



UNIVERSIDAD REGIONAL AMAZÓNICA IKIAM
Facultad de Ciencias de la Vida
Carrera de Ingeniería en Biotecnología

***Caracterización bioquímica y efectos del veneno de
Bothrocophias microphthalmus en preparaciones
neuromusculares.***

María Belén Macas Granizo
30 de Abril de 2021, ciudad de Tena, Napo, Ecuador

Declaración de derecho de autor, autenticidad y responsabilidad

Tena, 30 de abril de 2021

Yo, María Belén Macas Granizo con documento de identidad N° 0650206378, declaro 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.

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

Atentamente,

Firma:



María Belén Macas Granizo

Certificado de dirección de trabajo de integración curricular

Certifico que el trabajo de integración curricular titulado: “Caracterización bioquímica y efectos del veneno de *Bothrocophias microphthalmus* en preparaciones neuromusculares”, en la modalidad de: proyecto de investigación en formato tesis, fue realizado por: María Belén Macas Granizo, 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 Ikiám, para su entrega y defensa.

Tena, 30 de abril de 2021

Firma:

JOSE
RAFAEL DE
ALMEIDA

Firmado digitalmente por
JOSE RAFAEL DE
ALMEIDA
Fecha: 2021.04.29
19:54:32 -05'00'

.....

José Rafael de Almeida

C.I.:1757448954

Firma:



.....

David Salazar Valenzuela

C.I: 1711099604

Agradecimientos

Este trabajo no hubiese sido posible sin el apoyo primordial de mi tutor PhD. Rafael de Almeida, quién con todos sus conocimientos, paciencia y amistad, me orientó durante toda la investigación y la realización del trabajo final.

Al laboratorio de la Facultad de Farmacología de la Universidad Estatal de Campinas (UNICAMP), que con la colaboración de PhD. Raphael Scherazo, permitieron realizar experimentos en su laboratorio.

Finalmente, a mi grupo de investigación de Ikiam.

Dedicatoria

Este trabajo se lo dedicó a Dios porque siempre está conmigo y nunca me dejó caer a pesar de los problemas y dificultades. A mis padres Jorge Macas y Marlene Granizo que con su esfuerzo, trabajo y amor hicieron que ahora logre mi sueño más anhelado. A mis hermanas Jéssica y Vanesa que me apoyaron día a día, dándome aliento para que siga adelante y a toda mi familia porque siempre creyeron en mí.

A mis mejores amigos de la Universidad que siempre estuvieron para darme la mano en los momentos difíciles, pues sin el equipo y gran vínculo que formamos, todo hubiera sido mucho más difícil.

Índice general

Declaración de derecho de autor, autenticidad y responsabilidad	ii
Certificado de dirección de trabajo de integración curricular	iii
Agradecimientos	iv
Dedicatoria	v
Índice general	vi
Índice de tablas	viii
Índice de figuras	ix
Resumen.....	x
Abstract	xi
Capítulo I: Planteamiento del problema de investigación	1
1.1. Antecedentes.....	1
1.2. Planteamiento del problema	8
1.3. Justificación de la investigación.....	9
1.4. Objetivos de la investigación	10
Capítulo II: Marco metodológico.....	12
2.1. Veneno.....	12
2.2. Perfil bioquímico.....	12
2.3. Caracterización de la actividad enzimática	13
2.4. Actividad Neurotóxica.	15
2.5. Análisis estadístico.....	16
Capítulo III: Presentación de datos y resultados.....	17
3.1. Perfil bioquímico del veneno de <i>B. microphthalmus</i>	17
3.2. Caracterización de la actividad enzimática	19
3.3. Actividad Neurotóxica	20

3.3.1 Actividad en las preparaciones del diafragma frénico de ratón (DFR).....	20
3.3.2 Actividad en las preparaciones de <i>biventer cervicis</i> de pollo (BCP)	22
Capítulo IV: Interpretación y discusión.	25
Capítulo V. Conclusiones y Recomendaciones.	31
Capítulo VI. Bibliografía	32

Índice de tablas

Tabla N°1. Número de casos de mordeduras de serpientes, clasificadas de acuerdo al grado clínico del envenenamiento en el periodo 2015- (Semana -12) 2021	4
--	---

Índice de figuras

Figura 1. <i>Bothrocophias microphthalmus</i> y su distribución geográfica en Ecuador.....	5
Figura 2. Gel de electroforesis en poliacrilamida (SDS-PAGE) de venenos totales	18
Figura 3. Perfil cromatográfico del veneno de <i>Bothrocophias microphthalmus</i>	19
Figura 4. Caracterización enzimática de los venenos de <i>Bothrocophias microphthalmus</i> (Bm) y <i>Bothrops atrox</i> (Ba1, Ba2).	20
Figura 5. Actividad neurotóxica del veneno de <i>B. microphthalmus</i> sobre el nervio frénico-diafragma del ratón	21
Figura 6. Actividad neurotóxica del veneno de <i>B. microphthalmus</i> sobre el nervio del músculo <i>biventer cervicis</i> de pollo.....	23
Figura 7. Efecto en la contracción del músculo <i>biventer cervicis</i> incubado con veneno de <i>B. microphthalmus</i> (3, 10, 30, 100 µg / ml) en respuesta a acetilcolina (ACh) (A) 1 mM, carbacol (CCh) (B) 20 µM y KCl (C) 40 mM.	24

Resumen

El género *Bothrocophias* está formado por seis especies características de Sudamérica, sin embargo, ha sido muy poco explorado. Actualmente existen solo dos análisis proteómicos completos correspondientes a *B.campelli* y *B.myersi*. Por lo cual, en el presente estudio se realizó la caracterización bioquímica preliminar, evaluación enzimática de las principales toxinas y el posible efecto neurotóxico en preparaciones de *biventer cervis* de pollo (BCP) y diafragma frénico de ratón (DFR) del veneno de *B. microphthalmus*. *B. microphthalmus* se distribuye desde Colombia hasta Perú. En Ecuador se encuentra en las provincias de Napo, Pastaza, Zamora Chinchipe, Morona Santiago y Tungurahua. Nuestros resultados indican que el veneno de *B. microphthalmus* está probablemente en su mayoría constituido por metaloproteinasas, serinproteasas y fosfolipasas. Las actividades enzimáticas analizadas sugieren similitudes y diferencias enzimáticas entre el veneno de *Bothrops atrox* y *B. microphthalmus*, las cuales pueden tener implicaciones fisiológicas en la víctima, si la respuesta farmacológica es dependiente de la acción enzimática. *B. microphthalmus* no genera un efecto neurotóxico como función principal, el mismo es una consecuencia del daño miotóxico producido por sus diferentes componentes. Las preparaciones de BCP son más sensibles a los componentes del veneno que las preparaciones de DFR. *B. microphthalmus* tiene un mayor efecto neuromuscular en preparaciones de BCP en comparación con venenos del género *Bothrops* de Brasil. Por ende, este trabajo representa un primer paso en el entendimiento de la acción y composición de este veneno. Futuros estudios deben investigar los demás efectos tóxicos inducidos por el veneno, así como sus toxinas involucradas.

Palabras clave: accidente ofídico, caracterización bioquímica, ensayos enzimáticos, efecto neurotóxico.

Abstract

The genus *Bothrocophias*, although consisting of six species characteristics of South America, has been little explored. Currently there are only two complete proteomic analyses corresponding to *B.campelli* and *B.myersi*. Therefore, in the present study the preliminary biochemical characterization, enzymatic evaluation of the main toxins and the possible neurotoxic effect on chicken *biventer cervis* (BCP) and mouse phrenic diaphragm (DFR) preparations of *B. microphthalmus* venom were performed. *B. microphthalmus* is distributed from Colombia to Peru. In Ecuador it is located in the provinces of Napo, Pastaza, Zamora Chinchipe, Morona Santiago and Tungurahua. Our results indicate that the venom of *B. microphthalmus* is probably mainly composed by metalloproteinases, serine proteinases and phospholipases. The enzymatic activities analyzed suggest enzymatic similarities and differences between the venom of *Bothrops atrox* and *B. microphthalmus*, which may have physiological implications in the victim, if the pharmacological response is dependent on enzymatic action. *B. microphthalmus* does not generate a neurotoxic effect as its main function; it is a consequence of the myotoxic damage produced by its different components. BCP preparations are more sensitive to the venom components than DFR preparations. *B. microphthalmus* has a greater neuromuscular effect in BCP preparations compared to venoms of the genus *Bothrops* from Brazil. Therefore, this work represents a first step in the understanding of the action and composition of this venom. Future studies should investigate the other toxic effects induced by the venom, as well as the toxins involved.

Key words: ophidian accident, biochemical characterization, enzymatic assays, neurotoxic effect.

Capítulo I: Planteamiento del problema de investigación

1.1. Antecedentes

El veneno de serpiente está constituido por una mezcla de compuestos, de diferente naturaleza química, entre las cuales predominan proteínas y péptidos [1]. Es generado y almacenado en glándulas especializadas del animal de donde es secretado. Desde el punto de vista funcional, es un material diseñado para capturar a su presa y digerirla, así como también para defenderse de depredadores [1,2]. La complejidad de la composición del veneno de serpientes ha sido estudiada por años desde diferentes enfoques con la finalidad de comprender la evolución de esta adaptación en las especies y la acción que produce el veneno sobre diferentes sistemas de la presa [1,3]. Especialmente se ha centrado su estudio en las consecuencias toxicológicas y clínicas del envenenamiento en víctimas humanas, pues según la Organización Mundial de la Salud (OMS), cada año se generan aproximadamente entre 4,5 y 5,4 millones de mordeduras de serpientes, las cuales son responsables de 81 000 a 138 000 muertes a nivel mundial [4]. Debido a este alto número de accidentes ofídicos y por presentarse principalmente en personas de escasos recursos económicos que habitan en sectores sin acceso a la salud y sin un tratamiento adecuado, la misma entidad en el 2017 categorizó nuevamente al envenenamiento ofídico como una enfermedad tropical desatendida de alta prioridad [5,6]. Las zonas de mayor riesgo se ubican en ambientes tropicales y subtropicales, con temperaturas constantes y que poseen una gran vegetación, siendo particularmente el Sur de Asia, África y Latinoamérica los lugares más afectados [4,7].

Por otra parte, la investigación en cuanto a las toxinas que presentan los venenos ha tomado gran importancia debido a que muchas moléculas han sido utilizadas en el campo de la medicina como tratamiento de enfermedades graves, entre las cuales se encuentran la hipertensión arterial y cáncer [8–10]. En la actualidad se siguen obteniendo compuestos con actividad prometedora [11,12]. Por tal motivo en este campo es muy importante los estudios *in vitro*, pues permiten elucidar el modo de acción y cinética de las diferentes toxinas, identificar posibles aplicaciones farmacéuticas, entender eventos patológicos, signos clínicos desencadenados por la mordedura y proponer blancos para el

mejoramiento de la terapia antiveneno.

Con la finalidad de analizar más adelante la evolución proteómica, varias investigaciones se han llevado a cabo, analizando el perfil enzimático, proteómico y toxicológico a nivel de géneros y especies [13–16]. Adicionalmente, en este escenario trabajos clínicamente relevantes han buscado establecer relaciones entre estos hallazgos y las principales manifestaciones características del envenenamiento. Sin embargo, este rompecabezas es bastante complejo [17–19]. A pesar de los avances, mucho más esfuerzo es necesario para entender estas relaciones, principalmente considerando la diversidad de isoformas y proteoformas de toxinas, la variabilidad venómica y otras características que son inmunogénicas y clínicamente determinantes para los efectos derivados de este importante desafío médico [3,20–22].

Las serpientes mayormente estudiadas son las que pertenecen a las familias Elapidae y Viperidae, pues son las que generan el mayor número de accidentes ofídicos en el mundo [2,23]. Entre las principales especies de la familia Elapidae se encuentran *Naja* spp. (cobras, Asia y África), *Micrurus* spp. (corales, América), *Dendroaspis* spp. (mambas, África), *Bungarus* spp. (Asia) y serpientes marinas. Su veneno se caracteriza por estar formado principalmente por fosfolipasas A₂ (PLA₂, 14-17 kDa) o por toxinas de tres dedos (3FTX, 6- 8 kDa), las cuales pueden ser neurotoxinas y cardiotoxinas y en menor cantidad por dendrotoxinas (DTx), metaloproteinasas (SVMP), serinproteasas (SVSP), lectinas tipo C (CTL), entre otras [1,24]. En la familia Viperidae los géneros de mayor importancia son *Bothrops*, *Crotalus*, *Bothrocophias*, *Bothriechis*, *Lachesis*, *Calloselasma* y *Deinagkistrodon*. Los venenos de estas especies están constituidos principalmente por fosfolipasas A₂ (Asp49 y Lys49), metaloproteinasas (P-I y P-III), serinproteasas, miotoxinas de bajo peso molecular (Myo) y en menor cantidad por lectinas tipo C, L-aminoácido oxidasa (LAO), desintegrinas (Dc), entre otras [1,24].

Los efectos clínicos dependen fuertemente del tipo de toxinas por las que se encuentra formado el veneno y su concentración, las cuales de manera individual o por acción sinérgica generan una serie de efectos locales y sistémicos [2]. En el caso de los elápidos entre los efectos locales comunes se destacan: dolores leves a moderados en el

sitio de la mordedura, inflamación local y en ciertos casos necrosis. Entre los efectos sistémicos se encuentran principalmente el efecto neurotóxico, lo cual conlleva a una parálisis flácida [23,25]. En el caso de los vipéridos sus efectos locales comunes son hemorragia local, equimosis (hematomas), ampollas, formación de edemas y necrosis. En cuanto a sus efectos sistémicos se genera hipotensión, shock, taquicardia, hemorragia interna y cuagulopatía [2]. En este grupo se diferencia el género *Crotalus*, pues su principal efecto es neurotóxico similar al de los elápidos, acompañado de un daño renal agudo y de igual forma genera efectos miotóxicos. Cabe recalcar que todos estos efectos pueden generar morbilidad y mortalidad, sin embargo para que ocurran depende mucho del manejo adecuado de la mordedura y la atención médica que se le preste al paciente [26,27]. Frente a estos efectos clínicos, el antiveneno es el único tratamiento aprobado hasta la actualidad para tratar a pacientes envenenados [28] y la caracterización bioquímica y enzimática de los venenos a nivel individual y entre especies, contribuye a la selección de los inmunógenos y por lo tanto a la producción y a la determinación de la eficacia del mismo [29,30].

