



UNIVERSIDAD REGIONAL AMAZÓNICA IKIAM

Facultad de ciencias de la vida
Carrera de ingeniería en Biotecnología

**Variación sexual y ontogénica del veneno de *Bothrops asper*:
enfoque proteómico, toxicológico y su neutralización por
antiveneno**

Proyecto de investigación previo a la obtención del Título de:
Ingeniero en Biotecnología

Autor: Jefferson Eduardo García Alarcón

Tutor: PhD. José Rafael de Almeida

Napo - Ecuador
2022

DECLARACIÓN DE DERECHO DE AUTOR, AUTENTICIDAD Y RESPONSABILIDAD

Yo, Jefferson Eduardo García Alarcón, con documento de identidad N° 1724740202, declaro que los resultados obtenidos en la investigación que presento en este documento final, previo a la obtención del título de Ingeniería en Biotecnología, son absolutamente inéditos, originales, auténticos y personales.

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

Tena, 29 de noviembre de 2022



Jefferson Eduardo García Alarcón
1724740202

AUTORIZACIÓN DE PUBLICACIÓN EN EL REPOSITORIO INSTITUCIONAL

Yo, Jefferson Eduardo García Alarcón, con documento de identidad N° 1724740202, en calidad de autor/a y titular de los derechos morales y patrimoniales del trabajo de titulación: Variación sexual y ontogénica del veneno de *Bothrops asper*: Enfoque proteómico, toxicológico y su neutralización por antiveneno, de conformidad con el Art. 114 del CÓDIGO ORGÁNICO DE LA ECONOMÍA SOCIAL DE LOS CONOCIMIENTOS, CREATIVIDAD E INNOVACIÓN, reconozco a favor de la Universidad Regional Amazónica Ikiam una licencia gratuita, intransferible y no exclusiva para el uso no comercial de la obra, con fines estrictamente académicos.

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

Tena, 29 de noviembre de 2022



Jefferson Eduardo García Alarcón
1724740202

CERTIFICADO DE DIRECCIÓN DE TRABAJO DE INTEGRACIÓN CURRICULAR

Certifico que el Trabajo de Integración Curricular Titulado: “Variación sexual y ontogénica del veneno de *Bothrops asper*: Enfoque proteómico, toxicológico y su neutralización por antiveneno”, en la modalidad: Tesis, fue realizado por: Jefferson Eduardo García Alarcón, bajo mi dirección.

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

Tena, 29 de noviembre de 2022

José Rafael de Almeida
1757448954

DEDICATORIA

A mi madre, mi padre y hermanas por su esfuerzo, apoyo e infinito amor.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. José Rafael de Almeida, por toda la sabiduría compartida, el cariño derramado, la amistad compartida y la paciencia obsequiada.

A la Universidad Regional Amazónica “Ikiam”, por acogerme en su seno científico y guiarme en mi camino para ser profesional.

A las profesionales encargadas del Laboratorio de Biología Molecular y Bioquímica, Nina Espinosa de los Monteros, Giovanna Moran y Kathy Apunte, por el conocimiento y acompañamiento brindado.

Al Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública “Dr. Leopoldo Izquieta Pérez”, en especial a la Dra. María Del Carmen Terán, por el conocimiento compartido y la confianza brindada en la donación de los venenos.

A todos los docentes, mis padres y amigos que fueron indispensables en mi etapa universitaria.

Tabla de contenidos

PORTADA.....	<i>I</i>
DECLARACIÓN DE DERECHO DE AUTOR, AUTENTICIDAD Y	
RESPONSABILIDAD.....	<i>ii</i>
AUTORIZACIÓN DE PUBLICACIÓN EN EL REPOSITORIO INSTITUCIONAL.....	<i>iii</i>
CERTIFICADO DE DIRECCIÓN DE TRABAJO DE INTEGRACIÓN CURRICULAR .	<i>iv</i>
DEDICATORIA.....	<i>v</i>
AGRADECIMIENTOS	<i>vi</i>
Tabla de contenido.....	<i>vii</i>
Índice de tablas.....	<i>ix</i>
Índice de figuras	<i>x</i>
RESUMEN.....	<i>xi</i>
ABSTRACT.....	<i>xii</i>
CAPÍTULO I: PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN.....	<i>1</i>
1.1. Antecedentes	<i>1</i>
1.2. Planteamiento del problema	<i>5</i>
1.3. Justificación de la investigación.....	<i>6</i>
1.4. Objetivos de la investigación	<i>7</i>
1.4.1. General	<i>7</i>
1.4.2. Específicos.....	<i>7</i>
CAPÍTULO II: MARCO METODOLÓGICO	<i>8</i>
2.1. Obtención de venenos	<i>8</i>
2.2. Fraccionamiento de veneno.....	<i>9</i>
2.3. Electroforesis	<i>9</i>
2.4. Ensayos enzimáticos	<i>10</i>
2.4.1. Actividad caseinolítica.....	<i>10</i>
2.4.2. Actividad fosfolipasa A ₂	<i>10</i>
2.4.3. Actividad L-amino oxidasa	<i>11</i>
2.4.4. Actividad serinproteasa.....	<i>11</i>
2.5. Ensayo de coagulación	<i>11</i>
2.6. Ensayos de neutralización	<i>12</i>
2.6.1. Neutralización de actividad enzimática.....	<i>12</i>

2.6.2. Neutralización de la actividad coagulante.....	12
2.7. Análisis estadístico	13
CAPÍTULO III: PRESENTACIÓN DE DATOS Y RESULTADOS.....	14
3.1. Perfil bioquímico de los venenos individuales de <i>B. asper</i>	14
3.2. Caracterización de la actividad enzimática de los venenos de <i>B. asper</i>	22
3.3. Caracterización del efecto coagulante de los venenos de <i>B. asper</i>	28
3.4. Neutralización de la actividad enzimática por antiveneno.....	29
3.5. Neutralización de la actividad coagulante por antiveneno	30
CAPÍTULO IV: INTERPRETACIÓN Y DISCUSIÓN	31
CAPÍTULO V: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	35
REFERENCIAS:.....	37
ANEXOS.....	43

Índice de tablas

Tabla1:	Evaluación de actividades enzimáticas mediante ANOVA multifactorial desbalanceado.....	43
----------------	--	----

