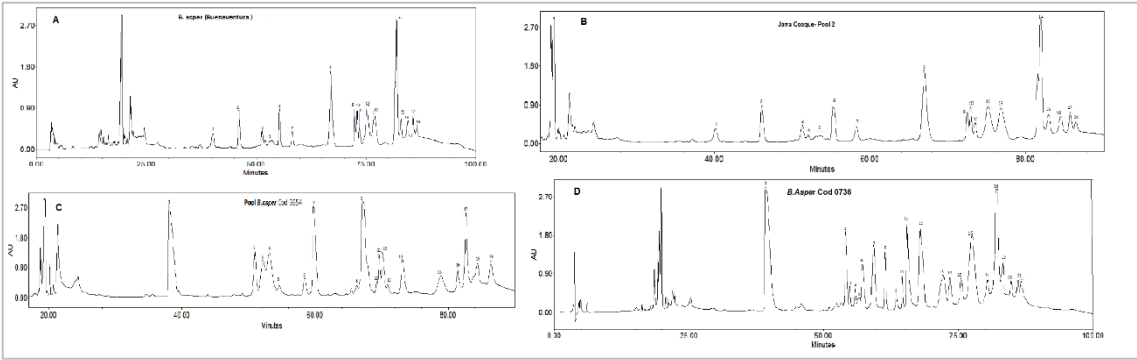
- [46] M. G. C. Emerenciano *et al.*, "Intensification of Penaeid Shrimp Culture: An Applied Review of Advances in Production Systems, Nutrition and Breeding," *Animals*, vol. 12, no. 3, 2022, doi: 10.3390/ani12030236.
- [47] T. H. Tinh, S. Elayaraja, M. Mabrok, P. C. D. Gallantiswara, V. Vuddhakul, and C. Rodkhum, "Antibacterial spectrum of synthetic herbal-based polyphenols against *Vibrio parahaemolyticus* isolated from diseased Pacific whiteleg shrimp (*Penaeus vannamei*) in Thailand," *Aquaculture*, vol. 533, 2021, doi: 10.1016/j.aquaculture.2020.736070.
- [48] T. W. Flegel, "Historic emergence, impact and current status of shrimp pathogens in Asia," *Journal of Invertebrate Pathology*, vol. 110, no. 2, pp. 166–173, Jun. 2012, doi: 10.1016/j.jip.2012.03.004.
- [49] FAO, "Risk assessment tools for *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio vulnificus* associated with Seafood," *Microbiological Risk Assessment Series*, 2020.
- [50] L. E. Aguirre Chanta, H. A. Sánchez-Suárez, and A. Ordinola-Zapata, "Antibiotic resistance in *Vibrio* spp isolated from shrimp *Litopenaeus vannamei*. Treatment alternatives with extracts of neem (*Azadirachta indica*) and oregano (*Origanum vulgare*)," *Revista de Investigaciones Veterinarias del Peru*, vol. 32, no. 4, Aug. 2021, doi: 10.15381/RIVEP.V32I4.19386.
- [51] L. F. Aranguren Caro, H. N. Mai, B. Noble, and A. K. Dhar, "Acute hepatopancreatic necrosis disease (VPAHPND), a chronic disease in shrimp (*Penaeus vannamei*) population raised in latin America," *J Invertebr Pathol*, vol. 174, p. 107424, Jul. 2020, doi: 10.1016/j.jip.2020.107424.
- [52] A. A. Robles-Loaiza *et al.*, "Peptides to tackle leishmaniasis: Current status and future directions," *Int J Mol Sci*, vol. 22, no. 9, 2021, doi: 10.3390/ijms22094400.
- [53] L. Calderón and B. Lomonte, "Inhibition of the myotoxic activity of *Bothrops asper* myotoxin II in mice by immunization with its synthetic 13-mer peptide 115-129," *Toxicon*, vol. 37, no. 4, pp. 683–687, 1999, doi: 10.1016/S0041-0101(98)00211-6.
- [54] C. Santamaría *et al.*, "Antimicrobial activity of myotoxic phospholipases A2 from crotalid snake venoms and synthetic peptide variants derived from their C-terminal region," *Toxicon*, vol. 45, no. 7, pp. 807–815, Jun. 2005, doi: 10.1016/j.toxicon.2004.09.012.
- [55] D. Mora-Obando *et al.*, "Venom variation in *Bothrops asper* lineages from North-Western South America," *J Proteomics*, vol. 229, no. August, p. 103945, 2020, doi: 10.1016/j.jprot.2020.103945.
- [56] B. Lomonte and J. Fernández, "Solving the microheterogeneity of *Bothrops asper* myotoxin-II by high-resolution mass spectrometry: Insights into C-terminal region variability in Lys-49-phospholipase A2 homologs," *Toxicon*, vol. 210, no. March, pp. 123–131, 2022, doi: 10.1016/j.toxicon.2022.02.024.
- [57] R. S. P. Patiño *et al.*, "*Bothrops atrox* from Ecuadorian Amazon: Initial analyses of venoms from individuals," *Toxicon*, vol. 193, pp. 63–72, Apr. 2021, doi: 10.1016/j.toxicon.2021.01.007.
- [58] U. K. LAEMMLI, "Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4," *Nature*, vol. 227, no. 5259, pp. 680–685, Aug. 1970, doi: 10.1038/227680a0.