1.1.1. Ofidismo en Ecuador

Ecuador posee un clima cálido en sus regiones Costa, Amazonía e Insular, abarcando la presencia de alrededor de 246 especies de serpientes, entre las cuales 36 son venenosas [31,32]. En consecuencia, se producen un alto número de accidentes ofídicos y de manera similar a otros países tropicales, la mordedura de serpientes representa un gran problema de salud pública. Según datos epidemiológicos del Ministerio de Salud, se ha registrado un rango de 25 a 30 envenenamientos por semana, los cuales desencadenan un efecto clínico de leve a grave, ocurriendo un envenenamiento anual en promedio de 1500 casos. En la Tabla N°1 se puede observar el número de casos de envenenamiento por mordedura de serpientes que han ocurrido en los últimos 5 años. La región Amazónica es la que tiene el mayor grado de incidencia de mordedura de serpientes, seguido de la región Costa y Sierra [33]. El mayor número de casos se dan a causa de especies pertenecientes a la familia Viperidae, principalmente *Bothrops atrox*, *Bothrops asper*, *Bothrocophias microphthalmus*, *Bothriopsis bilineata*, *Bothriopsis taeniata* y *Lachesis muta*. En Ecuador no existe una producción local de antiveneno, siendo por lo tanto necesario la importación de

este producto biológico. Actualmente, el antiveneno de referencia usado en la clínica corresponde al importado del Instituto Clodomiro Picado de Costa Rica, el cual se caracteriza como polivalente y es producido a partir de la inmunogenización usando *Bothrops asper*, *Crotalus durissus* y *Lachesis muta*.

Tabla N°1. Número de casos de mordeduras de serpientes, clasificadas de acuerdo al grado clínico del envenenamiento en el periodo 2015- (Semana -12) 2021 [34].

Clasificación de la mordedura	Años						
	2015	2016	2017	2018	2019	2020	2021
Leve	962	970	751	672	746	681	146
Moderada	692	542	491	429	502	525	92
Grave	191	204	206	196	241	232	37
Total	1845	1716	1448	1297	1489	1438	275

1.1.2. Descripción del género *Bothrocophias*.

El género *Bothrocophias* pertenece a la familia Viperidae y sus especies se encuentran localizadas en América del Sur [35,36]. Son diferenciadas por su distribución altitudinal y por habitar en bosques húmedos cis y trans-Andinos [36,37]. Este género fue descrito por primera vez por Gutberlet y Campbell [38], quienes determinaron características únicas para *Bothrocophias*, por lo cual fueron separadas del género *Bothrops* al que pertenecían anteriormente, convirtiéndose en un grupo monofilético [35,39]. Inicialmente estuvo conformado por 4 especies: *B. campbelli*, *B. hyoprurus*, *B. microphthalmus* y *B. myersi* [38]. Sin embargo en el 2004, Campbell and Lamar incluyeron a la especie *B. colombianus* [40] y en el 2012, Carrasco et al., añadieron a la lista, a la especie *B. andianus* [35]. En Ecuador se encuentran: *Bothrocophias microphthalmus*, *Bothrocophias hyoprora* y *Bothrocophias campbelli* [35,41].

Bothrocophias microphthalmus, se encuentra distribuida entre los 1000-2350 msnm, abarcando las laderas amazónicas de los Andes, desde Colombia hasta Perú. En Ecuador se distribuye en las provincias de Pastaza, Zamora Chinchipe, Morona Santiago y Tungurahua [37,41].

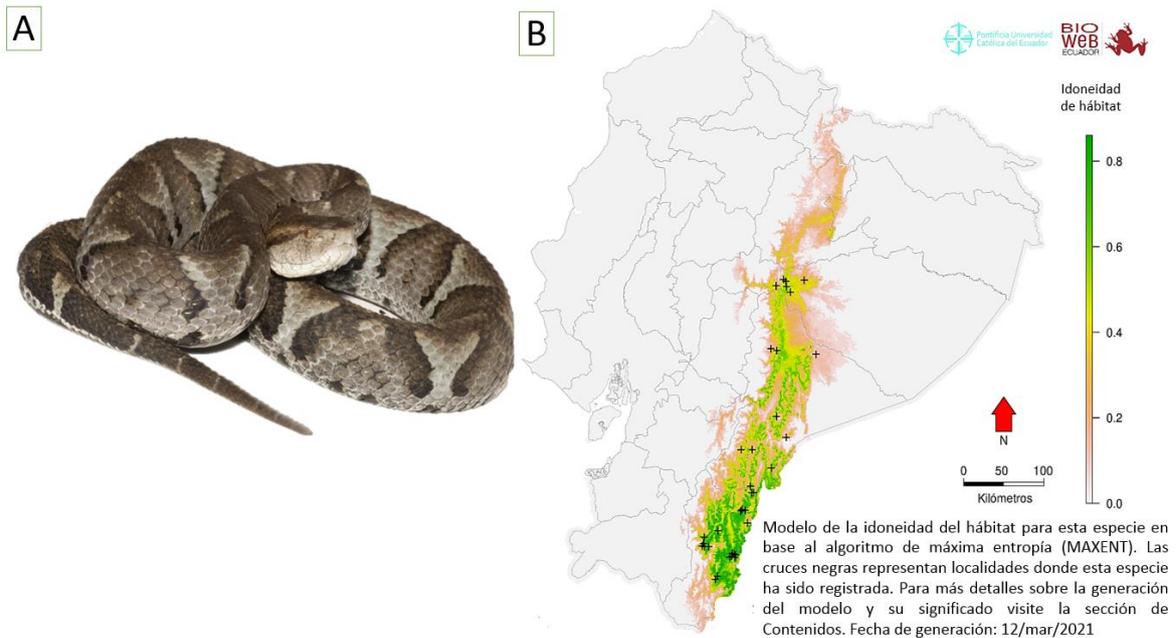


Figura 1. *Bothrocophias microphthalmus* y su distribución geográfica en Ecuador. A. Imagen representativa de la especie de la cual se extrajo el veneno, código de colección QCAZR13858. La misma fue tomada por Omar Torres y se encuentra en la página de BIOWEB, bajo licencia CC BY-NC-ND 4.0. **B.** Mapa de la distribución potencial de *Bothrocophias microphthalmus*, tomado de la página de BIOWEB. Bajo licencia CC BY-NC-ND 4.0 [42,43].

1.1.3. Investigaciones realizadas con venenos del género de *Bothrocophias*.

Debido a que se trata de un género poco explorado, existe información mínima acerca de la composición proteómica y sus efectos toxicológicos, existiendo hasta la actualidad solo dos investigaciones, las cuales corresponden a *Bothrocophias campbelli* [36] y *Bothrocophias myersi* [18]. De acuerdo a los estudios realizados, el envenenamiento por *Bothrocophias* produce manifestaciones similares al “Síndrome Bothrópico” que incluyen en los efectos locales: edemas y necrosis, mientras que en los efectos sistémicos: hemorragia, coagulopatía, miotoxicidad, trombosis, daño renal y shock hipovolémico [2,44]. Estos efectos son causados por la acción de proteínas que están presentes en el veneno y las cuales en muchos casos son características de cada familia o especie. Entre este grupo, las fosfolipasas A₂ (PLA₂) son las que han sido mayormente estudiadas, debido a la variedad existente en el veneno de serpientes [45,46]. Estas toxinas interactúan con la membrana celular y en ciertas especies son las protagonistas de los efectos neurotóxicos [27,47], mientras que en otras, generan un alto daño miotóxico y

necrosis [45,48].

El estudio del veneno de especies del género *Bothrocophias* indica que las PLA₂ son los componentes de mayor abundancia. Esto fue identificado en la investigación de Salazar-Valenzuela y colaboradores [36], donde describen el perfil proteómico y toxicológico del veneno de *Bothrocophias campbelli*. En esta investigación se observó que este veneno se compone particularmente de: fosfolipasas A₂ (43.1%), serinoproteinasas (21.3%), metaloproteinasas (15%). Esta combinación de toxinas está íntimamente relacionada con los efectos tóxicos, destacando que por el alto contenido de PLA₂ y bajo contenido de metaloproteinasas, se produce un alto efecto miotóxico y un bajo efecto hemorrágico.

De igual forma, en otro estudio publicado en enero del presente año, Pereañez y colaboradores [18] describieron el perfil proteómico de *Bothrocophias myersi*. Donde mediante espectrometría de masas se reveló que este veneno está bioquímicamente formado por fosfolipasas A₂ (54.0%), metaloproteinasas (21.5%) y serinoproteinasas (3.4%). En cuanto a sus efectos toxicológicos, los autores determinaron una alta miotoxicidad y un bajo efecto hemorrágico, los cuales se correlacionan con la formación de edema local y miotoxicidad, sin presentar coagulopatía sistemática reportado por datos clínicos hospitalarios.

De acuerdo a los estudios mencionados, la miotoxicidad presentada en los venenos del género *Bothrocophias*, se da a causa de las fosfolipasas A₂ degradadoras de membranas del grupo II [45,46], las cuales pueden estar generalmente presentes en el veneno de dos isoformas: Asp49 y Lys49. La primera corresponde a la forma catalíticamente activa, la cual cataliza la hidrólisis de los glicerofosfolípidos, liberando consecuentemente ácidos grasos y lisofosfolípidos bioactivos [49]. Mientras que la segunda carece de actividad catalítica, sin embargo de igual forma genera un daño miotóxico, al tener una región hidrofóbica y catiónica que le permite unirse a las biomembranas, principalmente de células musculares y lesionarlas con facilidad induciendo necrosis y en muchos casos pérdida de función tejidual [45,49,50].

Por otro lado, algunos trabajos han identificado algunas isoformas de PLA₂ con

actividad neurotóxica *in vitro* e *in vivo*, cuya manifestación clínica genera alteraciones en la visión, parestesias (sensación de hormigueo) en todo el cuerpo, dificultades para hablar y respirar, parálisis muscular y respiratoria [51]. Tal es el caso de *Micrurus lemniscatus*, en donde se sugiere que los 4 tipos de PLA₂ aisladas generan una actividad tóxica probablemente por su unión específica a las membranas neuronales y a la catálisis de la hidrólisis de fosfolípidos [52,53]. En el caso *Crotalus durissus terrificus*, su proteoma está formado por 48,5% PLA₂, ácidas y básicas, siendo la crotoxina el principal componente neurotóxico [54]. De igual forma, en estudios en donde se ha evaluado la actividad neurotóxica *in vitro* se han podido describir otras características neurológicas agudas después del envenenamiento, las cuales probablemente pueden ser por acción directa de la neurotoxicidad o como consecuencia de efectos indirectos generados por otras toxinas del veneno como hemorragias cerebrales, infarto por cuagulopatía, miotoxicidad y mionecrosis [25,55,56].

Previamente no se ha evaluado y descrito actividad neurotóxica en venenos de especies cercanas a *B. microphthalmus*. En los trabajos más cercanos, especies del género *Bothrops* han sido evaluados, los cuales en su mayoría no presentaron esta actividad o fue muy baja. Sin embargo, se debe considerar la alta complejidad y variabilidad de toxinas del veneno de vipéridos, lo que a su vez causa variación en los efectos toxicológicos ocasionados por el mismo. Tal es el caso del accidente ofídico con *Crotalus durissus*, el cual se caracteriza por tener altos efectos neurotóxicos, provocando parálisis neuromuscular a través de un modo de acción presináptico, lo que resulta en parálisis de varios músculos, incluidos los músculos respiratorios y efectos miotóxicos al inducir daño muscular generalizado [23,44]. En cambio, *C. atrox* a pesar de pertenecer al mismo género no presenta un efecto neurotóxico directo [57].

Con respecto al veneno de *Bothrocophias microphthalmus*, en Ecuador se tiene la hipótesis de que contribuye considerablemente al problema del envenenamiento por mordedura de serpiente a lo largo de la Cordillera Oriental de los Andes. Sin embargo, hasta la fecha no queda claro su relevancia epidemiológica puesto que *B. microphthalmus* y *Bothrops atrox* se encuentran de manera simpátrica en algunas áreas y a menudo es confundida por la población local. Popularmente *B. microphthalmus* se conoce como hoja

podrida [58], aunque en algunos sectores también le llaman macanchi [59]. Según un estudio con la comunidad de shamanes y curadores de Yantzaza (Zamora Chinchipe), *B. microphthalmus* es la serpiente que genera la mayor cantidad de accidentes ofídicos [59].

En este contexto, es menester recalcar que el estudio de la actividad neurotóxica es reducido en comparación a otros efectos toxicológicos. Pero, su estudio *in vitro* es fundamental para obtener información sobre el daño que puede causar el veneno en los diferentes sistemas del organismo, al conocer el mecanismo de acción de ciertas toxinas. Por otro lado, también puede ser usado para identificar posibles dianas y moléculas terapéuticas desconocidas o entender procesos evolutivos, como fue el caso de la dicotomía descrita para el género *Crotalus*.

1.2. Planteamiento del problema

El envenenamiento por mordeduras de serpientes representa un problema grave a nivel mundial, provocando entre 81 000 y 138 000 muertes por año y alrededor del triple de casos de amputación y discapacidad permanente con implicaciones sociales y económicas relevantes para los afectados [2,6]. En el Ecuador, los accidentes ocasionados por mordeduras de serpientes representan un sustancioso problema de Salud Pública, por generar efectos clínicos graves y por el impacto en las víctimas que generalmente pertenecen a un status económico bajo, especialmente en la región Amazónica, donde el número de incidencia de casos es de 55-78 mordeduras de serpiente por cada 100000 habitantes [33]. Según reportes de accidentes ofídicos, la mordedura producida por *Bothrocophias microphthalmus* (hoja podrida) se encuentra en tercer lugar en frecuencia, antecedida por *Bothrops asper* y *Bothrops atrox* [60,61].

Con respecto a las tres especies del género *Bothrocophias* que se encuentran localizadas en Ecuador, hasta la actualidad solo hay un estudio a nivel proteómico y toxicológico del veneno de una de ellas [36]. En consecuencia, no existe información que permita comprender y conocer las manifestaciones clínicas ocasionadas por su envenenamiento. Además, hay indicios de que *B. microphthalmus* puede ser confundida con *B. atrox* por la comunidad, pues le pueden denominar macanchi o también como hoja

podrida. Por otra parte, tiene una amplia distribución en Colombia, Perú, Ecuador y Bolivia y de acuerdo a modelos de nicho ecológico, es la especie que tiene mayor rango altitudinal de todo el género, lo que puede contribuir al aumento en el índice de envenenamiento por mordeduras [37,58].