Índice de figuras

Figura 1: Ejemplar de serpiente crotalina venenosa <i>B. asper</i> en el Bosque Protector Cerro Blanco, Guayas.	3
Figura 2: Identificación y sitio de colecta de los venenos de <i>B. asper</i> empleados en esta investigación. Los venenos fueron colectados en Guale, Manabí.....	8
Figura 3: Geles de electroforesis de poliacrilamida (SDS-PAGE) de los venenos totales de hembras (A) y machos (B) en condiciones reductoras	15
Figura 4: Perfiles cromatográficos de los venenos de individuos de <i>B. asper</i>	22
Figura 5: Caracterización enzimática de los venenos de ejemplares de <i>B. asper</i>	23
Figura 6: Análisis grupales para la variable “sexo y ontogenia” de ensayos enzimáticos mediante diagramas de caja y bigotes.....	25
Figura 7: Análisis grupales de componentes principales (PCA) de ensayos enzimáticos	27
Figura 8: Caracterización del potencial coagulante de los venenos de <i>B. asper</i> en plasma citratado.....	28
Figura 9: Disminución porcentual de la actividad caseinolítica.....	29
Figura 10: Cambio en los tiempos de coagulación del plasma por neutralización de antiveneno.	30

RESUMEN

Bothrops asper, es la serpiente que más accidentes ofídicos causa en la región costera de Ecuador, catalogada como de alta importancia médica. Manabí, es la provincia más afectada por la mordedura de este espécimen. A pesar de esto, la composición molecular del veneno *B. asper* ha sido pobremente estudiado en el país. Por otra parte, en varios países de la región se ha documentado una importante variación intraespecífica en el veneno de este vipérido. De esta heterogeneidad en la composición proteica del veneno sobresalen variaciones individuales, sexuales y ontogénicas entre los ejemplares. Esto puede desencadenar en complicaciones para los diferentes casos clínicos. Debido a la inespecificidad de los antivenenos de referencia usados en el país. El presente trabajo tuvo como objetivo evaluar la composición, actividad enzimática, actividad toxicológica y neutralización de 16 venenos de *B. asper* provenientes de Guale, Manabí. Los análisis mostraron importantes variaciones al analizar los venenos de los ejemplares de forma individual y grupal (machos, hembras, jóvenes y adultos). También, los ensayos de neutralización evidenciaron variaciones en la inhibición de los ejemplares, sin embargo, el desempeño del mismo fue aceptable para los ensayos de neutralización de actividad proteolítica y de coagulación. Los resultados muestran diferencias individuales y grupales relevantes a nivel bioquímico, toxicológico y de neutralización, lo que pudiera desencadenar en variabilidad de manifestaciones clínicas, es por esto que es imperativo continuar con los estudios que involucren ofidios de importancia médica en el país.

Palabras clave: *Bothrops asper*, envenenamiento, variación, sexo, ontogenia, neutralización.

ABSTRACT

Bothrops asper is the snake that causes the most ophidian accidents in the coastal region of Ecuador, classified as of high medical importance. Manabí is the province most affected by the bite of this specimen. Despite this, the molecular composition of *B. asper* venom has been poorly studied in the country. On the other hand, an important intraspecific variation in the venom of this viper has been documented in several countries of the region. From this heterogeneity in the protein composition of the venom, individual, sexual and ontogenic variations stand out among the specimens. This can trigger complications for different clinical cases. Due to the non-specificity of the reference antivenoms used in the country. The objective of this work was to evaluate the composition, enzymatic activity, toxicological activity and neutralization of 16 *B. asper* poisons from Guale, Manabí. The analyzes showed important variations when analyzing the venoms of the specimens individually and in groups (males, females, young and adults). Also, the neutralization tests showed variations in the inhibition of the specimens, however, its performance was acceptable for the proteolytic and coagulation activity neutralization tests. The results show relevant individual and group differences at the biochemical, toxicological and neutralization levels, which could trigger variability in clinical manifestations, which is why it is imperative to continue with studies involving snakes of medical importance in the country.

Keywords: *Bothrops asper*, envenoming, variation, sex, ontogeny, neutralization.

CAPÍTULO I: PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

1.1. Antecedentes

Constituidos por diferentes familias de proteínas con una variedad e isoformas de toxinas, los venenos de serpientes son mezclas complejas de compuestos de alto y bajo peso molecular con una amplia gama de acciones en sus presas. En líneas generales, estos componentes son en su mayoría proteínas o péptidos biológicamente activos y multifuncionales, los cuales desempeñan roles esenciales en la inmovilización, muerte y digestión de las presas [1,2]. Durante la evolución de los vertebrados, la glándula del veneno se adaptó a la glándula salival, misma que desde el epitelio secreta un cocktail proteico almacenado en el lumen y canalizado a los colmillos por conductos de conexión [3]. Las proteínas y péptidos son los elementos mayoritarios que corresponden alrededor del 90-95% del peso seco del veneno, entre las que destacan enzimas toxicológicamente relevantes, tales como fosfolipasas A_2 (PLA_2), L-aminooxidasas (LAAO), metalo-proteasas, serin-proteinasa entre otros que determinan clínicamente un conjunto de efectos locales y sistémicos en presas o víctimas humanas accidentales. Entre las principales manifestaciones, se destacan el dolor, edema en el sitio de la mordedura, miotoxicidad, eritemas, neurotoxicidad, daño renal, aumento del tiempo de coagulación y necrosis [4,5].

Equipos de investigación han calificado la problemática de mordedura de serpiente como grave y desatendida, puesto que si no existe una atención rápida y eficiente por los servicios médicos puede causar complicaciones o la muerte del paciente, principalmente en zonas de alta vulnerabilidad económica [6,7]. Según Chippaux [8], los accidentes ofídicos registran estadísticas de más de 14,500 casos al día en todo el mundo. de las cuales la mitad resultan en envenenamiento, dejando un saldo de entre 223 a 377 muertes diarias, siendo las poblaciones más afectadas Asia, África y Latinoamérica debido a que poseen ambientes favorables para el desarrollo y reproducción de estos reptiles. Sin embargo, estos datos representan solo una fracción de este problema de salud pública altamente subestimado. Muchos accidentes ofídicos son tratados en casa con medicina tradicional. La comunidad médica y científica en varias ocasiones ha mostrado su preocupación por la baja eficiencia o poca evidencia científica de esta terapia tradicional sobre los envenenamientos [9].

Latinoamérica, reconocida por su alta biodiversidad de animales venenosos, tiene una alta incidencia de mordedura de serpiente. Datos muestran aproximadamente 70,000 registros en hospitales en la región, mismo que podría ser inconcluso debido a los aspectos etnoculturales explicados en el párrafo anterior. El valor real podría oscilar entre 80,000 y 129,000 accidentes al año [10,11]. En Ecuador, al año el Ministerio de Salud Pública (MSP), reporta alrededor de 1450 casos de ofidismo de los cuales el 51,65% corresponden a casos leves, el 32,86% a casos moderados y el 15,49% a casos graves [12].