- [59] R. Sebastian and P. Patiño, "Variación bioquímica y toxicológica de venenos de Bothrops atrox en la Amazonía ecuatoriana : implicaciones clínicas y terapéuticas," 2020.
- [60] J. A. Hernández-Altamirano *et al.*, "First Insights into the Venom Composition of Two Ecuadorian Coral Snakes," *Int J Mol Sci*, vol. 23, no. 23, Dec. 2022, doi: 10.3390/ijms232314686.
- [61] A. K. Tashima *et al.*, "Peptidomics of Three Bothrops Snake Venoms: Insights Into the Molecular Diversification of Proteomes and Peptidomes," *Molecular & Cellular Proteomics*, vol. 11, no. 11, pp. 1245–1262, Nov. 2012, doi: 10.1074/mcp.M112.019331.
- [62] Jose Munuera, "Caracterización proteómica de venenos de serpientes de interés biomédico," Escuela Técnica Superior de ingeniería Agronomica del Medio Natural, Valencia, 2016.
- [63] F. Sievers and D. G. Higgins, "Clustal Omega for making accurate alignments of many protein sequences," *Protein Science*, vol. 27, no. 1, pp. 135–145, Jan. 2018, doi: 10.1002/pro.3290.
- [64] P. di Tommaso *et al.*, "T-Coffee: A web server for the multiple sequence alignment of protein and RNA sequences using structural information and homology extension," *Nucleic Acids Res*, vol. 39, no. SUPPL. 2, Jul. 2011, doi: 10.1093/nar/gkr245.
- [65] C.-R. Chung, T.-R. Kuo, L.-C. Wu, T.-Y. Lee, and J.-T. Horng, "Characterization and identification of antimicrobial peptides with different functional activities," *Brief Bioinform*, vol. 21, no. 3, pp. 1098–1114, May 2020, doi: 10.1093/bib/bbz043.
- [66] C. Santamaría *et al.*, "Bactericidal and antiendotoxic properties of short cationic peptides derived from a snake venom Lys-49 phospholipase A2," *Antimicrob Agents Chemother*, vol. 49, no. 4, pp. 1340–1345, Apr. 2005, doi: 10.1128/AAC.49.4.1340-1345.2005.
- [67] R. A. Charvat, R. M. Strobel, M. A. Pasternak, S. M. Klass, and J. L. Rheubert, "Analysis of snake venom composition and antimicrobial activity," *Toxicon*, vol. 150, pp. 151–167, 2018, doi: 10.1016/j.toxicon.2018.05.016.
- [68] J. J. Calvete, D. Petras, F. Calderón-Celis, B. Lomonte, J. R. Encinar, and A. Sanz-Medel, "Protein-species quantitative venomomics: Looking through a crystal ball," *Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases*, vol. 23, no. 1. BioMed Central Ltd., Apr. 28, 2017. doi: 10.1186/s40409-017-0116-9.
- [69] J. J. Calvete, "Next-generation snake venomomics: Protein-locus resolution through venom proteome decomplexation," *Expert Rev Proteomics*, vol. 11, no. 3, pp. 315–329, 2014, doi: 10.1586/14789450.2014.900447.
- [70] B. Lomonte and J. J. Calvete, "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*, vol. 23, no. 1. BioMed Central Ltd., Apr. 28, 2017. doi: 10.1186/s40409-017-0117-8.