También, se debe considerar que la composición del veneno influye directamente en los efectos clínicos y en la aplicación del tratamiento adecuado, por lo cual se debe tener información pre-clínica que permita conocer el efecto del mismo. Además, el estudio de toxinas neurotóxicas es fundamental para descubrir nuevos agentes moleculares y entender mecanismos relacionados con el ofidismo o patología que se relacionan con el sistema nervioso.

1.3. Justificación de la investigación

En el 2017, la Organización Mundial de la Salud volvió a catalogar al envenenamiento por mordedura de serpientes como una enfermedad tropical desatendida y de estudio prioritario. Con base en esto se estableció un plan estratégico para mitigar el daño ocasionado por el mismo [4]. Dentro de este plan se encuentran los ensayos experimentales con venenos de importancia médica, siendo el veneno de *Bothrocophias microphthalmus* parte de esta lista. Esta especie se encuentra en la categoría 2, debido a que presenta una importancia médica incierta por la falta de datos epidemiológicos o clínicos exactos y / o están implicados con menos frecuencia en casos peligrosos debido a sus ciclos de actividad, comportamiento y preferencias de hábitat. Por esto, los ensayos previos en el laboratorio son fundamentales para entender de una mejor manera tanto los efectos locales como sistemáticos inducidos por las toxinas de este veneno [2,6].

En la actualidad, solo existe un análisis parcial a nivel bioquímico y enzimático de los componentes que se encuentran en el veneno de *Bothrocophias microphthalmus*, el cual fue realizado con una serpiente de Perú y no abarca los efectos toxicológicos (miotóxico, neurotóxico, etc.) [18], siendo estos de gran importancia por la cantidad de PLA₂s que podrían estar presentes en el veneno. Por lo tanto, realizar un estudio de la especie de Ecuador servirá para llevar a cabo comparaciones de la constitución del veneno,

considerando las variaciones intra e interespecíficas que existe en los mismos. Recalcando que la composición individual de cada veneno influye directamente en las complicaciones clínicas que se presenten y en la obtención de anticuerpos para la generación de antivenenos de amplio rango, siendo esta la única terapia efectiva existente para la mordedura de serpientes en la actualidad [16–18].

Por otra parte, el análisis individual de las especies permite entender a mayor profundidad la variación existente a nivel bioquímico del veneno y las posibles causas que los generan. Entre estas destacan el área geográfica en donde habitan y los cambios que se han dado a lo largo del tiempo en la naturaleza, lo que ha hecho que se tengan que adaptar al ambiente y a una dieta específica, pues se ha visto que el efecto toxicológico del veneno varía de una presa a otra [3,60,62]. El estudio del efecto neurotóxico es muy importante considerando dichas variaciones, pues a pesar de que otras especies del género *Bothrocophias* carecen de este efecto, no se ha descartado que *B. microphthalmus* pueda tenerlo. Por ejemplo en el género *Crotalus*, *C. durissus* presenta un efecto neurotóxico, mientras que *C. atrox* tiene un efecto miotóxico [27,54,57]. En el caso de *C. simus*, sus individuos juveniles son neurotóxicos, mientras que los adultos son altamente hemorrágicos [23]. En cuanto a las implicaciones clínicas el efecto neurotóxico es el que genera una mayor complicación en el sistema fisiológico al actuar directamente en el sistema nervioso, por lo cual es primordial conocer el principal efecto tóxico a nivel individual por especie, para así aplicar un tratamiento y un antiveneno adecuado [25].

1.4. Objetivos de la investigación

Determinar el perfil bioquímico del veneno de *Bothrocophias microphthalmus*, sus actividades enzimáticas y sus posibles efectos neurotóxicos.

1.4.1. Objetivos Específicos

- Determinar la composición bioquímica del veneno de *Bothrocophias microphthalmus*.
- Caracterizar las actividades enzimáticas del veneno de *Bothrocophias microphthalmus*.

- Evaluar la actividad neurotóxica del veneno de *Bothrocophias microphthalmus* en modelos animales.

Capítulo II: Marco metodológico.

2.1. Veneno

El veneno liofilizado se obtuvo del Centro de Investigación de la Biodiversidad y Cambio Climático (BioCamb) de la Universidad Tecnológica Indoamérica, el cual fue extraído de un individuo adulto que se encontraba en su ambiente natural en el Parque Nacional Podocarpus-Zamora Chinchipe (-4.133359, -78.98547). El permiso para colecta fue autorizado por el Ministerio del Ambiente a través del contrato MAE-DNB-CM-2019-0115, con el registro N° 6549 en el folio 411.

2.2. Perfil bioquímico

2.2.1. Fraccionamiento del veneno

El fraccionamiento de las proteínas del veneno, se realizó por RP-HPLC (Cromatografía líquida de alta eficiencia en fase reversa, PREP 150 LC, Waters). Para la preparación de la muestra, se disolvieron 2 mg de veneno de *B. microphthalmus* liofilizado en 120 µl de ácido trifluoroacético al 0,1% y 80 µl de bicarbonato de amonio 1M, los cuales posteriormente fueron homogenizados usando vortex por dos minutos. A continuación, a temperatura ambiente se centrifugó (D320, DLAB) la muestra durante 3 minutos a 8000 rpm. Posteriormente, para la separación se inyectaron 200 µl de muestra en el equipo (PREP 150 LC, Waters), la misma que fue monitoreada a 214 nm por 90 minutos con un flujo de 1ml / min. Se utilizó una columna C18 (250 × 4 mm, tamaño de partícula de 5 µm) con un gradiente lineal de 0 a 100% de disolvente B (66% (v / v) acetonitrilo, 0,1% (v / v) TFA).

2.2.2. Electroforesis

La electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE) se realizó en una cámara vertical (P8DS, Thermo Scientific™) en condiciones reductoras (en presencia de DTT) a 120 V y temperatura ambiente de acuerdo a lo descrito por Laemmli [63], a fin de

conocer las principales familias de toxinas de este veneno. Para esto se disolvió 100 µg de veneno total en 100 µl de buffer de carga (0.075 M Tris-HCl, pH 6.8, 10% (v:v) glicerol, 4% (m:s) SDS, 0.001% (m/v) de azul de bromofenol). Cabe mencionar que para realizar una comparación se utilizaron los venenos de *Bothrops atrox* (de dos diferentes localidades), *Lachesis muta*, *Crotalus oreganus* y *Crotalus cerberus*. Las muestras fueron separadas utilizando un gel de apilamiento con concentración del 5% (2 ml Bis-acrilamida; 1,5 ml Tris-HCl 0,5 M 6,8 pH; 7,5 ml Agua; 60 µl SDS 20%; 90 µl PSA y 20 µl TEMED) y gel de corrida con concentración del 12,5% (7.18 ml Bis-acrilamida; 6,44 ml Tris-HCl 0,5 M 8,8 pH; 3,68 ml Agua; 86 µl SDS 20%; 57,5 µl PSA y 11,5 µl TEMED). Los marcadores moleculares (Rainbow™ Molecular Weight Markers, GE Healthcare) fueron utilizados como referencia para la identificación de las bandas de proteínas veneno. Para visualizar las bandas de proteínas, se tiñó el gel con 0,2% (p:v) de azul de Coomassie R-250 y el exceso de colorante se eliminó con una solución de ácido acético al 7% (v: v), todo esto se realizó de acuerdo al protocolo básico 1, descrito en [64]. La imagen del gel fue obtenida por una fotografía realizada con una cámara del celular de 48 megapíxeles.

2.3. Caracterización de la actividad enzimática

Los ensayos enzimáticos se realizaron empleando el lector de placas GloMax®, para cada ensayo se llevaron a cabo 3 repeticiones y los resultados obtenidos corresponden a la media de las tres repeticiones en valores de absorbancia (AU). Se utilizó el veneno de *Bothrops atrox* para hacer una comparación en cada ensayo enzimático.

2.3.1. Actividad proteolítica

La actividad proteolítica se realizó de acuerdo a la metodología de Lomonte y Gutierrez [65], utilizando a la azocaseína como sustrato colorimétrico. Las muestras de los venenos de *Bothrocophias microphthalmus* y *Bothrops atrox* se diluyeron por separado en buffer de Tris-HCl 50 mM, con una concentración de 1 mg/ml. El sustrato se preparó disolviendo 5 mg de azocaseína (Sigma-Aldrich) en un 1 ml de buffer Tris-HCl 50 mM, pH 8,0. Posteriormente, la reacción enzimática se preparó adicionando 10 µl de veneno (1 mg / ml) y 90 µl de sustrato en tubos de 1,5 ml por triplicado e incubado a 37 °C durante 90

minutos, se utilizó un blanco con 10 µl de buffer en 90 µl de sustrato. Este procedimiento se llevó a cabo para cada veneno. Después, se adicionaron 200 µl de ácido trifluoroacético al 5% a cada muestra para parar la reacción. Luego, las muestras fueron centrifugadas (D320, DLAB) durante 5 min a 8000 rpm. Finalmente, el sobrenadante de cada tubo se colocó en una microplaca de 96 pocillos, donde se mezcló con 150 µl de NaOH 0,5 M. La absorbancia fue medida a 440 nm en el lector de placas. Se utilizó el blanco para la corrección de las absorbancias.

2.3.2. Actividad serinoproteasa (SVSP)

La actividad serinoproteasa se determinó siguiendo un procedimiento similar al descrito por Ghorbanpur y colaboradores [66]. Las muestras de los venenos se disolvieron individualmente en el buffer A (Tris-HCl 10 mM, CaCl₂ 1 M, NaCl 10 mM, pH 7,8), con una concentración de 1 mg/ml. El sustrato utilizado fue benzoil-arginil-p-nitroanilida (L-BapNa) (Sigma-Aldrich), del cual 2,18 mg se diluyeron en 50 µl de dimetil sulfóxido con 5ml de buffer A. Para que se genere la reacción enzimática se mezcló en una microplaca de 96 pocillos, 20 µl de veneno con 200 µl de sustrato y 50 µl de buffer A. Se utilizó un blanco formado por 200 µl de sustrato y 70 µl de buffer A, para corregir valores de absorbancia. Luego de 30 minutos de incubación a 37 °C, se midió la reacción a 410 nm por el lector de placas.

2.3.3. Actividad fosfolipasa (PLA₂)

Para medir esta actividad se utilizó ácido 4-nitro-3 [octanoiloxi] benzoico (NOBA) como sustrato de acuerdo a lo descrito por Holzer y Mackessy [56], con modificaciones de Resende et al [16]. Para preparar las muestras, 1 mg de cada veneno se disolvió en 1 ml NaCl 0,15 M. En la preparación del sustrato se diluyeron 3,1 mg de NOBA en 1 ml de acetonitrilo y 10 ml de buffer A. La reacción enzimática se generó al mezclar en una microplaca de 96 pocillos, 20 µl de veneno con 20 µl de agua destilada y 220 µl de sustrato. La actividad PLA₂ fue determinada después de 20 min de incubación a 37 °C, con una lectura de las absorbancias a 425 nm con el lector de placas. Se utilizó un blanco con 200 µl de solución de sustrato y 40 µl de agua destilada para las correcciones de las absorbancias.

2.4. Actividad Neurotóxica

2.4.1. Animales

Para las pruebas de neurotoxicidad se utilizaron ratones Swiss machos (25-30 g) y polluelos HY-Line W36 (4 a 8 días de edad), los cuales fueron proporcionados por el Centro Multidisciplinario de Investigación Biológica (CEMIB) y Flamboyant Alimentos S / A (Mogi Mirim, SP, Brasil). Los animales se mantuvieron a 24-28 °C con comida y agua a voluntad.

Todos estos experimentos se realizaron en Brasil, en colaboración con el PhD. Raphael Scherazo de la Facultad de Farmacología de la Universidad Estatal de Campinas (UNICAMP), Brasil. La metodología experimental siguió las directrices y lineamientos del Comité de Ética para Experimentación Animal de esta institución (CEUA / UNICAMP, Protocolo 3712-1).

2.4.2. Preparación del nervio frénico de diafragma de ratón

En primera instancia los ratones fueron sometidos a eutanasia. La preparación fue realizada de acuerdo con la técnica descrita por Bulbring [67]. El diafragma con los nervios frénicos fue retirado del ratón y colocados bajo una tensión en reposo de 1 g en un sistema de baño de tejidos para 5 ml, el mismo que tenía solución Tyrode, compuesta por: NaCl 137,0 mM, KCl 2,7 mM, CaCl₂ 1,8 mM, MgCl₂ 0,49 mM, NaH₂PO₄ 0,42 mM, NaHCO₃ 11,9 mM y glucosa 11,1 mM. La solución se burbujeó constantemente con carbógeno (95% de O₂ y 5% de CO₂) y se mantuvo a 37 °C. Los estímulos supramaximales (0,1 Hz y 0,2 ms para estimulación indirecta) se administraron desde un estimulador Grass S88 (Grass Instrument Co., Quincy, MA, EE. UU). Para registrar la tensión muscular isométrica se usó un transductor de fuerza modelo MLT0201 de 5 mg - 25 g (Panlab sl, AD Instruments Pty Ltd. España), conectado a un PowerLab / 4SP (Quad Bridge AD Instruments, Barcelona, España). Después de 20 minutos de estabilización, se añadieron a las preparaciones diferentes cantidades del veneno de *B. microphthalmus* (10, 30, 100 y 300 µg/ml), por 120 min y las contracciones fueron registradas y comparadas con el control que era la solución Tyrode. Después se realizó un lavado de la preparación para ver si existe una reversión y se midió

nuevamente las contracciones.