1.1.1. Clínica y terapia del envenenamiento de serpiente

Basado en la rica variedad de proteínas y péptidos que poseen los venenos de serpiente, se podría decir que cada víctima con esta afección es un experimento natural completamente nuevo que proporciona conocimiento sobre la acción del veneno, lo que representa un desafío humanitario y terapéutico. En este contexto, la toxinología clínica emerge como una rama de la medicina, bioquímica y farmacia que busca terapias que sean viables para tratar la mordedura [13]. Sin embargo, hasta la fecha el único tratamiento específico y efectivo para la mordedura de serpiente son los antivenenos [14], mismos que se producen empleando la globulina hiperinmune de animales que han sido inmunizados con un pool de veneno adecuado [15].

Los antivenenos de referencia son sometidos a varios pasos previos antes de su uso clínico. La evaluación preclínica es una etapa fundamental en el desarrollo de este tipo de productos biológicos, como por ejemplo, ensayos en los que se determina su potencial [16,17]. Los efectos fisiopatológicos de los venenos son muy variables, por lo que muchas pruebas previas son necesarias [17]. Por otra parte, la eficiencia de los antivenenos es desafiada por la muy bien documentada variabilidad interespecífica e intraespecífica en la composición de los venenos en determinados países como Ecuador y México [18, 65].

1.1.2. Envenenamiento por *Bothrops asper*

El género *Bothrops* se compone de 46 subespecies [19] que se encuentran distribuidas en las zonas tropicales de América Latina, desde las tierras bajas de México hasta Centroamérica y las regiones del norte de Sudamérica [20]. Coloquialmente conocidas como «punta de lanza» o «equis», son las serpientes que más accidentes ofídicos causan en las regiones donde se encuentran, principalmente debido a su rápida adaptabilidad a ambientes humanizados y coloraciones crípticas que hacen difícil identificarlas en la maleza [21].

Bothrops asper (Figura 1), es una de las especies ampliamente estudiadas de este género. Se distribuye en las tierras bajas del Pacífico, desde los 1200-1300 msnm en las estribaciones occidentales de los Andes [22]. En Ecuador esta serpiente es responsable de alrededor del 80% de accidentes ofídicos en su territorio, reportando la mayoría de los casos en la región costera [22,23].



Figura 1. Ejemplar de serpiente crotalina venenosa *B. asper* en el Bosque Protector Cerro Blanco, Guayas.

Fuente: Luis A. Coloma. BIOWEB, <https://bioweb.bio>.

1.1.3. Variación sexual y ontogénica del veneno de *B. asper*

La variación intraespecífica del veneno ocurre entre especímenes de forma individual y puede verse influenciado por varios factores como la variación estacional, la dieta, el hábitat, la edad y el dimorfismo sexual [1]. La variación en la composición venómica es importante desde el punto de vista básico en la investigación de venenos, como la elección de donantes correctos para la elaboración de antiveneno, así como para un mejor manejo de accidentes ofídicos y emplear un antiveneno adecuado para cada tipo de envenenamiento [44]. Se ha demostrado un fuerte dimorfismo sexual en serpientes *B. asper*, donde las hembras son considerablemente más grandes que los machos, poseen un mayor número de filas de escamas dorsales y menos escamas subcaudales que los machos [24], junto con una también marcada presencia de variabilidad ontogénica que es fácilmente observada comparando especímenes jóvenes y adultos en la isoforma de miotoxina (PLA₂ K49) en especímenes encontrados en Ecuador y del sur-este de Colombia [25]. Las hembras alcanzan la madurez sexual cuando tienen una longitud corporal total de 110-120 cm, y los machos de 99,5 cm [26].

1.1.4. Problemática del envenenamiento en Ecuador

La mordedura de serpiente es una emergencia recurrente en la mayoría de países tropicales [45]. Los accidentes ofídicos reales de serpiente a nivel mundial son difíciles de estimar debido a la escasa información y limitados registros, sobre todo en regiones como Latinoamérica, donde los casos de mordedura se alinean en importancia, tomando en consideración la densidad poblacional de Asia y África [46]. Ecuador no es la excepción en la falta de información clínica, mismo que ya ha sido mencionado en los estudios relacionados con envenenamiento ofídico en el país [45].

En Ecuador no se dispone de suero antiofídico bothrópico (SAO-B) de producción local, puesto que los antivenenos empleados son producidos en el Instituto Clodomiro Picado (ICP) de la Universidad de Costa Rica [27]. El no uso de inmunógenos basados en venenos ecuatorianos puede reducir el inmuno reconocimiento del antiveneno de uso local. En concordancia con esto, el Ministerio de Salud Pública del Ecuador [27] en su protocolo sobre el tratamiento de mordedura de serpiente específica: “Al momento no se dispone de SAO-B de elaboración nacional; de esta manera el suero podría no tener la efectividad terapéutica esperada”. Con esto, se puede interpretar que una ineficiencia

terapéutica de SAO-B, podría desencadenar en complicaciones clínicas posteriores a la aplicación del antiveneno.

1.2. Planteamiento del problema

Los accidentes ofídicos constituyen un problema de salud pública por la gravedad que representa y el impacto social, económico, ecológico y público que produce [28]. Esto se vuelve más sensible en Ecuador, que goza con ambientes tropicales y subtropicales propicios para el desarrollo de 230 especies de serpientes, con 9 familias de serpientes venenosas y altamente peligrosas para el ser humano [29,12]. Desde que se tiene registros, las provincias más afectadas por las mordeduras de serpiente son Morona Santiago y Manabí, siendo las personas de entre 20 a 49 años las que más accidentes con ofidios registran, ocasionando empobrecimiento, debido al impacto y las secuelas físicas y socioeconómicas que representa a las familias de las víctimas [12].

La especie que más accidentes ofídicos registra en la región costera del país es *Bothrops asper* [23]. Se ha registrado una considerable variabilidad intraespecífica en el veneno de dicha serpiente en otros países latinoamericanos como Colombia y Costa Rica con base en el dimorfismo sexual y la ontogenia de las mismas [30-32]. En Ecuador, no se han realizado estudios entre ejemplares de *B. asper* que demuestren tal variabilidad, lo que hace que este trabajo sea de relevancia para el campo médico del país.

La variación en la composición proteica del veneno puede desencadenar en complicaciones en el manejo de los accidentes ofídicos. Por tanto, esto implica una variación en los cuadros clínicos para cada paciente, pudiendo desencadenar sintomatología múltiple. Esto tiene como consecuencia que en los centros de salud del país haya una importante problemática al tratar un accidente ofídico producido por esta serpiente [33].

1.3. Justificación de la investigación

Los envenenamientos debido a mordedura de serpiente volvieron a llamar la atención de la comunidad médica y científica, cuando en 2017 la OMS la agregó a la lista de enfermedades tropicales desatendidas [34]. En América Latina estos accidentes resultan muy comunes entre las personas que habitan en lugares que forman parte del ecosistema de muchas víboras venenosas, la mayoría de accidentes con ofidios en estas regiones están relacionados con los de la familia Viperidae, de la cual se destaca las serpientes del género *Bothrops* [20].