- [71] C. A. H. Fernandes, R. J. Borges, B. Lomonte, and M. R. M. Fontes, "A structure-based proposal for a comprehensive myotoxic mechanism of phospholipase A2-like proteins from viperid snake venoms," *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics*, vol. 1844, no. 12, Elsevier, pp. 2265–2276, 2014. doi: 10.1016/j.bbapap.2014.09.015.
- [72] B. Lomonte and E. Carmona, "Individual expression patterns of myotoxin isoforms in the venom of the snake *Bothrops asper*," *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry*, vol. 102, no. 2, pp. 325–329, Jun. 1992, doi: 10.1016/0305-0491(92)90129-F.
- [73] J. J. Calvete *et al.*, "What's in a mass?," *Biochem Soc Trans*, vol. 49, no. 2, pp. 1027–1037, Apr. 2021, doi: 10.1042/BST20210288.
- [74] Y. Liu, R. Hüttenhain, B. Collins, and R. Aebersold, "Mass spectrometric protein maps for biomarker discovery and clinical research," *Expert Rev Mol Diagn*, vol. 13, no. 8, pp. 811–825, Nov. 2013, doi: 10.1586/14737159.2013.845089.
- [75] "UniProt: the universal protein knowledgebase," *Nucleic Acids Res*, vol. 45, no. D1, pp. D158–D169, Jan. 2017, doi: 10.1093/nar/gkw1099.
- [76] J. M. Gutiérrez and B. Lomonte, "Toxicon Phospholipases A 2: Unveiling the secrets of a functionally versatile group of snake venom toxins," *Toxicon*, vol. 62, pp. 27–39, 2013, doi: 10.1016/j.toxicon.2012.09.006.
- [77] A. N. Grabner *et al.*, "BmajPLA2-II, a basic Lys-49-phospholipase A2 homologue from *Bothrops marajoensis* snake venom with parasitocidal potential," *Int J Biol Macromol*, vol. 102, pp. 571–581, Sep. 2017, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2017.04.013.
- [78] R. M. Kini, "Excitement ahead: Structure, function and mechanism of snake venom phospholipase A2 enzymes," *Toxicon*, vol. 42, no. 8, pp. 827–840, 2003, doi: 10.1016/j.toxicon.2003.11.002.
- [79] J. J. Calvete, "Proteomic tools against the neglected pathology of snake bite envenoming," *Expert Review of Proteomics*, vol. 8, no. 6, pp. 739–758, Dec. 2011. doi: 10.1586/epr.11.61.
- [80] J. I. dos Santos, F. F. Cardoso, A. M. Soares, M. dal Pai Silva, M. Gallacci, and M. R. M. Fontes, "Structural and functional studies of a bothropic myotoxin complexed to rosmarinic acid: New insights into Lys-49-PLA 2 inhibition," *PLoS One*, vol. 6, no. 12, 2011, doi: 10.1371/journal.pone.0028521.
- [81] J. M. Maraganore and R. L. Heinrikson, "The lysine-49 phospholipase A2 from the venom of *Agkistrodon piscivorus piscivorus*. Relation of structure and function to other phospholipases A2," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 261, no. 11, pp. 4797–4804, 1986, doi: 10.1016/s0021-9258(19)89175-5.
- [82] C. E. Núñez, Y. Angulo, and B. Lomonte, "Identification of the myotoxic site of the Lys-49 phospholipase A2 from *Agkistrodon piscivorus piscivorus* snake venom: synthetic C-terminal peptides from Lys-49, but not from Asp49 myotoxins, exert membrane-damaging activities," *Toxicon*, vol. 39, no. 10, pp. 1587–1594, Oct. 2001, doi: 10.1016/S0041-0101(01)00141-6.