2.4.3. Preparación del nervio del músculo *biventer cervicis* de pollo

Las preparaciones del nervio del músculo *biventer cervicis* de pollo se realizaron de acuerdo a lo descrito por Ginsborg y Warriner [68]. Para esto, en primer lugar los pollos fueron sometidos a eutanasia y las preparaciones del nervio del músculo *biventer cervicis* se aislaron y se montaron bajo una tensión en reposo de 1 g en un sistema de baño de tejido de 5 ml (baño múltiple de órganos automático LE01, Letica Scientific Instruments Barcelona, España) con solución de Krebs, la cual estaba compuesta por: NaCl, 118,7 mM; KCl mM, 4,69 mM; CaCl₂, 1,88 mM; KH₂PO₄, 1,17; MgSO₄, 1,17; NaHCO₃ 25,0 y C₆H₁₂O₆ 11,65 mM. La solución se burbujeó constantemente con carbógeno (95% O₂ y 5% CO₂) y se la mantuvo a 37 ° C. Las preparaciones se estimularon a través de electrodos bipolares (estimulación de campo) y se aplicaron pulsos supramaximales de frecuencia de 0,1 Hz y 0,2 ms con el estimulador Grass S88 (Grass Instrument Co., Quincy, MA, EUA). Las contracciones musculares máximas provocadas por los estímulos eléctricos y en respuesta a la adición de KCl (40 mM), carbachol (20 µM) y ACh (1 mM) fueron registradas con transductores isométricos (Modelo MLT0201 Transductor de fuerza 5 mg - 25 g Panlab sl, AD Instruments Pty Ltd. España) conectado a un PowerLab / 4SP (Quad Bridge AD Instruments, Barcelona, España). Las contracciones por CCh, KCl y ACh se monitorearon y registraron antes de la adición del veneno completo (ausencia de estimulación eléctrica), durante y después de una incubación de 120 minutos con diferentes cantidades de veneno de *B. microphthalmus* (3, 10, 30 y 100 µg/ml). Después se realizó un lavado de la preparación para ver si existe una reversión y se midió nuevamente las contracciones.

2.5. Análisis estadístico

Para el tratamiento de resultados se aplicó un análisis de varianza (ANOVA) OneWay seguido del test Tukey con un nivel de significancia de $p \leq 0.05$. En el caso de los ensayos enzimáticos se utilizó el programa OriginLab, mientras que para los ensayos de neurotoxicidad se utilizó el programa GraphPad Prism 6.

Capítulo III: Presentación de datos y resultados

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

La caracterización del perfil bioquímico de *B. microphthalmus* por electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) (Figura 2) se realizó en conjunto con los venenos de otras serpientes pertenecientes a la familia Viperidae, con la finalidad de realizar una comparación general en cuanto a los patrones de bandas de proteínas características de cada veneno. Los patrones de bandas permiten caracterizar los diferentes venenos como fuente de proteínas de diferente peso molecular. Para todos los venenos, las bandas asociadas con pesos moleculares (medidos en kilodaltons (kDa)) típicos de las principales familias de toxinas fueron identificadas. En el fraccionamiento del veneno de *B. microphthalmus* se observaron bandas marcadas de proteínas entre los rangos de 13-17 kDa (PLA₂), 20-25kDa (PI-SVMP), 31-45 kDa (SVSP) y 48 -65 kDa (PIII-SVMP), coincidiendo con datos proteómicos previos que revelan que venenos de serpientes de este género presentan una mayor cantidad de estas toxinas. En resumen, tomando en cuenta las masas, el veneno de *B. microphthalmus* es típicamente digestivo con alta presencia de SVMPs. Estas toxinas presentan bandas más intensas al ser comparadas con SVSPs y PLA₂s.

Por otra parte, la comparación del patrón del veneno de *B. microphthalmus* con las bandas de proteínas de las otras especies, evidencia diferencias notables sugiriendo una variación interespecífica entre muestras. Sin embargo, se puede establecer una similitud con el patrón de bandas de proteínas correspondientes a los venenos de *Bothrops atrox*, las cuales se encuentran en los rangos de 13-17kDa, 21-25kDa, 31-35 kDa y 49-71kDa. En el veneno de *B. atrox* a diferencia de *B. microphthalmus*, se encuentran bandas más notorias en los rangos de 13-17kDa (PLA₂) y de 28-35kDa (SVSP), lo cual sugiere que *B. atrox* podría tener una mayor cantidad y/o diversidad de estas toxinas en su veneno.

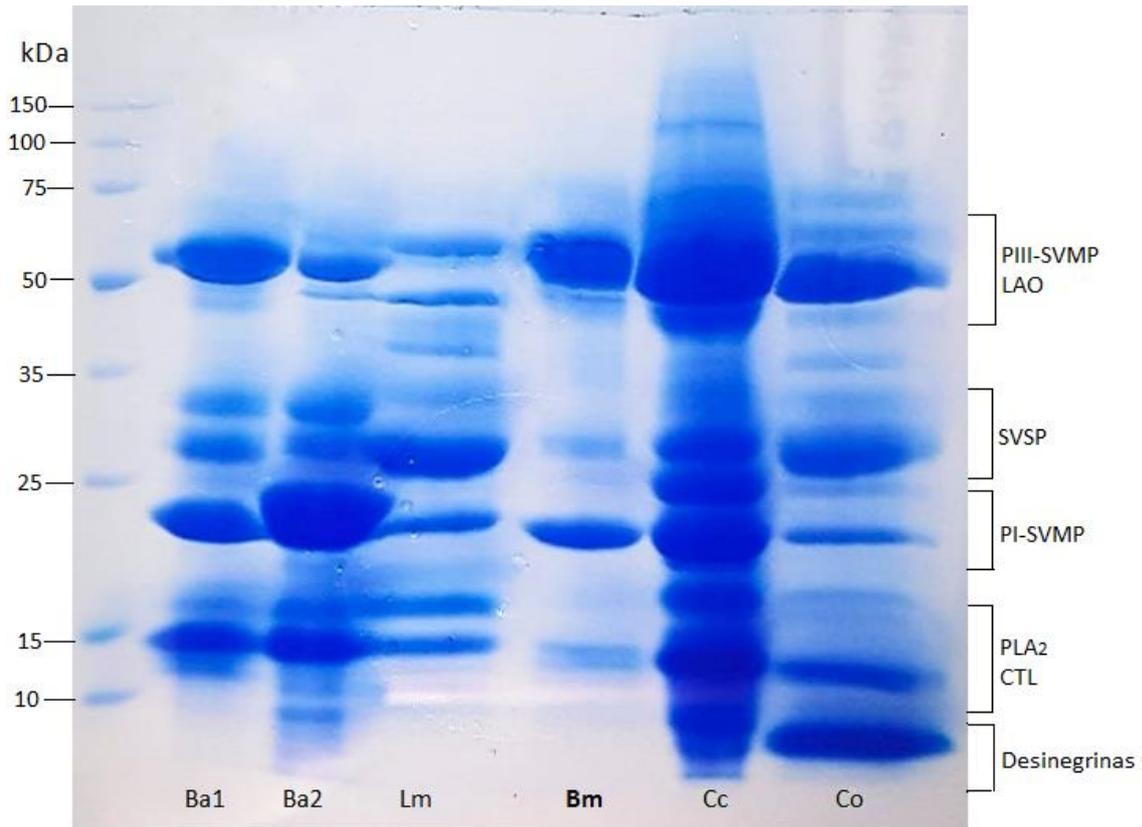


Figura 2. Gel de electroforesis en poliacrilamida (SDS-PAGE) de venenos totales. Ba: *Bothrops atrox*; Lm: *Lachesis muta*; Bm: *Bothrocophias microphthalmus*; Cc: *Crotalus cerberus*; Co: *Crotalus oreganus*. Al lado izquierdo se encuentra el peso de acuerdo al marcador molecular utilizado, mientras que al lado derecho se encuentran los rangos asociados a las familias de proteínas más abundantes en los venenos de serpientes, **PLA₂** : Fosfolipasas II; **CTL**: Lectinas tipo C; **PI-SVMP**: metaloproteinasas tipo PI; **SVSP**: serinproteasas; **PIII-SVMP**: metaloproteinasas tipo PIII; **LAO**: L-amino oxidasa.

En cuanto al perfil cromatográfico (Figura 3), se puede visualizar que existen 53 picos, de entre los cuales los que tienen mayor absorbancia se forman a partir de los 30 minutos de fraccionamiento, tiempo característico de elución de PLA₂s y SVSP_s. Por otro lado, aproximándose a los 50 minutos eluyen las SVMP (PI y PIII), en concordancia con lo observado previamente en el gel de electroforesis del veneno de *B. microphthalmus*.

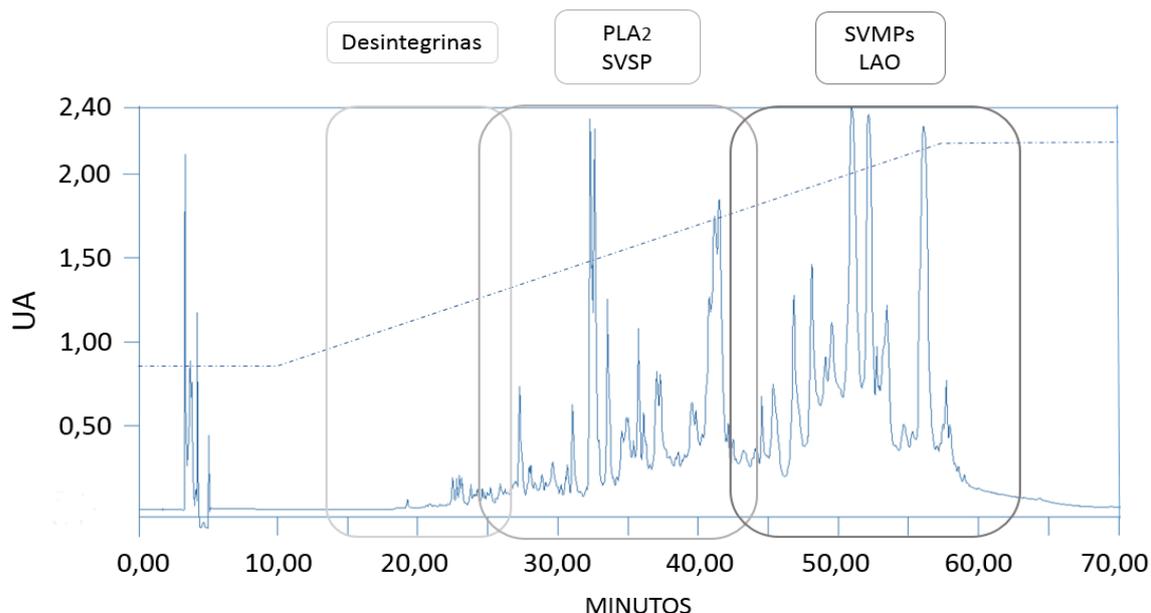


Figura 3. Perfil cromatográfico del veneno de *Bothrocophias microphthalmus*. El fraccionamiento se realizó por RP-HPLC, eluyendo 1ml/min y monitoreado a 214 nm. La línea entrecortada corresponde al gradiente de los solventes, ácido trifluoroacético al 0,1% y acetonitrilo y TFA 0.1% en una relación 66:34. Los recuadros indican las regiones donde generalmente eluyen las principales toxinas del veneno.

3.2. Caracterización de la actividad enzimática

La evaluación de la actividad enzimática de toxinas del veneno de *B. microphthalmus* (Bm), es representada en la Figura 4. Con fines comparativos la capacidad catalítica de *B. microphthalmus* se evaluó junto a la actividad de *B. atrox* (Ba1, Ba2), los mismos que se encuentran en el primer y segundo carril del gel de electroforesis (Figura 2). Ninguna diferencia significativa con respecto a la actividad proteolítica entre los venenos fue evidenciada por el ensayo cuantitativo, que señala una similar degradación del sustrato entre Bm y Ba. En cuanto a la actividad serinproteasa sí se observó una diferencia significativa entre las muestras, pues el veneno de Bm presenta un mayor efecto sobre el sustrato L-BapNa, comparado con Ba1 y Ba2. Por otro lado, en la actividad fosfolipasa medida sobre el sustrato NOBA, se puede observar que existe una diferencia significativa, siendo Bm el que tiene un menor efecto en comparación a Ba1 y Ba2.

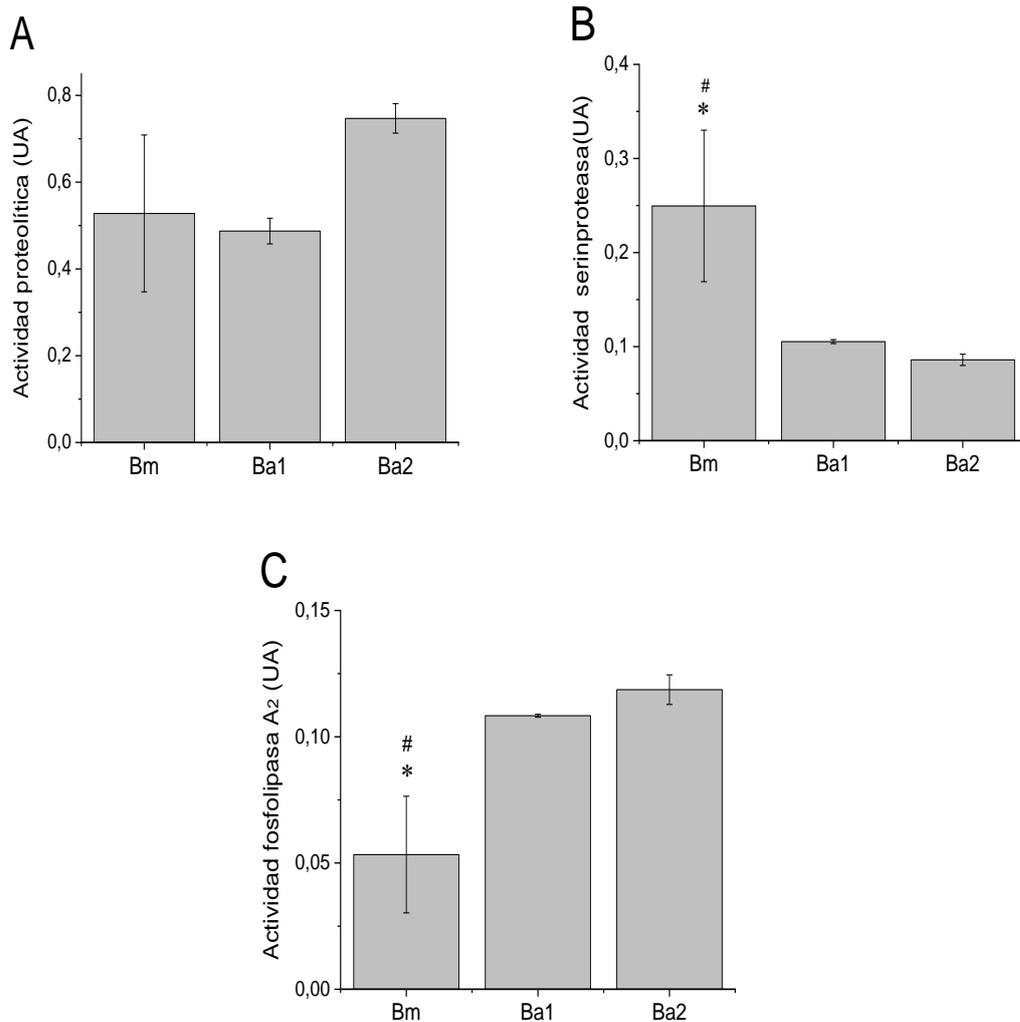


Figura 4. Caracterización enzimática de los venenos de *Bothrocophias microphthalmus* (Bm) y *Bothrops atrox* (Ba1, Ba2). A. Actividad proteolítica, B. Actividad serinproteasa, C. Actividad fosfolipasa A₂. Existe una diferencia significativa entre los venenos de *B. microphthalmus* y *B. atrox* ($p < 0.05$) por el test de Tukey para los ensayos B y C, mientras que para el ensayo A no existe una diferencia significativa ($p > 0.05$). (*) Diferencia con Ba1, (#) Diferencia con Ba2.