La mordedura de *B. asper* es una de las más frecuentes en el país y catalogada como de alta importancia médica [49], en los hospitales esto se convierte en un gran reto para los galenos, pues temas como la formación inadecuada de los mismos y falta de personal fijo dificulta sus tareas [33]. La incidencia de mordedura en Ecuador es relativamente alta y la tasa de mortalidad relacionada a ella ha permanecido constante en los últimos años [45, 48], exacerbando el ya mencionado problema, no se puede dejar de lado los demás factores que deja como saldo esta enfermedad, como la morbilidad, factores socioeconómicos, psicológicos y empobrecimiento que envuelve este padecimiento.

La variación en la composición de los venenos puede causar complicaciones en el manejo clínico del paciente [35], por lo que es de suma importancia prestar atención a las variaciones inter e intraespecíficas de los mismos, ya que pueden influir en la patología del envenenamiento como en la eficiencia de los antivenenos [35].

B. asper, es un ejemplar que resulta muy apropiado para estudiar. En el pasado ya se ha planteado que la variabilidad intraespecífica en el veneno de esta serpiente está ligada a los cambios en sus perfiles toxicológicos [24,25]. Con la presente investigación se pretende analizar, mediante ensayos proteómicos y toxicológicos, la variabilidad sexual y ontogénica en la composición del veneno de *B. asper* y sus implicaciones en la acción del antiveneno empleado en el país. Esto puede tener como consecuencia, complicaciones en los cuadros clínicos.

1.4. Objetivos de la investigación

1.4.1. General

Analizar la variabilidad en la composición, actividad de toxinas enzimáticas y el efecto en la coagulación sanguínea de venenos de *Bothrops asper* en relación a la sexualidad y edad de los ejemplares, así como su impacto en la eficiencia del antiveneno polivalente de referencia.

1.4.2. Específicos

1. Estudiar la composición molecular de 16 venenos de *B. asper*.
2. Caracterizar el efecto en la coagulación sanguínea inducido por estas muestras de veneno.
3. Evaluar y comparar la eficiencia del antiveneno polivalente de referencia (SAO-B) en la inhibición de la actividad enzimática y efecto coagulante de los venenos de *B. asper*.

CAPÍTULO II: MARCO METODOLÓGICO

2.1. Obtención de venenos

Las muestras de venenos disecados de *B. asper* fueron proporcionados mediante colaboración con el Instituto Nacional de Investigación “Dr. Leopoldo Izquieta Pérez” (INSPI). La Dra. María del Carmen Terán, analista de serpentario de la Gestión de Producción de Biológicos, fue la responsable de la identificación, toma de medidas e identificación sexual de los especímenes. Los ejemplares provienen de la parroquia Guale, provincia de Manabí (Figura 2) y se mantuvieron en cautiverio en el Zootecnario de Investigación Médica y Farmacéutica del INSPI ubicado en la ciudad de Guayaquil, bajo el permiso de mantenimiento de especímenes en cautiverio MAATE-UBVS-DZ5-2022-0165-M. Los venenos fueron aprobados para su uso y colecta bajo los permisos de investigación MAE-DNB-CM-2015-0017 y MAE-DNB-CM-2019-0115. Se trabajó con 16 venenos de *B. asper*, 9 hembras y 7 machos de diferentes tallas. La librería de venenos fue almacenada a -20°C . Cada veneno fue identificado por un código y color característico en relación a sexo/estadio para fines de identificación en este trabajo, los cuales pueden ser visualizados en la figura abajo.

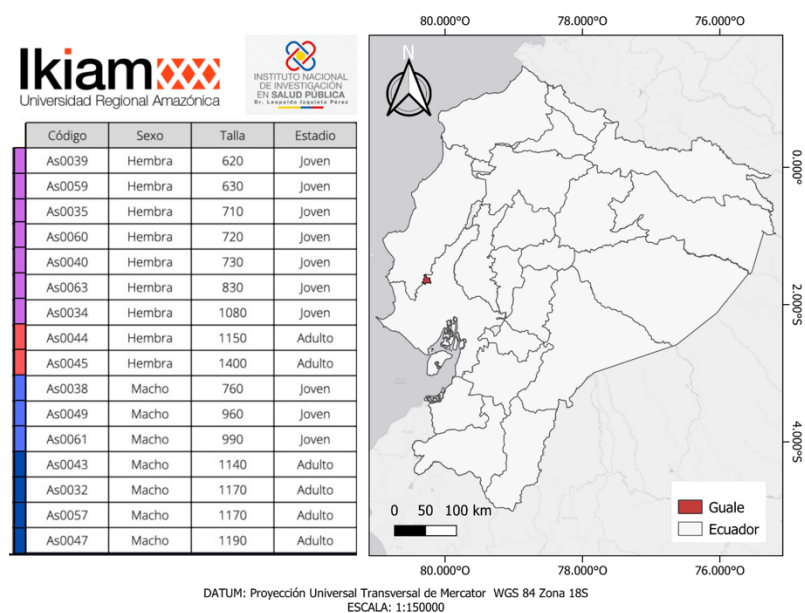


Figura 2. Identificación y sitio de colecta de los venenos de *B. asper* empleados en esta investigación.
Elaborado por: García, 2022.

Los venenos fueron colectados en Guale, Manabí. Se describe el código asignado, sexo, talla y estadio de los especímenes usados en esta investigación.

2.2. Fraccionamiento de veneno

Para este procedimiento se aplicó cromatografía líquida de alta eficiencia en fase reversa (RP-HPLC), empleando el método propuesto por Patiño, et al [62]. Como primera etapa, se disolvieron 3 mg de veneno liofilizado de *B. asper* en (200 µl) de ácido trifluoroacético (TFA) al 0,1% con acetonitrilo (ACN) al 5%, y se homogeneizó en vórtex. Mediante centrifugación a $10.000 \times g$ durante 10 min a temperatura ambiente se removió material insoluble como sales y se inyectó el sobrenadante en un inyector automático 510/B. La separación cromatográfica de los componentes proteicos del veneno se realizó en una columna de fase reversa C18 (250 x 4,56 mm), acoplada a un sistema de HPLC-PDA 991 (Waters). Las fracciones fueron monitoreadas con el uso de un detector UV (Waters) a una longitud de onda de 214 nm. Se emplearon dos solventes o fases móviles. El solvente A contenía ácido trifluoroacético (TFA) al 0,1% en agua y TFA al 0,1% en ACN para el solvente B como eluyentes a un flujo de 1 mL/min. Los picos con absorbancia representativa fueron recogidos de forma manual tomando en cuenta el volumen muerto. En seguida, fueron identificados y almacenados a una temperatura de -4°C. Posteriormente se concentraron hasta eliminar el exceso de solvente, se empleó un concentrador de succión (Genevac SP Scientific) a 30°C durante 24 horas.