- [83] M. T. Da et al., "Crystallographic and Spectroscopic Characterization of a Molecular Hinge: Conformational Changes in Bothropstoxin I, a Dimeric Lys-49-Phospholipase A2 Homologue."
- [84] T. NEVALAINEN, "Antibacterial actions of secreted phospholipases A2. Review," *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*, vol. 1781, no. 1–2, pp. 1–9, Jan. 2008, doi: 10.1016/j.bbalip.2007.12.001.
- [85] E. E. Lourdes García, "EVALUACIÓN DEL PATRÓN DE RECAMBIO DE PROTEÍNAS PROTOTIPO DE MATRIZ EXTRACELULAR EN REGENERACIÓN MUSCULAR DESPUÉS DE LA INYECCIÓN DEL VENENO DE *Bothrops asper* O SUS TOXINAS AISLADAS," 2015.
- [86] A. L. Oliveira, M. F. Viegas, M. J. Ramos, and P. A. Fernandes, "The chemistry of snake venom and its medicinal potential," vol. 6, no. July, 2022, doi: 10.1038/s41570-022-00393-7.
- [87] A. Soares, M. Fontes, and J. Giglio, "Phospholipase A2 Myotoxins from Bothrops Snake Venoms: Structure- Function Relationship," *Curr Org Chem*, vol. 8, no. 17, pp. 1677–1690, 2005, doi: 10.2174/1385272043369610.
- [88] B. Lomonte and J. Rangel, "Toxicon Snake venom Lys-49 myotoxins : From phospholipases A 2 to non-enzymatic membrane disruptors," vol. 60, pp. 520–530, 2012, doi: 10.1016/j.toxicon.2012.02.007.
- [89] A. M. Soares et al., "Structural and Functional Characterization of Myotoxin I, a Lys-49 Phospholipase A 2 Homologue from Bothrops moojeni (Caissaca) Snake Venom 1 The direct action of snake venom myotoxic phospho-lipases A 2 (PLA 2 s) 3 on the plasma membrane of muscle cells, aggravated by the vascular damage and ischemia," 2000. [Online]. Available: <http://www.idealibrary.comon>
- [90] C. Correa-Netto et al., "Immunome and venome of Bothrops jararacussu: A proteomic approach to study the molecular immunology of snake toxins," *Toxicon*, vol. 55, no. 7, pp. 1222–1235, 2010, doi: 10.1016/j.toxicon.2009.12.018.
- [91] R. J. Ward, L. Chioato, A. H. C. de Oliveira, R. Ruller, and J. M. Sa, "Active-site mutagenesis of a Lys 49-phospholipase A 2 : biological and membrane-disrupting activities in the absence of catalysis," 2002.
- [92] A. Proleón et al., "Functional, immunological characterization, and anticancer activity of BaMtx: A new Lys-49- PLA2 homologue isolated from the venom of Peruvian Bothrops atrox snake (Serpentes: Viperidae)," *Int J Biol Macromol*, vol. 206, pp. 990–1002, May 2022, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2022.03.111.
- [93] Y. Liscano, J. Oñate-Garzón, and J. P. Delgado, "Peptides with dual antimicrobial–anticancer activity: Strategies to overcome peptide limitations and rational design of anticancer peptides," *Molecules*, vol. 25, no. 18, 2020, doi: 10.3390/molecules25184245.
- [94] J. R. Almeida et al., "A novel synthetic peptide inspired on Lys-49 phospholipase A2 from *Crotalus oreganus abyssus* snake venom active against multidrug-resistant clinical isolates," *Eur J Med Chem*, vol. 149, pp. 248–256, Apr. 2018, doi: 10.1016/j.ejmech.2018.02.055.

7. ANEXOS



Anexo 1. Perfil cromatográfico de los venenos individuales de *B. asper*
Realizado por: Ortega, Josselyn, 2023.

A) Espécimen neonato de la reserva Buena Aventura Jocotoco ubicada en la provincia del Oro, B) Espécimen neonato de la Reserva Jama Coaque en la provincia de Manabí, C) Espécimen juvenil del área protegida del Bosque y Vegetación Oña-León ubicado en la provincia del Azuay (Cod 5654), se observa que este espécimen posee el mismo hombro en la toxina (Lys-49), D) Espécimen adulto del área protegida del Bosque y Vegetación Oña-León ubicado en la provincia del Azuay (Cod 0736), en este espécimen se centró la investigación al obtener mayor cantidad de liofilizado. Todas las PLA₂ Lys 49 se etiquetaron como 1.

Anexo 2. Información de especímenes de *B. asper*

Espécimen	Ubicación	Talla (cm)	Estado	Corridas cromatográficas	Liofilizado (mg)
Buena aventura	Reserva Buenaventura Jocotoco, en la provincia del Oro	30	Neonato	7	-
Jamacoaque	Reserva Ecológica Jama Coaque en la provincia de Manabí	50	Neonato	9	-

Oña León 1 (Cod 5654)	Área Protegida del Bosque y Vegetación Oña- León ubicado en la provincia del Azuay	95	Juvenil	7	-
Oña León (Cod 0736)		140	Adulto	11	1.5 mg

Realizado por: Ortega, Josselyn, 2023.