3.3. Actividad Neurotóxica

3.3.1 Actividad en las preparaciones del diafragma frénico de ratón (DFR).

Las concentraciones del veneno de *B. microphthalmus* evaluadas, después de 120 min de incubación con las preparaciones del diafragma frénico de ratón, produjeron diferentes proporciones de bloqueo neuromuscular en las mismas. (Figura 5.A). La concentración de 10 µg/ml de veneno no generó ningún efecto neuromuscular con respecto al control. Mientras que con 30 µg/ml y 100 µg/ml hubo una disminución de la

contracción muscular de $25.2 \pm 8.0 \%$ y $27.1 \pm 4.5 \%$ respectivamente. Con $300 \mu\text{g/ml}$ que fue la mayor concentración utilizada, se produjo el mayor efecto, generando un bloqueo del $67.9 \pm 5.4 \%$ de la contracción muscular. Todos los efectos producidos fueron típicamente irreversibles, puesto que al realizar un lavado posterior a los 120 min a todas las preparaciones no se observó una recuperación significativa en la tensión muscular (Figura 5.B). Los mismos valores pueden ser observados antes y después del lavado.

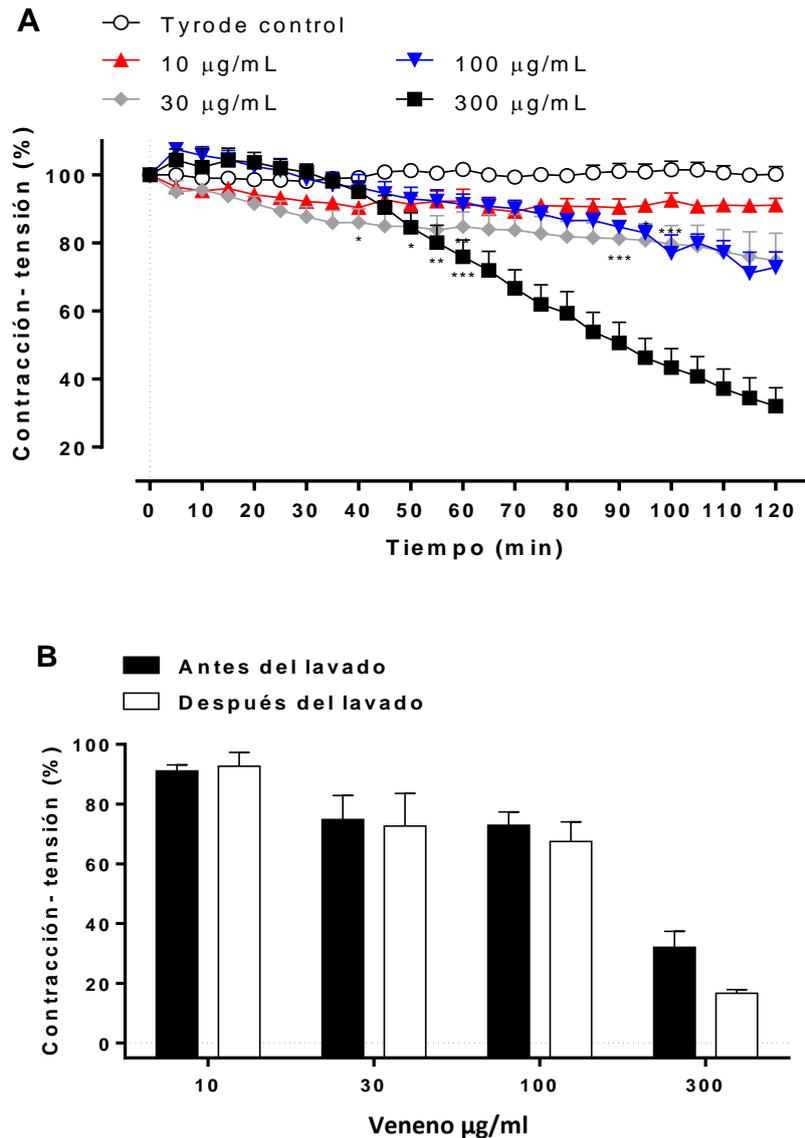
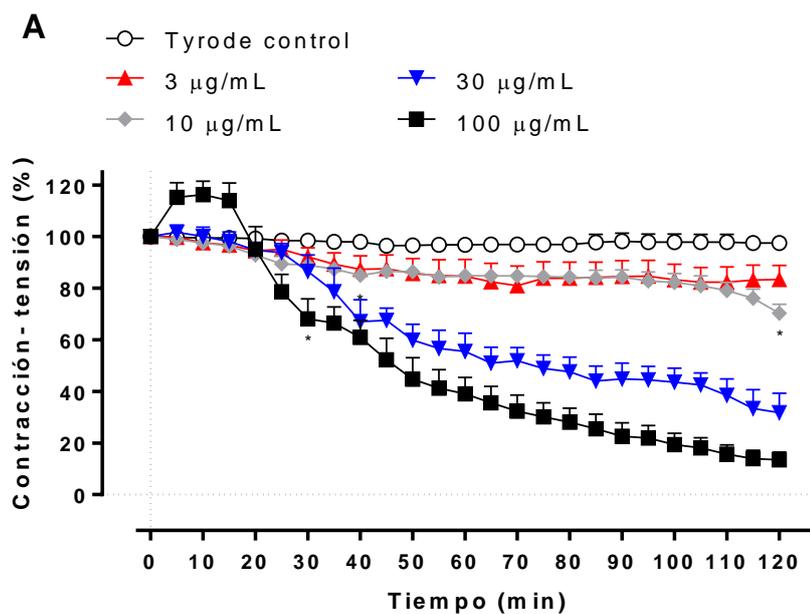


Figura 5. Actividad neurotóxica del veneno de *B. microphthalmus* sobre el nervio frénico-diafragma del ratón. A. Respuesta con respecto a la contracción (%) después de la incubación de 120 minutos con solución Tyrode (control) y diferentes concentraciones de veneno (10, 30, 100 y 300 $\mu\text{g/ml}$). Cada punto representa la media \pm SEM. En comparación con el control, en 10 $\mu\text{g/mL}$ sin diferencia significativa, con 30 $\mu\text{g/mL}$ (* $p < 0.05$ a partir de 45 minutos; ** $p < 0.01$ a partir de 60 minutos; *** $p < 0.001$ a partir de 90 minutos), 100 $\mu\text{g/mL}$ (* $p < 0.05$ a partir de 95 minutos; $p < 0.001$ a partir de 100 minutos), 300 $\mu\text{g/mL}$ (* $p < 0.05$ a partir de 50 minutos; ** $p < 0.01$ a partir de 55 minutos; *** $p < 0.001$ a partir de 60 minutos). **B.** Lavado con solución Tyrode después de la incubación con las diferentes cantidades de veneno.

3.3.2 Actividad en las preparaciones de *biventer cervicis* de pollo (BCP)

En las preparaciones de *biventer cervicis* de pollo, la concentración máxima probada del veneno de *B. microphthlmus* que fue de 100 $\mu\text{g/ml}$ redujo $86.5 \pm 3.0 \%$ la contracción muscular después de 120 min de incubación. Mientras que para la concentración de 3 $\mu\text{g/ml}$ de veneno no hubo ningún efecto neuromuscular significativo con respecto al control. En cuanto a los 10 $\mu\text{g/ml}$ y 30 $\mu\text{g/ml}$ de concentración, hubo una disminución de la contracción muscular del $29.7 \pm 3.5 \%$ y $68.3 \pm 7.6 \%$ respectivamente. Similar a lo observado en las preparaciones de ratón, el veneno ocasionó un efecto irreversible (Figura 6.B). A pesar de que con una baja concentración no existe el efecto neurotóxico, se observa que con la concentración de 30 y 100 $\mu\text{g/ml}$, si se produce un efecto neurotóxico, en la preparación BCP y en el DFR, siendo el primero más susceptible al veneno.



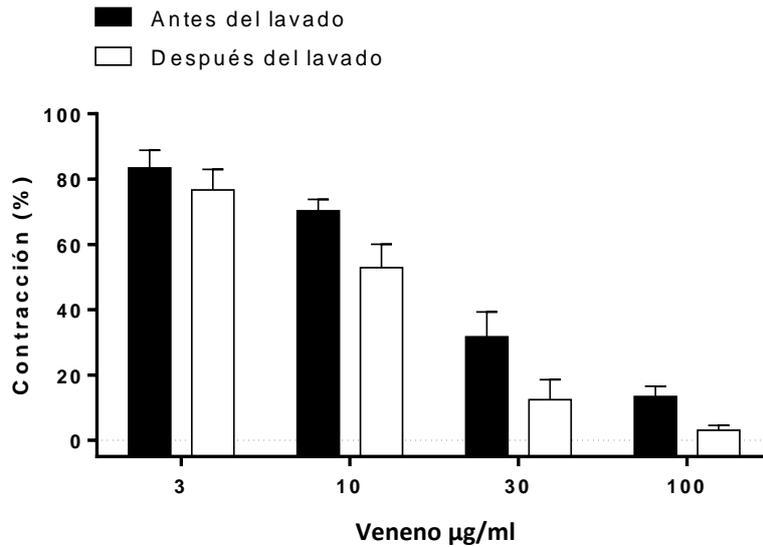
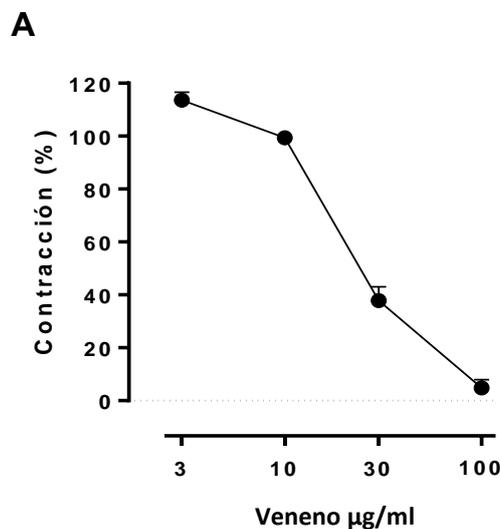


Figura 6. Actividad neurotóxica del veneno de *B. microphthalmus* sobre el nervio del músculo *biventer cervicis* de pollo. A. Respuesta con respecto a la contracción (%) después de la incubación de 120 minutos con solución Krebs (control) y diferentes concentraciones de veneno (3, 10, 30 y 100 mg/ml). En comparación con el control (Solución Tyrode) con 3 ug/mL sin diferencia significativa, con 10 ug/mL (* $p < 0.05$ a partir de 120 minutos), 30 ug/mL (* $p < 0.05$ a partir de 40 minutos), 100 ug/mL (* $p < 0.05$ a partir de 30 minutos). **B.** Lavado con solución Tyrode después de la incubación con las diferentes cantidades de veneno. Sin ninguna diferencia significativa.

Con respecto a la respuesta a la contracción producida por acetilcolina, carbacol y cloruro de potasio, se puede observar que todos muestran una respuesta a estos estímulos generando una contracción inicial alta con una baja cantidad de veneno (10 µg/ml). Por otro lado, con altas cantidades de veneno (100 µg /ml) ya no se da una respuesta, generando un bloqueo neuromuscular total, sin una reacción inicial (Figura 7).



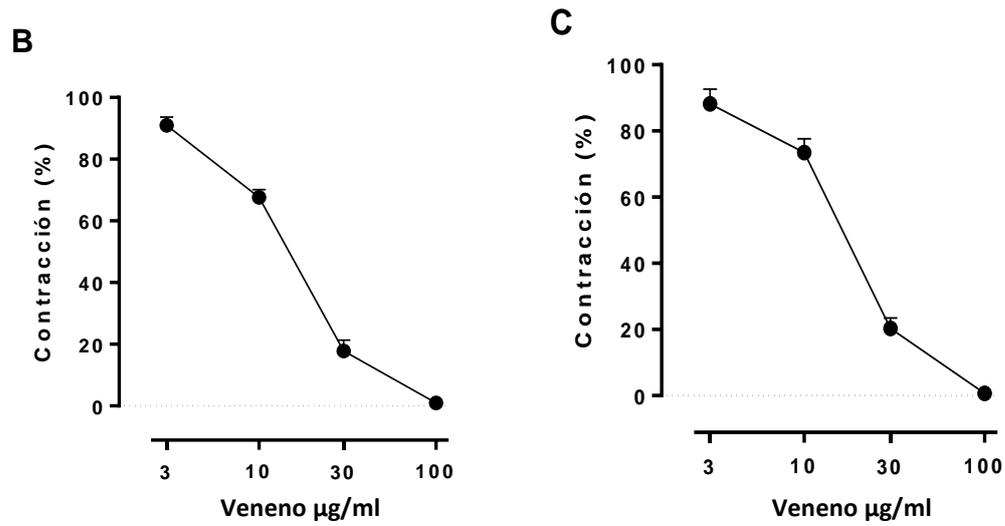


Figura 7. Efecto en la contracción del músculo *biventer cervis* incubado con veneno de *B. microphthalmus* (3, 10,30, 100 $\mu\text{g} / \text{ml}$) en respuesta a acetilcolina (ACh) (A) 1 mM, carbacol (CCh) (B) 20 μM y KCl (C) 40 mM. Cada punto representa la media \pm SEM de la contractura después de la incubación con veneno en comparación con la contractura antes de la incubación.

Capítulo IV: Interpretación y discusión.

La caracterización bioquímica de los venenos a nivel individual permite conocer la composición de esta mezcla compleja y entender los posibles efectos fisiológicos que desencadenaría en una víctima de mordedura. En conjunto, este conocimiento es particularmente la base general para comprender estudios preclínicos de la eficiencia de antivenenos y la formulación de nuevos tratamientos [6,69]. En Ecuador existe escasa información acerca del envenenamiento por *B. microphthalmus* y de la composición de su veneno, lo cual es muy importante considerando que puede ser confundida con *B. atrox* [58]. Debido a esta problemática, se realizó la caracterización bioquímica inicial del veneno y la evaluación de sus posibles efectos neurotóxicos.