2.3. Electroforesis

En la caracterización de las fracciones separadas en la etapa anterior y perfiles electroforéticos del veneno total se empleó la metodología propuesta por Patiño, et al [62]. Las fracciones fueron preparadas usando 45 µl de buffer de carga (1M Tris-HCl, pH 6,8; 87 % (v:v) glicerol; 20 % (m:v) SDS; 0,2% (m:v) azul bromofenol) y 5 µl de ditioneitol (DTT) como agente reductor. La muestra se homogeneizó por vortización y se llevó a 95°C durante 5 min en un termobloque (Thermo Scientific™). Se emplearon 20 µl de muestra y 5 µl de marcador (c). La electroforesis se realizó en una cámara vertical (BIO-RAD Mini-PROTEAN), usando un gel de corrida Bisacrilamida (30:0,8); 1,5 M Tris-HCl; 0,02 (m/v) SDS) y un gel de apilamiento (Stacking gel) Bisacrilamida (30:0,8); 0,5 M Tris-HCL; 0,2% (m/v) SDS. La separación inició a una intensidad de 35 mA, misma que aumentó cada hora en proporción 70, 110 y 120 mA, los geles se

colorearon con Azul brillante de Coomassie y se destiñeron en decolorante (40% (v:v) metanol y 10% (v:v) ácido acético).

2.4. Ensayos enzimáticos

2.4.1. Actividad caseinolítica

Para la evaluación de la actividad proteolítica se empleó azocaseína como sustrato, según lo descrito por Lomonte y Gutierrez [83]. Se diluyeron 35 mg de azocaseína en 7 mL de buffer (Tris-HCl 50mM pH 8,0). Las muestras de los ejemplares fueron disueltas en buffer A (Tris 50 mM pH 8,0) en una concentración (1:1) (m/v). Se colocaron 10 µl de veneno en cada eppendorf seguido de 90 µl de solución sustrato y se incubó a 37°C durante 90 min, se adicionaron 200 µl de ácido tricloroacético (TCA) al 5%, después de 5 min los tubos fueron centrifugados a 8000 rpm/5 min, se tomaron 150 µl de sobrenadante y se colocaron en la placa, la reacción se detuvo añadiendo 150 µl de NaOH 0,5M. La absorbancia se determinó mediante espectrofotometría a 450 nm y 37°C. Un blanco fue preparado con 10 µl de buffer A y 90 µl de sustrato para corregir los valores de absorbancia. Una unidad de actividad fue definida como la cantidad de veneno que transforma 0,005 unidades de absorbancia [63].

2.4.2. Actividad fosfolipasa A₂

La actividad fosfolipasa A₂, se determinó mediante el monitoreo de la acción enzimática del veneno incubado con un sustrato mimético compuesto por 3,069 mg de ácido benzóico, 4-nitro-3 [octanoiloxi] (NOBA) con 0,990 mL de acetonitrilo y 10 mL de buffer Tris HCl 10 mM con base en lo descrito por Silva et al [40]. Se usaron 20 µl de veneno disuelto en solución Buffer A en proporción 1:1 (m:v) disueltos en 200 µl de buffer B (Tris-HCl 10 mM, CaCl₂ 10 mM, NaCl 0.1 M, pH 8,0). Finalmente, se mezclaron en una microplaca de 96 pocillos. La absorbancia se midió a 405 nm y una temperatura de 37 °C. Un blanco fue preparado empleando 20 µl de Buffer A al que se le añadieron 200 µl de buffer B para corregir los valores de absorbancia. Los resultados se expresaron como el cambio de 0,1 unidades de absorbancia que equivalen a 25,8 nmoles de cromóforo [63].

2.4.3. Actividad L-amino oxidasa

La actividad L-amino oxidasa (LAAO), se determinó según lo descrito por Kishimoto y Takahashi [84], con algunas modificaciones. La mezcla (Buffer C) consistió en 20 mL de buffer 50 mM de Tris-HCl, pH 8.0, 5 mM de L-metionina como sustrato y 2mM de 4,5 dicloro ortofenilendiamina, y 0,8 U/mL de peroxidasa. Se añadieron 100 µl de solución sustrato y 20 µl de veneno disuelto en Buffer A. En el caso del blanco se emplearon 20 µl de agua destilada. La microplaca se incubó durante 60 min a 37°C. La reacción se detuvo empleando 50 µL de H₂SO₄ 2M, la absorbancia fue medida a 490 nm. Los resultados fueron expresados como nM de H₂O₂/min/µg de veneno.

2.4.4. Actividad serinproteasa

La actividad serinproteasa fue cuantificada basado en la capacidad del veneno para degradar el compuesto sintético benzoil -arginil-p-nitroanilida (L-BapNa) de acuerdo al protocolo de Munekiyo y Mackessy [85]. La solución de sustrato se preparó empleando 6,54 mg de BapNa en 150 µl de dimetilsulfóxido DMSO y 14,85 mL de buffer Tris-HCl. La actividad se midió mezclando 20 µl de veneno con 200 µl de sustrato y 50 µl de Tris-HCl. Para el blanco se usó 70 µl de buffer. La absorbancia se midió tras 30 min de incubación a 405 nm y una temperatura de 37°C.

2.5. Ensayo de coagulación

Para la evaluación de la actividad coagulante se empleó la metodología descrita por Géne et al [47]. Se recolectó sangre (O+) en tubos con citrato de sodio al 3,2 % y se centrifugó a 2000 g durante 10 min. Se empleó el plasma incubado durante 30 min a 37°C con 5 concentraciones de veneno en el rango de 0,5 µg/mL hasta 8 µg/mL. Se añadió a cada tubo 0,1 mL de soluciones de las diferentes concentraciones de veneno disueltas en PBS con 0,2 mL de plasma. El tiempo de coagulación fue registrado con un cronómetro. Los resultados se expresaron como la cantidad mínima de veneno capaz de coagular el plasma en 60 segundos.

2.6. Ensayos de neutralización

En los ensayos de neutralización se empleó el antiveneno de referencia usado en el país para tratar mordeduras reales de serpientes *B. asper*, importado del Instituto Clodomiro Picado. La fecha de elaboración del producto fue en noviembre del 2021 y la expiración en noviembre del 2026, Lote: 6781121POAG, REG.EC: GE-465-06-11. La presentación del producto biológico incluyó un frasco con antiveneno polivalente ofídico liofilizado y otro con 10 mL de solvente.

2.6.1. Neutralización de actividad enzimática

Los venenos fueron incubados por 30 minutos a una temperatura de 37°C en varias soluciones de antiveneno, el cual fue preparado añadiendo 10 mL de solución para reconstituir el reactivo, también se añadieron 20 mL de PBS. Se realizaron evaluaciones *in vitro* para la actividad caseinolítica con base en lo descrito por Bhatia et al [76] con algunas modificaciones. Se emplearon diferentes relaciones veneno:antiveneno (1:4, 1:2 y 1:1) donde se prepararon diferentes concentraciones de antiveneno en 20 µg de veneno. Los resultados de neutralización de actividad enzimática se mostraron como porcentajes en relación a los ensayos enzimáticos con únicamente veneno.

2.6.2. Neutralización de la actividad coagulante

Para este ensayo se empleó como referencia lo descrito por Bhatia et al [76] con algunas modificaciones. Se agregaron diferentes diluciones de antiveneno a la dosis desafío, 2 dosis mínimas coagulantes (2MCD) en las siguientes proporciones veneno:antiveneno 1:8, 1:4, 1:2 y 1:1, se incubaron a 37 °C durante 30 minutos. Se consideró un 100% de neutralización por antiveneno como un cambio de 3 veces en el tiempo de coagulación (TC) respecto a los ensayos de coagulación de solo veneno. El cambio de veces en el TC se determinó dividiendo el TC de las diluciones veneno:antiveneno con el TC de la dosis desafío.

2.7. Análisis estadístico

Para la ejecución de los análisis estadísticos individuales de resultados enzimáticos, se utilizó el programa GraphPad-Prism 9. Se optó por análisis de varianza de efectos aleatorios (ANOVA) y la significancia entre medias se evaluó mediante el análisis de Tukey $p < 0,05$ (para múltiples comparaciones). Por otro lado, los grupos entre ejemplares fueron analizados empleando el software Rstudio, un ANOVA multifactorial desbalanceado se necesitó debido a la heterogeneidad presente en los diferentes grupos analizados (Hembras, Machos, Adultos, Jóvenes). Los supuestos de homogeneidad y distribución normal, se analizaron empleando los test de Levene y Shapiro respectivamente. La distribución de los datos y la comparación de medias entre grupos se observan a partir de tablas y diagramas de cajas y bigotes. Se efectuó un análisis de componentes principales para entender de forma exploratoria los factores sexo y ontogenia con respecto a la actividad de cada una de las enzimas.

CAPÍTULO III: PRESENTACIÓN DE DATOS Y RESULTADOS

3.1. Perfil bioquímico de los venenos individuales de *B. asper*

Mediante la caracterización del perfil bioquímico de los venenos de *B. asper* por electroforesis (SDS-PAGE). Se evidenciaron las variaciones en la composición proteica individual (Figura 3). La variable sexual muestra una heterogeneidad baja a simple vista. Sin embargo, al analizar las bandas de los geles se pudieron determinar variaciones cuantitativas menores. Entre 15% más en hembras para el rango (13-17 KDa) asociado a fosfolipasa A₂ (PLA₂). Además, ≈3, ≈5 y ≈9% más para metaloproteasas tipo I (PI-SVMPs) (20-30 KDa), serinproteasas (SVSPs) (35 KDa) y metaloproteasas tipo III (PIII-SVMPs) (40-60 kDa) respectivamente en especímenes machos.

Por otro lado, al efectuar un análisis de la composición proteica de los venenos hacia una vertiente ontogénica empleando el software “ImageJ”. Resulta particularmente notorio la marcada presencia de moléculas asociadas al peso molecular de fosfolipasas A₂ (PLA₂) (13-17 kDa) con un 26% más en especímenes adultos respecto a los jóvenes. Mientras que ocurre lo opuesto en el rango de metaloproteasas tipo III (PIII-SVMPs) (40-60 kDa) donde los especímenes jóvenes experimentan un 14% más de estas proteínas con relación a los adultos. Las otras familias de toxinas se encuentran expresadas en las principales bandas que son características de los venenos bothrópicos y no poseen variaciones significativas para esta variable. Estas son: serinproteasas (SVSPs) (35 KDa) y metaloproteasas tipo I (PI-SVMPs) (20-30 KDa).

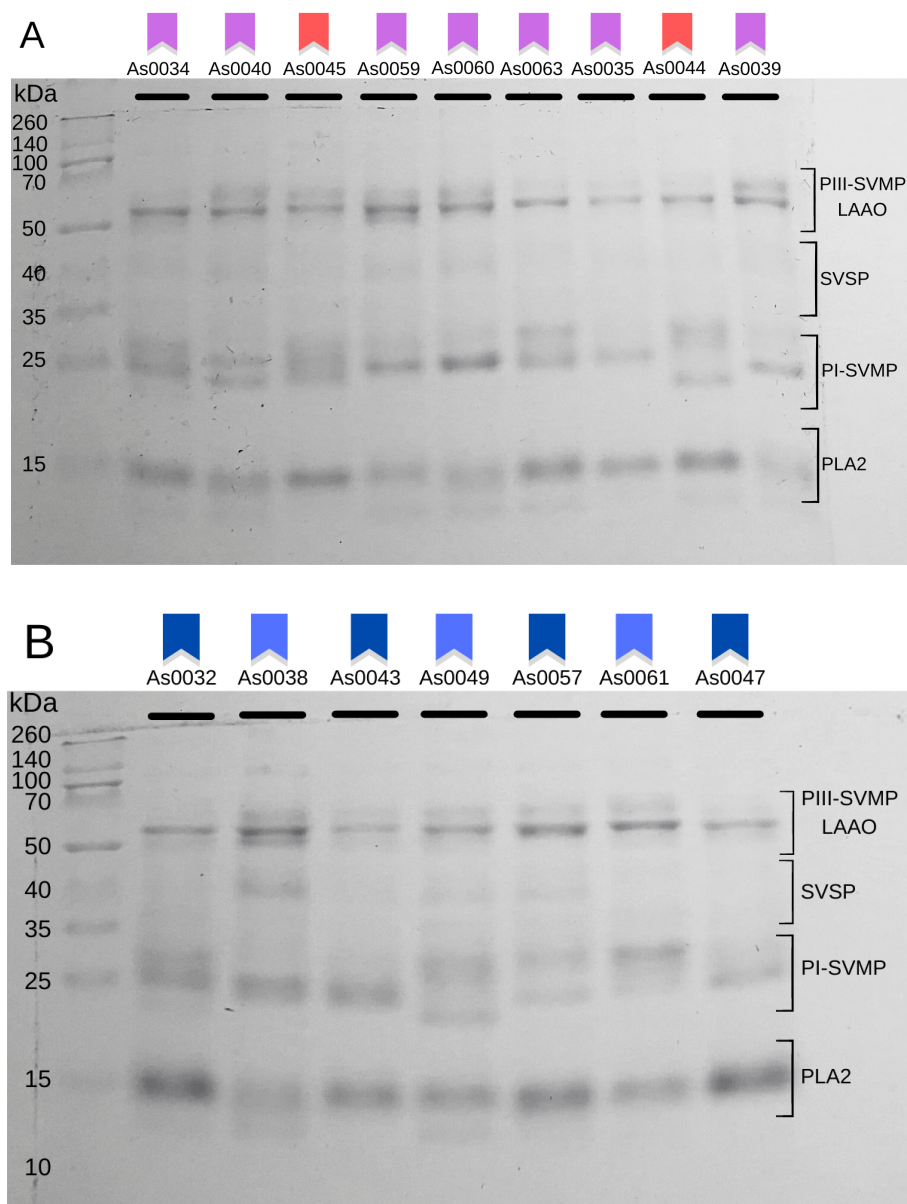


Figura 3. Geles de electroforesis de poliacrilamida (SDS-PAGE) de los venenos totales de hembras (A) y machos (B) en condiciones reductoras.