El gel de electroforesis señala la variación en cuanto a composición, número e intensidad de bandas de proteínas entre los venenos. Las toxinas presentes en cada uno de ellos tienen un peso molecular comprendido en el rango de 13 y 65 kDa. Las bandas más marcadas corresponden a las familias de proteínas características de los vipéridos: fosfolipasas (PLA₂), metaloproteinasas del tipo I (SVMP-PI), metaloproteinasas del tipo III (SVMP-P III) y serinproteasas (SVSP) [1,2,44]. Este resultado está en concordancia con otras investigaciones que en líneas generales han demostrado que la composición de los venenos de vipéridos se conserva ampliamente en términos de familias de proteínas [70,71].

B. microphthalmus posee un patrón de bandas similar a *B. atrox* en cuanto a intensidad en el rango donde se encuentran las SVMP-PI y SVMPIII. Estas similitudes pueden deberse a que *B. microphthalmus* es una especie muy cercana en cuanto a filogenia a *B. atrox* y por lo tanto comparten características. Según varios estudios las metaloproteinasas son las enzimas que más abundan en los proteomas de los vipéridos [13,15,71]. Por otro lado, en cuanto a la comparación con *Lachesis muta* y *Crotalus oreganus*, estas últimas poseen bandas más marcadas en el rango donde se encuentran las serinproteasas (SVSP) y metaloproteinasas tipo I y tipo III, lo cual es consistente con estudios en donde se ha descrito la composición bioquímica de estas especies, siendo estas dos toxinas las que se encuentran en mayor proporción [72,73]. Además, de acuerdo a análisis filogenéticos, son especies que se encuentran en clados más lejanos a

B. microphthalmus [35,74].

El perfil electroforético de *B. microphthalmus* realizado en el presente estudio evidenció un patrón de bandas muy similar al veneno de *B. microphthalmus* de Perú, realizado en la investigación de Lomonte et al., [75]. El veneno de Perú presenta bandas marcadas en el rango en donde generalmente se encuentran las SVMP-PI y SVMP-PIII al igual que el veneno de Ecuador, sin embargo, se puede evidenciar una diferencia en las bandas correspondientes a fosfolipasas. Adicionalmente, estos autores a pesar de identificar fosfolipasas A₂ en este veneno, sugieren que estas son menos abundantes en comparación a las que están presentes en otras especies de este género.

De acuerdo a los tiempos de elución determinados en otros estudios se ha identificado que las primeras fracciones en eluir generalmente corresponden a las desintegrinas y lectinas tipo C, seguidas de fosfolipasas, serinproteasas y al final las metaloproteasas tipo I y tipo III [14,24]. Con referencia a ello, se podría sugerir que el veneno de *B. microphthalmus* de Ecuador, posee probablemente una cantidad significativa de desintegrinas, lectinas tipo C, fosfolipasas y serinproteasas en su composición. Este resultado sugiere una variación geográfica que debe ser evaluada en estudios posteriores [60,76,77].

Existen otras investigaciones con el veneno de serpientes del mismo género: *B. myersi* [18], *B. campbelli* [18], *B. hyoprora* [75] y *B. andinus* [75]. Al comparar el perfil cromatográfico de *B. microphthalmus* con las mismas, se identifican diferencias notables en todo el cromatograma, principalmente en la cantidad de picos en donde eluyen las fosfolipasas, serinproteasas y metaloproteinasas, siendo *B. microphthalmus* la que tiene mayor cantidad. Este comportamiento es similar a lo reportado en otras investigaciones donde se indica que la diferencia entre especies de un mismo género generalmente se da en la variación en cuanto a proporción de las familias de proteínas y por la presencia o ausencia de proteínas individuales que pueden tener un fuerte efecto tóxico en particular sobre su presa [13,78,79]. Las variaciones existentes tanto a nivel interespecífico como intraespecífico se deben a la historia evolutiva contingente y la selección funcional directa de acuerdo a la zona geográfica en donde se encuentra la especie, cambios ontogénicos,

dieta, género, entre otros [2,22,23,76,80], generando una divergencia total en cuanto a la composición venómica y la proporción de las familias de proteínas.

En el veneno de vipéridos las familias de toxinas que mayormente generan los efectos tóxicos son las fosfolipasas, metaloproteinasas y serinproteasas [16,18,36,51,75]. Por lo cual, es importante determinar su actividad enzimática en el veneno de *B. microphthalmus*. Los resultados fueron comparados con *B. atrox*, por presentar una mayor similitud en cuanto al patrón de bandas. Adicionalmente, esta comparación es importante teniendo en cuenta que la identificación de ambas especies puede generar confusión y debido a que *B. atrox* es responsable por un alto número de mordeduras en el país, principalmente en la región Amazónica [20,29].

Con respecto a su actividad proteolítica, de acuerdo a los resultados de este estudio se puede determinar que no existe una diferencia significativa al comparar con la actividad ejercida por las enzimas de *B. atrox*. En virtud de esto, se alude que los efectos fisiológicos que generalmente son hemorragia y necrosis [18,23], pueden ser similares entre las dos especies. Si bien el sustrato utilizado es general y puede reaccionar también con serinproteasas, tiene una mayor especificidad para metaloproteinasas [81]. Sin embargo, este resultado no se puede generalizar por la complejidad de toxinas que presentan los venenos, estos ensayos necesitan ser evaluados *in vivo* para poder determinar si el efecto *in vitro* puede ser directamente correlacionado con el efecto biológico. En cuanto a la actividad serinproteasa se puede notar que *B. microphthalmus* presenta una mayor reacción sobre el sustrato cromogénico L-BapNa en comparación al de *B. atrox* por lo cual se podría inferir que su mordedura puede generar un mayor efecto en el sistema de coagulación sanguínea, pues estas enzimas activan las plaquetas y actúan directamente sobre el fibrinógeno [82].

Con respecto a la actividad fosfolipasa *B. microphthalmus* presenta una menor actividad catalítica que *B. atrox*, por lo cual su veneno posiblemente desencadenará un menor efecto miotóxico [45]. Sin embargo, se debe considerar la presencia de las isoformas miotóxicas PLAs2 Lys49 [46,83], las cuales son catalíticamente inactivas, por lo que su actividad no se refleja en los ensayos enzimáticos [45,46,83]. En el perfil cromatográfico se

observa que existe una mayor cantidad de picos entre los 40 y 50 minutos, y este es generalmente es el tiempo de elución de las fosfolipasas Lys 49 (catalíticamente inactivas). Esto sugiere que el proteoma de *B. microphthalmus* tendría una alta cantidad de fosfolipasas del tipo Lys 49, como es el caso de *Bothrocophias campbelli* donde estas isoenzimas representan el 42% del venoma de la especie[18]. Sin embargo, para determinar si el efecto biológico es similar a lo observado con el sustrato cromogénico, se deben realizar ensayos con modelos animales [33,46,82].

Teniendo en cuenta que algunas especies pertenecientes a la familia Viperidae presentan actividad neurotóxica *in vitro* e *in vivo*, y la dicotomía presentada por algunos géneros como *Crotalus*, el estudio de la neurotoxicidad poco explorado puede revelar aspectos evolutivos o mecanismo de acción de toxinas todavía desconocidas y de gran interés [23,27,55]. Motivado por esto, se realizó ensayos para medir dicha actividad en el diafragma frénico de ratón (DFR) y en el músculo *Biventer cervis* de pollo (BCP). Los datos *in vitro* indican de manera general un efecto dosis-dependiente. En bajas concentraciones de veneno (3 µg/ml en BCP; 10 µg/ml en DFP) no se presenta ningún efecto significativo en la contracción muscular al comparar con el control. No obstante, a medida que se incrementa la concentración, la contracción muscular disminuye, presentándose un bloqueo neuromuscular de aproximadamente 70 % con 300 µg/ml en DFR y 90 % con 100µg/ml en BCP a los 120 minutos de exposición. Adicionalmente, se evidenció que la preparación de BCP es más susceptible al veneno de *B. microphthalmus* que la preparación del DFR, puesto que para que se dé un 50 % de bloqueo neuromuscular se necesitó 300 µg/ml para DFR a los 90 min de exposición, mientras que para BCP se necesitó solamente 30 µg/ml a los 65 min de exposición. Este comportamiento es similar a lo observado en otros estudios, por ejemplo al evaluar el veneno de *Lachesis muta muta*, se obtuvo que con 100 µg/ml de veneno se generó un bloqueo neuromuscular total a los 100 minutos en el DFR, mientras que para BCP una dosis of 10 µg/ml generó el bloqueo total a los 50 min [84]. Así mismo, en la evaluación del veneno de *Crotalus atrox*, 100 µg/ml generó un bloqueo del 50 % de la contracción muscular a los 120 min de exposición, mientras que para BCP ese mismo efecto se realizó con una dosis de 30 µg/ml a los 90 min de exposición [57]. Así mismo, al comparar con especies del género *Bothrops*, se puede observar que *B. microphthalmus* genera un mayor bloqueo muscular en BCP [85] . Hasta la actualidad no

se conoce con exactitud por qué ocurre este fenómeno, pero se ha demostrado que hay mucha variación en cuanto a sensibilidad al veneno en los diferentes animales, donde generalmente las aves tienen una alta sensibilidad y algunos roedores han generado cierta resistencia [62].

Estas variaciones han sido apoyadas por estudios en donde se manifiesta una estrecha relación entre la dieta preferencial de la serpiente y el desarrollo de moléculas que generen un efecto tóxico en las mismas, siendo este en algunas ocasiones específico para la presa [3,5]. Por ende, se ha establecido que la dieta es una de las causas de la variación en cuanto a la composición del veneno [5,86]. Sin embargo, de acuerdo a otra investigación se ha determinado que no se puede ratificar esta relación directa entre la composición del veneno con la dieta, pues al evaluar a cuatro especies de *Bothriechis*, la cuales tenían hábitos arbóreos y dietas similares, su composición resultó totalmente diferente entre las mismas, concluyendo que los distintos componentes del veneno podrían tener una función similar a pesar de tener diferentes estrategias para lograr un mismo objetivo trófico [17,70].

Ahora bien, considerando que el efecto neurotóxico en los dos modelos animales se produce al ser expuestos a altas cantidades de veneno, se puede decir que el efecto principal no es la neurotoxicidad, ya que este se produce generalmente con dosis muy pequeñas (0,1- 0,5- 1, 5 o 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) [87] y en una cantidad de tiempo de exposición muy corto, lo cual se ha demostrado al evaluar distintos venenos. Por ejemplo, *Bungarus multicinctus* y *Naja naja kaouthia* causaron el 50% de bloqueo muscular en BCP y DFR, con una concentración menor a 3.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ y el bloqueo completo con 10-30 $\mu\text{g}/\text{ml}$ respectivamente [86]. Así mismo, en los crotálicos (*C. d. terrificus* y *C. d. cascavella*) se demostró que con 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ y 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ en un tiempo de exposición de 16 y 24 min, respectivamente generó un bloqueo neuromuscular total. En cuanto al veneno de *Lachesis muta muta* [84], también se evidenció un efecto neurotóxico total con bajas dosis (10-50 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Con estos resultados se puede inferir que el efecto neuromuscular irreversible presentado por el veneno de *B. microphthalmus* es a consecuencia de un efecto miotóxico [45], el cual genera mionecrosis y daño muscular agudo principalmente en las fibrillas de las células musculares las cuales son las que permiten la contracción muscular [50,88,89].

Estos efectos han sido identificados gracias a ensayos en donde se mide el nivel de Creatina kinasa (CK), el cual evalúa el daño muscular, así como también de análisis histológicos en donde se identificó un patrón característico de daño el cual producía una desorganización de las miofibrillas con posterior digestión de los miofilamentos [45,56,82]. Estos efectos también se evidencian en el estudio de Almeida y colaboradores, con el veneno de *Crotalus atrox* [57].

Relacionando estos resultados con la caracterización bioquímica descrita anteriormente se puede manifestar que la acción de *B. microphthalmus* es similar a *B. atrox*, la cual se caracteriza por tener un efecto altamente miotóxico, al poseer miotoxinas (PLA2) y por la actividad proteolítica generada por metaloproteinasas y serinproteasas [19,90]. Entre los mecanismos moleculares inducidos por un veneno miotóxico se encuentra la ruptura de las membranas sarcolemáticas, generando como consecuencia una pérdida de gradientes iónicos y la inducción masiva de iones Ca^{2+} , lo cual provoca varios procesos degenerativos [91,92]. En un estudio con el veneno de *Notechis scutatus*, los investigadores demostraron que la notexina (miotóxina), se une específicamente al sarcolema, generando un daño en las fibrillas del musculo esquelético [88,93]. Se ha descrito que la capacidad que tienen las PLA2 para generar una miotoxicidad sistémica se relaciona directamente a su alta selectividad por receptores de células musculares y, en algunos casos, en terminaciones nerviosas [26,49,89,94].

En cuanto a la contracción en respuesta a la acetilcolina (Ach), Carbacol y KCl, se puede identificar que el efecto neuromuscular producido es por una acción presináptica, ya que con la respuesta a acetilcolina se demuestra que no existe un daño en los receptores nicotínicos [51,56]. Sin embargo, igual depende de la cantidad de veneno con la que reaccione, puesto que con altas dosis (100 $\mu\text{g/ml}$) no se genera ninguna respuesta, produciéndose una acción postsináptica [25,47].

Capítulo V. Conclusiones y Recomendaciones.

El veneno de *B. microphthalmus* parece estar compuesto mayoritariamente por metaloproteinasas, serinproteasas y fosfolipasas. Sin embargo, para poder conocer la abundancia de cada toxina en el venoma se debe confirmar por ensayos cuantitativos de fracciones colectadas del HPLC a partir de la identificación de las mismas por espectrometría de masas.

Nuestros resultados sugieren similitudes y diferencias enzimáticas entre el veneno de *B. atrox* y *B. microphthalmus*. Los mismos deben relacionar la cantidad y actividad enzimática de cada isoforma de toxina presente en estos venenos. Estos resultados pueden tener implicaciones fisiológicas en la víctima, cuando la respuesta farmacológica es dependiente de la acción enzimática. Sin embargo, estudios toxicológicos son relevantes para verificar el impacto de estas diferencias y similitudes.

Alineando con la filogenia y evolución se puede comprobar que *B. microphthalmus* no tiene como función principal generar un efecto neurotóxico. El efecto miotóxico generado a causa de sus diferentes componentes puede tener una repercusión a nivel neuromuscular. Las preparaciones de BCP son más sensibles a los componentes del veneno que las preparaciones de DFR, pues se pudo identificar un mayor efecto neuromuscular y por ende miotóxico en BCP. También se puede manifestar que el veneno de *B. microphthalmus* tiene un mayor efecto neuromuscular en preparaciones de BCP en comparación con venenos del género *Bothrops* de Brasil. Como recomendación, para poder determinar el efecto miotóxico de una forma cuantitativa y respaldar estas conclusiones se deberían realizar ensayos adicionales donde se mida los niveles de CK o estudios histológicos, donde se pueda visualizar el daño muscular.

Capítulo VI. Bibliografía

1. Tan CH, Tan NH. Snake Venom Overview: Definition, Composition, and Characteristics. *Snake Venoms*. 2017; 5–6. doi:10.1007/978-94-007-6410-1
2. Gutiérrez JM, Calvete JJ, Habib AG, Harrison RA, Williams DJ, Warrell DA. Snakebite envenoming [Internet]. *Nature reviews. Disease primers*. Nat Rev Dis Primers; 2017. p. 17063. doi:10.1038/nrdp.2017.63
3. Chippaux JP, Williams V, White J. Snake venom variability: methods of study, results and interpretation [Internet]. *Toxicon*. Toxicon; 1991. pp. 1279–1303. doi:10.1016/0041-0101(91)90116-9
4. World Health Organization. Snakebite envenoming. A strategy for prevention and control [Internet]. 2019. Disponible: <http://apps.who.int/bookorders>.
5. Holding ML, Margres MJ, Rokyta DR, Gibbs HL. Local prey community composition and genetic distance predict venom divergence among populations of the northern Pacific rattlesnake (*Crotalus oreganus*). *J Evol Biol*. 2018;31: 1513–1528. doi:10.1111/jeb.13347
6. Williams DJ, Faiz MA, Abela-Ridder B, Ainsworth S, Bulfone TC, Nickerson AD, et al. Strategy for a globally coordinated response to a priority neglected tropical disease: Snakebite envenoming. Gutiérrez JM, editor. *PLoS Negl Trop Dis*. 2019;13: e0007059. doi:10.1371/journal.pntd.0007059
7. Thornton SL. Snakes. *Encyclopedia of Toxicology: Third Edition*. Elsevier; 2014. pp. 310–312. doi:10.1016/B978-0-12-386454-3.00786-7
8. Li L, Huang J, Lin Y. Snake venoms in cancer therapy: Past, present and future [Internet]. *Toxins*. MDPI AG; 2018. doi:10.3390/toxins10090346
9. Péterfi O, Boda F, Szabó Z, Ferencz E, Bába L. Hypotensive Snake Venom Components-A Mini-Review [Internet]. *Molecules* (Basel, Switzerland). NLM (Medline); 2019. doi:10.3390/molecules24152778
10. Pal SK, Gomes A, Dasgupta SC, Gomes A. Snake venom as therapeutic agents: Obtenido de toxin to drug development. *Indian J Exp Biol*. 2002;40: 1353–8.

Disponible: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12974396>

11. Urra FA, Araya-Maturana R. Putting the brakes on tumorigenesis with snake venom toxins: New molecular insights for cancer drug discovery. *Seminars in Cancer Biology*. Academic Press; 2020. doi:10.1016/j.semcancer.2020.05.006
12. Bocian A, Hus KK. Antibacterial properties of snake venom components [Internet]. *Chemical Papers*. Springer; 2020. pp. 407–419. doi:10.1007/s11696-019-00939-y
13. Tasoulis T, Isbister GK. A review and database of snake venom proteomes [Internet]. *Toxins*. MDPI AG; 2017. doi:10.3390/toxins9090290
14. Calvete JJ. Proteomic tools against the neglected pathology of snake bite envenoming. *Expert Rev Proteomics*. 2011;8: 739–758. doi:10.1586/epr.11.61
15. Calvete JJ, Sanz L, Pérez A, Borges A, Vargas AM, Lomonte B, et al. Snake population venomics and antivenomics of *Bothrops atrox*: Paedomorphism along its transamazonian dispersal and implications of geographic venom variability on snakebite management. *J Proteomics*. 2011;74: 510–527. doi:10.1016/j.jprot.2011.01.003
16. Resende LM, Almeida JR, Schezaro-Ramos R, Collaço RCO, Simioni LR, Ramírez D, et al. Exploring and understanding the functional role, and biochemical and structural characteristics of an acidic phospholipase A2, ApITx-I, purified from *Agkistrodon piscivorus leucostoma* snake venom. *Toxicon*. 2017;127: 22–36. doi:10.1016/j.toxicon.2017.01.002
17. Lomonte B, Fernández J, Sanz L, Angulo Y, Sasa M, Gutiérrez JM, et al. Venomous snakes of Costa Rica: Biological and medical implications of their venom proteomic profiles analyzed through the strategy of snake venomics [Internet]. *Journal of Proteomics*. Elsevier B.V.; 2014. pp. 323–339. doi:10.1016/j.jprot.2014.02.020
18. Pereañez JA, Preciado LM, Fernández J, Camacho E, Lomonte B, Castro F, et al. Snake venomics, experimental toxic activities and clinical characteristics of human envenomation by *Bothrocophias myersi* (Serpentes: Viperidae) from Colombia. *J Proteomics*. 2020;220. doi:10.1016/j.jprot.2020.103758

19. Monteiro WM, Contreras-Bernal JC, Bisneto PF, Sachett J, Mendonça da Silva I, Lacerda M, et al. *Bothrops atrox*, the most important snake involved in human envenomings in the amazon: How venomomics contributes to the knowledge of snake biology and clinical toxinology. *Toxicon* X. 2020;6: 100037. doi:10.1016/j.toxcx.2020.100037
20. Amazonas DR, Portes-Junior JA, Nishiyama-Jr MY, Nicolau CA, Chalkidis HM, Mourão RHV, et al. Molecular mechanisms underlying intraspecific variation in snake venom. *J Proteomics*. 2018;181: 60–72. doi:10.1016/j.jprot.2018.03.032
21. Lomonte B, Carmona E. Individual expression patterns of myotoxin isoforms in the venom of the snake *Bothrops asper*. *Comp Biochem Physiol Part B Comp Biochem*. 1992;102: 325–329. doi:10.1016/0305-0491(92)90129-F
22. Casewell NR, Jackson TNW, Laustsen AH, Sunagar K. Causes and Consequences of Snake Venom Variation. *Trends Pharmacol Sci*. 2020; doi:10.1016/j.tips.2020.05.006
23. Calvete JJ, Sanz L, Cid P, De La Torre P, Flores-Díaz M, Dos Santos MC, et al. Snake venomomics of the Central American Rattlesnake *Crotalus simus* and the South American *Crotalus durissus* complex points to neurotoxicity as an adaptive pedomorphic trend along *Crotalus* dispersal in South America. *J Proteome Res*. 2010;9: 528–544. doi:10.1021/pr9008749
24. Lomonte B, Calvete JJ. Strategies in “snake venomomics” aiming at an integrative view of compositional, functional, and immunological characteristics of venoms [Internet]. *Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases*. BioMed Central Ltd.; 2017. doi:10.1186/s40409-017-0117-8
25. Mustafa M, Hayati MFM, Azizan N, Mehvish H. Neurotoxicity related to snakebite: treatment, and prevention. *J Med Dent Sci Res*. 2016;3: 20–25.
26. Azevedo-Marques MM, Cupo P, Coimbra TM, Hering SE, Rossi MA, Laure CJ. Myonecrosis, myoglobinuria and acute renal failure induced by south american rattlesnake (*Crotalus durissus terrificus*) envenomation in brazil. *Toxicon*. 1985;23: 631–636. doi:10.1016/0041-0101(85)90367-8
27. Martins-Santos MES, Resende RR, Pinto FCH, Soares AM, Marangoni S, Oliveira E, et

- al. Effect of a Pool of Peptides Isolated from *Crotalus durissus terrificus* (South American Rattlesnake) Venom on Glucose Levels of Mice Fed on a High-Fat Diet. *Int J Pept Res Ther*. 2011;17: 225–230. doi:10.1007/s10989-011-9261-0
28. WHO. Snake Antivenom Immunoglobulins [Internet]. 2010. Disponible: https://www.who.int/bloodproducts/snake_antivenoms/SnakeAntivenomGuideline.pdf
 29. Estevao-Costa MI, Gontijo SS, Correia BL, Yarleque A, Vivas-Ruiz D, Rodrigues E, et al. Neutralization of toxicological activities of medically-relevant *Bothrops* snake venoms and relevant toxins by two polyvalent bothropic antivenoms produced in Peru and Brazil. *Toxicon*. 2016;122: 67–77. doi:10.1016/j.toxicon.2016.09.010
 30. Méndez R, Bonilla F, Sasa M, Dwyer Q, Fernández J, Lomonte B. Proteomic profiling, functional characterization, and immunoneutralization of the venom of *Porthidium porrasii*, a pitviper endemic to Costa Rica. *Acta Trop*. 2019;193: 113–123. doi:10.1016/j.actatropica.2019.02.030
 31. Ministerio de Salud Pública del Ecuador. Manual de normas y procedimientos sobre prevención y tratamiento de accidentes ocasionados por mordedura de serpientes. [Internet]. 2008. Disponible: [https://aplicaciones.msp.gob.ec/salud/archivosdigitales/documentosDirecciones/dnn/archivos/MANUAL DE NORMAS PROCEDIM. PREVENC.MORDEDURA DE SERPIENTES\(1\).pdf](https://aplicaciones.msp.gob.ec/salud/archivosdigitales/documentosDirecciones/dnn/archivos/MANUAL_DE_NORMAS_PROCEDIM_PREVENC.MORDEDURA_DE_SERPIENTES(1).pdf)
 32. Torres-Carvajal, O; Pazmiño-Otamendi, G; Salazar-Valenzuela D. Reptiles of Ecuador: a resource-rich online portal, with dynamic checklists and photographic guides. *Amphib Reptil Conserv* 13. 2019; 209–229.
 33. Ochoa-Avilés A, Heredia-Andino OS, Escandón SA, Celorio-Carvajal CA, Arias-Peláez MC, Zaruma-Torres F, et al. Viperidae snakebites in Ecuador: A review of epidemiological and ecological aspects. *Toxicon* X. 2020;7. doi:10.1016/j.toxcx.2020.100051
 34. MSP. Subsecretaria de vigilancia de la salud pública ,Subsistema de Vigilancia SIVE-ALERTA. Efectos tóxicos año 2021 [Internet]. Disponible:

<https://www.salud.gob.ec/wp-content/uploads/2021/04/Toxicos-y-quimicos-SE-12.pdf>

35. Carrasco PA, Mattoni CI, Leynaud GC, Scrocchi GJ. Morphology, phylogeny and taxonomy of South American bothropoid pitvipers (Serpentes, Viperidae). *Zool Scr.* 2012;41: 109–124. doi:10.1111/j.1463-6409.2011.00511.x
36. Salazar-Valenzuela D, Mora-Obando D, Fernández ML, Loaiza-Lange A, Gibbs HL, Lomonte B. Proteomic and toxicological profiling of the venom of *Bothrocophias campbelli*, a pitviper species from Ecuador and Colombia. *Toxicon.* 2014;90: 15–25. doi:10.1016/j.toxicon.2014.07.012
37. Vaca JE. Biogeografía del Género *Bothrocophias* (Serpentes: Viperidae: Crotalinae), mediante Modelamientos de Nicho Ecológico. [Internet]. 2012. Disponible: <http://www.dspace.uce.edu.ec/handle/25000/591>
38. Gutberlet RL, Campbell JA. Generic Recognition for a Neglected Lineage of South American Pitvipers (Squamata: Viperidae: Crotalinae), with the Description of a New Species from the Colombian Chocó. 2001.
39. FENWICK AM, GUTBERLET JR RL, EVANS JA, PARKINSON CL. Morphological and molecular evidence for phylogeny and classification of South American pitvipers, genera *Bothrops*, *Bothriopsis*, and *Bothrocophias* (Serpentes: Viperidae). *Zool J Linn Soc.* 2009;156: 617–640. doi:10.1111/j.1096-3642.2008.00495.x
40. Campbell JA, Lamar WA. *The Venomous Reptiles of the Western Hemisphere | Hardcover | Cornell University Press [Internet]. Ithaca, New York: Cornell University Press; 2004. Disponible: <https://www.cornellpress.cornell.edu/book/9780801441417/the-venomous-reptiles-of-the-western-hemisphere/#bookTabs=1>*
41. Cisneros-Heredia DF, Borja M O, Proano D, Touzet J-M. Distribution and natural history of the Ecuadorian Toad-headed Pitvipers of the genus *Bothrocophias*. *Herpetozoa.* 2006;19: 17–26. Disponible: www.biologiezentrum.at
42. Torres O. *Bothrocophias microphththalmus* Imagen.Código de Colección QCAZR13858. In: Bajo licencia CC BY-NC-ND 4.0. BIOWEB. 2015 p.

<https://bioweb.bio/galeria/Especimen/Foto/348951>.