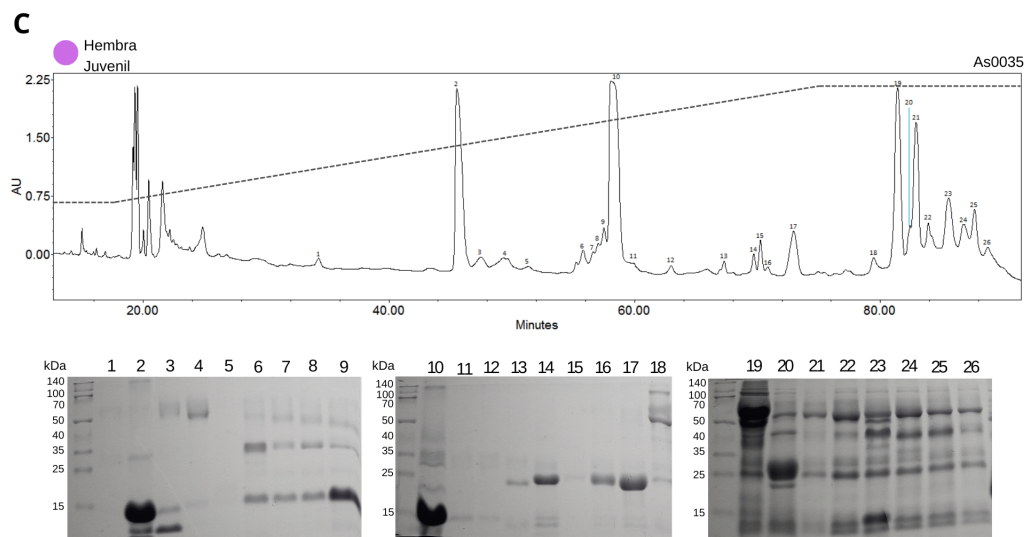
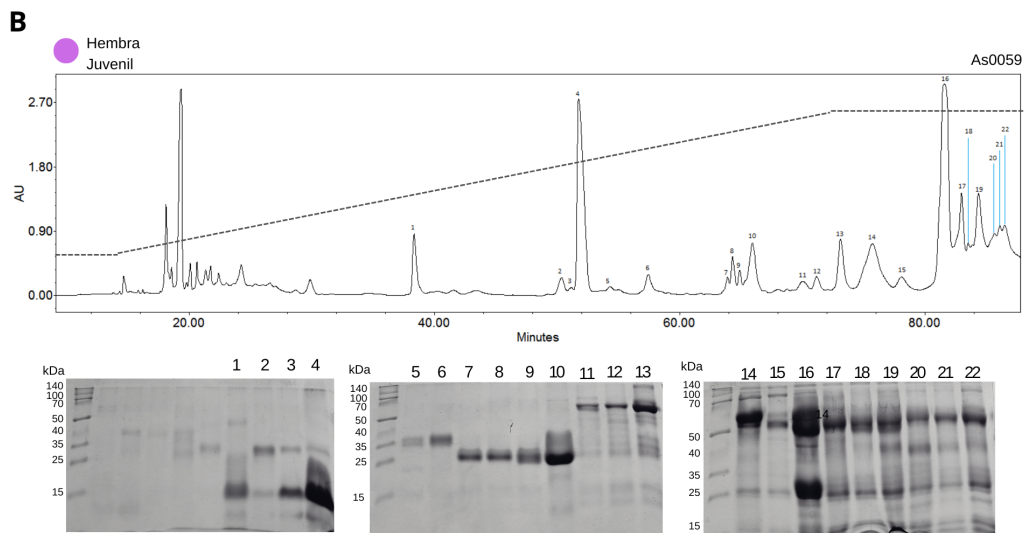
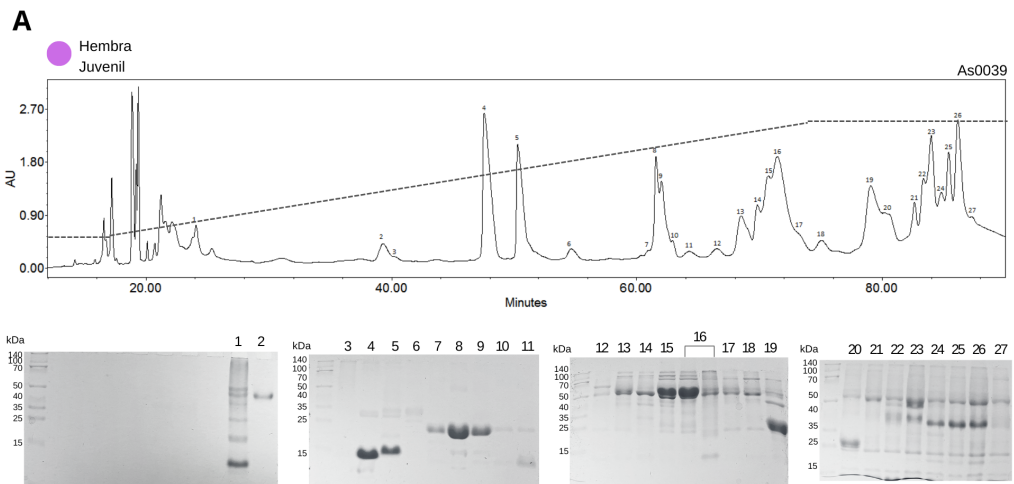
Elaborado por: García, 2022.