43. Rodríguez-Guerra A, Torres-Carvajal, O. Pazmiño-Otamendi, G Salazar-Valenzuela D. *Bothrocophias microphthalmus*. In: Reptiles del Ecuador. Version 2019.0. Museo de Zoología, Pontificia Universidad Católica del Ecuador. Bajo licencia CC BY-NC-ND 4.0.BIOWEB. [Internet]. 2019. Disponible: [https://bioweb.bio/faunaweb/reptiliaweb/FichaEspecie/Bothrocophias microphthalmus](https://bioweb.bio/faunaweb/reptiliaweb/FichaEspecie/Bothrocophias_microphthalmus)
44. Sant'Ana Malaque CM, Gutiérrez JM. Snakebite Envenomation in Central and South America. *Critical Care Toxicology*. Springer International Publishing; 2015. pp. 1–22. doi:10.1007/978-3-319-20790-2_146-1
45. Angulo Y. Fosfolipasas A2 miotoxinas de venenos de serpientes de la familia Viperidae: caracterización estructural y funcional [Internet]. Instituto Clodomiro Picado, Universidad de Costa Rica. 2005. Disponible: <http://repositorio.sibdi.ucr.ac.cr:8080/jspui/bitstream/123456789/1097/1/25716.pdf>
46. Lomonte B, Angulo Y, Sasa M, Gutierrez J. The Phospholipase A2 Homologues of Snake Venoms: Biological Activities and Their Possible Adaptive Roles. *Protein Pept Lett*. 2009;16: 860–876. doi:10.2174/092986609788923356
47. Cecchini AL, Marcussi S, Silveira LB, Borja-Oliveira CR, Rodrigues-Simioni L, Amara S, et al. Biological and enzymatic activities of *Micrurus* sp. (Coral) snake venoms. *Comp Biochem Physiol - A Mol Integr Physiol*. 2005;140: 125–134. doi:10.1016/j.cbpb.2004.11.012
48. Ferraz CR, Arrahman A, Xie C, Casewell NR, Lewis RJ, Kool J, et al. Multifunctional toxins in snake venoms and therapeutic implications: From pain to hemorrhage and necrosis [Internet]. *Frontiers in Ecology and Evolution*. Frontiers Media S.A.; 2019. p. 218. doi:10.3389/fevo.2019.00218
49. Tonello F, Rigoni M. Cellular Mechanisms of Action of Snake Phospholipase A2 Toxins. *Snake Venoms*. Springer Netherlands; 2017. pp. 49–65. doi:10.1007/978-94-007-6410-1_26

50. Waidyanatha S, Silva A, Siribaddana S, Isbister G. Long-term Effects of Snake Envenoming. *Toxins (Basel)*. 2019;11: 193. doi:10.3390/toxins11040193
51. Ranawaka UK, Lalloo DG, de Silva HJ. Neurotoxicity in Snakebite-The Limits of Our Knowledge [Internet]. *PLoS Neglected Tropical Diseases*. Public Library of Science; 2013. doi:10.1371/journal.pntd.0002302
52. Oliveira DA, Harasawa C, Seibert CS, Casais e Silva LL, Pimenta DC, Lebrun I, et al. Phospholipases A2 isolated from *Micrurus lemniscatus* coral snake venom: Behavioral, electroencephalographic, and neuropathological aspects. *Brain Res Bull*. 2008;75: 629–639. doi:10.1016/j.brainresbull.2007.10.007
53. Floriano RS, Schezaro-Ramos R, Silva NJ, Bucarechi F, Rowan EG, Hyslop S. Neurotoxicity of *Micrurus lemniscatus lemniscatus* (South American coralsnake) venom in vertebrate neuromuscular preparations in vitro and neutralization by antivenom. *Arch Toxicol*. 2019;93: 2065–2086. doi:10.1007/s00204-019-02476-9
54. Georgieva D, Öhler M, Seifert J, Bergen M Von, Arni RK, Genov N, et al. Snake venom of *Crotalus durissus terrificus*-correlation with pharmacological activities. *J Proteome Res*. 2010;9: 2302–2316. doi:10.1021/pr901042p
55. Zamunér SR, Da Cruz-Höfling MA, Corrado AP, Hyslop S, Rodrigues-Simioni L. Comparison of the neurotoxic and myotoxic effects of Brazilian *Bothrops* venoms and their neutralization by commercial antivenom. *Toxicon*. 2004;44: 259–271. doi:10.1016/j.toxicon.2004.05.029
56. Holzer M, Mackessy SP. An aqueous endpoint assay of snake venom phospholipase A2. *Toxicon*. 1996;34: 1149–1155. doi:10.1016/0041-0101(96)00057-8
57. Schezaro-Ramos R, Da Silva SL, Pereira BB, Santa Fé Miguel AT, Mendes B, Mogollón NGS, et al. In vitro effects of *Crotalus atrox* snake venom on chick and mouse neuromuscular preparations. *Comp Biochem Physiol Part - C Toxicol Pharmacol*. 2018;209: 37–45. doi:10.1016/j.cbpc.2018.03.008
58. Kuch U, Freire A. Notes on morphology, reproduction and medical importance of the poorly known Small-eyed Lancehead, *Bothrops microphthalmus* COPE, 1876, in Ecuador (Squamata: Serpentes: Viperidae). *Herpetozoa*. 1995;8: 81–83. Disponible:

<https://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download?doi=10.1.1.542.1733&rep=rep1&type=pdf>

59. León C. Saberes y prácticas ancestrales de los terapeutas tradicionales sobre accidentes ofídicos en el cantón Yantzaza [Internet]. Universidad Nacional de Loja. 2015. Disponible: [https://dspace.unl.edu.ec/jspui/bitstream/123456789/12092/1/CARINA LEON.pdf](https://dspace.unl.edu.ec/jspui/bitstream/123456789/12092/1/CARINA_LEON.pdf)
60. Terán MDC, Lomonte B. Actividad letal de seis venenos de serpientes de importancia médica en el Ecuador. *Rev Ecuat Med Cienc Biol.* 2016;37. doi:10.26807/remcb.v37i2.4
61. Yañez-Arenas C, Díaz-Gamboa L, Patrón-Rivero C, López-Reyes K, Chiappa-Carrara X. Estimating geographic patterns of ophidism risk in Ecuador. *Neotrop Biodivers.* 2018;4: 55–61. doi:10.1080/23766808.2018.1454762
62. McCue MD. What is the most dangerous snake? *J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis.* 2013;19: 19. doi:10.1186/1678-9199-19-19
63. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 1970;227: 680–685. doi:10.1038/227680a0
64. Beer LA, Speicher DW. Protein detection in gels using fixation. *Curr Protoc Protein Sci.* 2002;Chapter 10: Unit. doi:10.1002/0471140864.ps1005s29
65. Lomonte B, Gutiérrez JM. [Proteolytic activity of snake venoms of Costa Rica on casein]. *Rev Biol Trop.* 1983;31: 37–40. Disponible: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6364267>
66. Ghorbanpur M, Zare Mirakabadi A, Zokaei F, Zolfagarrian H, Rabiei H. Purification and partial characterization of a coagulant serine protease from the venom of the Iranian snake *Agkistrodon halys*. *J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis.* 2009;15: 411–423. doi:10.1590/S1678-91992009000300005
67. Bulbring E. Observations on the isolated phrenic nerve diaphragm preparation of the rat. *Br J Pharmacol Chemother.* 1946;1: 38–61. doi:10.1111/j.1476-5381.1946.tb00025.x

68. Ginsborg BL, Warriner J. The isolated chick *biventer cervicis* nerve-muscle preparation. *Br J Pharmacol Chemother.* 1960;15: 410–411. doi:10.1111/j.1476-5381.1960.tb01264.x
69. Alangode A, Rajan K, Nair BG. Snake antivenom: Challenges and alternate approaches. *Biochem Pharmacol.* 2020;181: 114135. doi:10.1016/j.bcp.2020.114135
70. Calvete JJ, Sanz L, Angulo Y, Lomonte B, Gutiérrez JM. Venoms, venomics, antivenomics. *FEBS Lett.* 2009;583: 1736–1743. doi:10.1016/j.febslet.2009.03.029
71. Lomonte B, Tsai WC, Ureña-Díaz JM, Sanz L, Mora-Obando D, Sánchez EE, et al. Venomics of new world pit vipers: Genus-wide comparisons of venom proteomes across agkistrodon. *J Proteomics.* 2014;96: 103–116. doi:10.1016/j.jprot.2013.10.036
72. Castro EN, Lomonte B, del Carmen Gutiérrez M, Alagón A, Gutiérrez JM. Intraspecies variation in the venom of the rattlesnake *Crotalus simus* from Mexico: Different expression of crotoxin results in highly variable toxicity in the venoms of three subspecies. *J Proteomics.* 2013;87: 103–121. doi:10.1016/j.jprot.2013.05.024
73. Cremonez CM, Leite FP, Bordon K de CF, Cerni FA, Cardoso IA, Gregório ZM de O, et al. Experimental *Lachesis muta rhombeata* envenomation and effects of soursop (*Annona muricata*) as natural antivenom. *J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis.* 2016;22: 12. doi:10.1186/s40409-016-0067-6
74. Fenker J, Tedeschi LG, Pyron RA, Nogueira C de C. Phylogenetic diversity, habitat loss and conservation in South American pitvipers (Crotalinae: *Bothrops* and *Bothrocophias*). Green D, editor. *Divers Distrib.* 2014;20: 1108–1119. doi:10.1111/ddi.12217
75. Lomonte B, Díaz C, Chaves F, Fernández J, Ruiz M, Salas M, et al. Comparative characterization of Viperidae snake venoms from Perú reveals two compositional patterns of phospholipase A2 expression. *Toxicon X.* 2020;7: 100044. doi:10.1016/j.toxcx.2020.100044
76. De-Oliveira CA-, Stuginski DR, Kitano ES, Andrade-Silva D, Liberato T, Fukushima I, et

- al. Dynamic Rearrangement in Snake Venom Gland Proteome: Insights into *Bothrops jararaca* Intraspecific Venom Variation. *J Proteome Res.* 2016;15: 3752–3762. doi:10.1021/acs.jproteome.6b00561
77. Currier RB, Harrison RA, Rowley PD, Laing GD, Wagstaff SC. Intra-specific variation in venom of the African Puff Adder (*Bitis arietans*): Differential expression and activity of snake venom metalloproteinases (SVMPs). *Toxicon.* 2010;55: 864–873. doi:10.1016/j.toxicon.2009.12.009
78. Queiroz GP, Pessoa LA, Portaro FCV, Furtado M de FD, Tambourgi D V. Interspecific variation in venom composition and toxicity of Brazilian snakes from *Bothrops* genus. *Toxicon.* 2008;52: 842–851. doi:10.1016/j.toxicon.2008.10.002
79. Román-Domínguez L, Neri-Castro E, Vázquez López H, García-Osorio B, Archundia IG, Ortiz-Medina JA, et al. Biochemical and immunochemical characterization of venoms from snakes of the genus *Agkistrodon*. *Toxicon X.* 2019;4: 100013. doi:10.1016/j.toxcx.2019.100013
80. Sousa LF, Portes-Junior JA, Nicolau CA, Bernardoni JL, Nishiyama-Jr MY, Amazonas DR, et al. Functional proteomic analyses of *Bothrops atrox* venom reveals phenotypes associated with habitat variation in the Amazon. *J Proteomics.* 2017;159: 32–46. doi:10.1016/j.jprot.2017.03.003
81. Sousa JRF, Monteiro RQ, Castro HC, Zingali RB. Proteolytic action of *Bothrops jararaca* venom upon its own constituents. *Toxicon.* 2001;39: 787–792. doi:10.1016/S0041-0101(00)00208-7
82. Ferraz CR, Arrahman A, Xie C, Casewell NR, Lewis RJ, Kool J, et al. Multifunctional toxins in snake venoms and therapeutic implications: From pain to hemorrhage and necrosis [Internet]. *Frontiers in Ecology and Evolution.* Frontiers Media S.A.; 2019. p. 218. doi:10.3389/fevo.2019.00218
83. Soares A, Fontes M, Giglio J. Phospholipase A2 Myotoxins from *Bothrops* Snake Venoms: Structure- Function Relationship. *Curr Org Chem.* 2005;8: 1677–1690. doi:10.2174/1385272043369610
84. Damico DCS, Bueno LGF, Rodrigues-Simioni L, Marangoni S, Da Cruz-Höfling MA,

- Novello JC. Neurotoxic and myotoxic actions from *Lachesis muta muta* (surucucu) whole venom on the mouse and chick nerve-muscle preparations. *Toxicon*. 2005;46: 222–229. doi:10.1016/j.toxicon.2005.04.011
85. Zamunér SR, Da Cruz-Höfling MA, Corrado AP, Hyslop S, Rodrigues-Simioni L. Comparison of the neurotoxic and myotoxic effects of Brazilian *Bothrops* venoms and their neutralization by commercial antivenom. *Toxicon*. 2004;44: 259–271. doi:10.1016/j.toxicon.2004.05.029
86. Harvey AL, Barfaraz A, Thomson E, Faiz A, Preston S, Harris JB. Screening of snake venoms for neurotoxic and myotoxic effects using simple in vitro preparations from rodents and chicks. *Toxicon*. 1994;32: 257–265. doi:10.1016/0041-0101(94)90078-7
87. Bolívar-Barbosa JA, Rodríguez-Vargas AL. Neurotoxic activity of *Micrurus* snake venom and methods for its analysis. A literature review [Internet]. *Revista Facultad de Medicina*. Universidad Nacional de Colombia; 2020. pp. 453–462. doi:10.15446/revfacmed.v68n3.75992
88. Gutiérrez J, Cerdas L. Mecanismo de acción de miotoxinas aisladas de venenos de serpientes. *Rev Biol Trop*. 1984; 213–221.
89. Escalante T, Saravia-Otten P, Gastaldello S, Hernández R, Marín A, García G, et al. Changes in basement membrane components in an experimental model of skeletal muscle degeneration and regeneration induced by snake venom and myotoxic phospholipase A2. *Toxicon*. 2021;192: 46–56. doi:10.1016/j.toxicon.2021.01.003
90. Patiño RSP, Salazar-Valenzuela D, Medina-Villamizar E, Mendes B, Proaño-Bolaños C, da Silva SL, et al. *Bothrops atrox* from Ecuadorian Amazon: Initial analyses of venoms from individuals. *Toxicon*. 2021;193: 63–72. doi:10.1016/j.toxicon.2021.01.007
91. Gutiérrez J, Ownby CL, Odell G V. Pathogenesis of myonecrosis induced by crude venom and a myotoxin of *Bothrops asper*. *Exp Mol Pathol*. 1984;40: 367–379. doi:10.1016/0014-4800(84)90054-6
92. Gasanov SE. Snake Venom Cytotoxins, Phospholipase A2s, and Zn²⁺-dependent Metalloproteinases: Mechanisms of Action and Pharmacological Relevance. *J Clin*

Toxicol. 2014;4: 1000181. doi:10.4172/2161-0495.1000181

93. Dixon RW, Harris JB. Myotoxic activity of the toxic phospholipase, notexin, from the venom of the Australian tiger snake. *J Neuropathol Exp Neurol.* 1996;55: 1230–1237. doi:10.1097/00005072-199612000-00006
94. Montecucco C, Gutiérrez JM, Lomonte B. Cellular pathology induced by snake venom phospholipase A2 myotoxins and neurotoxins: Common aspects of their mechanisms of action [Internet]. *Cellular and Molecular Life Sciences. Cell Mol Life Sci*; 2008. pp. 2897–2912. doi:10.1007/s00018-008-8113-3