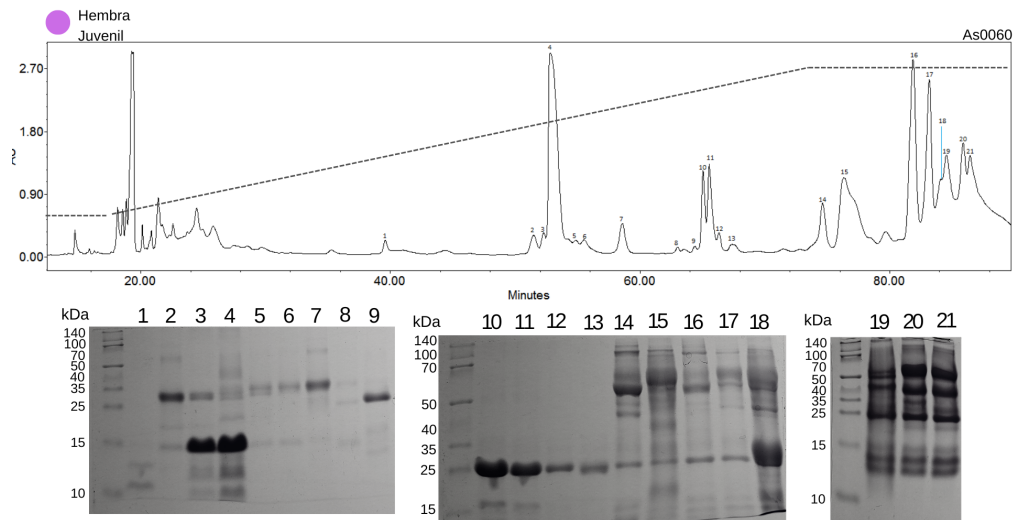
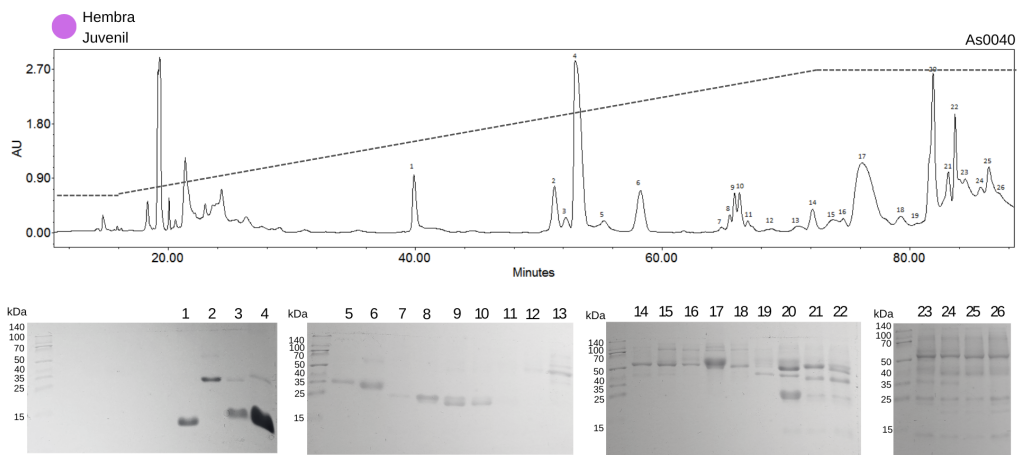
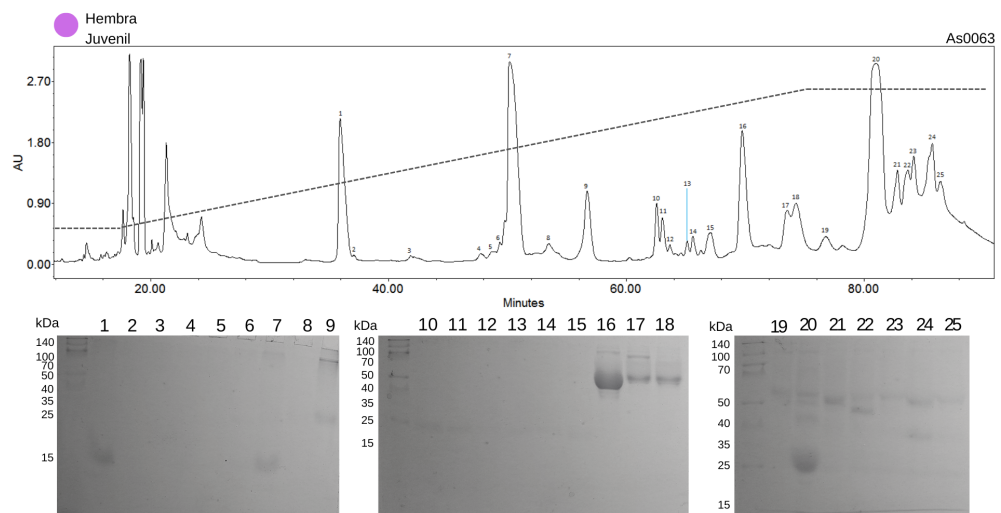
Se encuentran descritos los códigos del veneno para cada espécimen. Los resultados se expresan empleando colores en la parte superior de las bandas para su identificación. Hembras, jóvenes con tonalidades lilas y adultas con tonalidad carmesí. Machos, jóvenes con tonalidad azul claro y azul marino para adultos. Al lado izquierdo se describen los marcadores moleculares. Al lado derecho se encuentran los rangos asociados a las familias de proteínas más abundantes, estas son: fosfolipasas PLA₂ (13-17 kDa), metaloproteasas tipo I (PI-SVMPs) (20-30 kDa), serinoproteasas (SVSPs) (35 kDa) y metaloproteasas tipo III (PIII-SVMPs) (40-60 kDa).

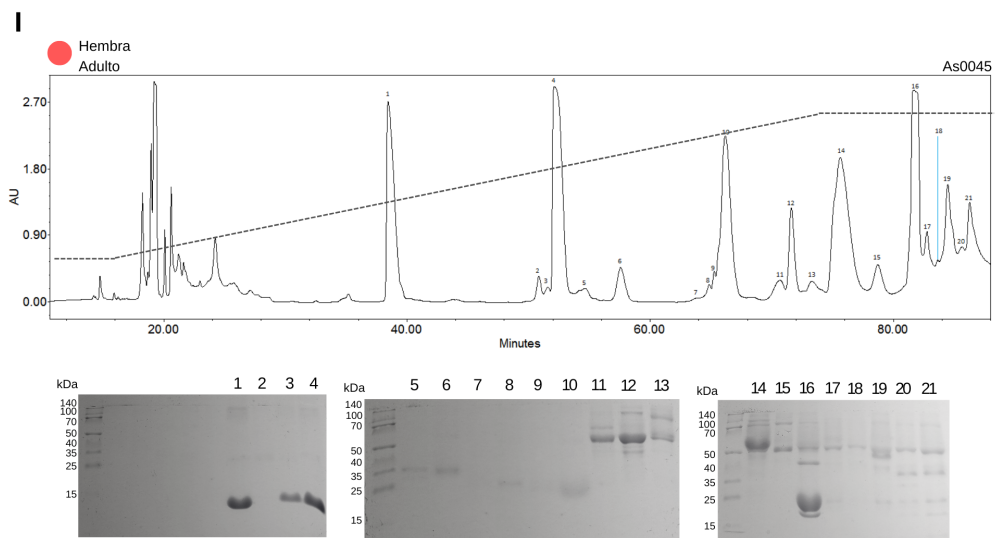
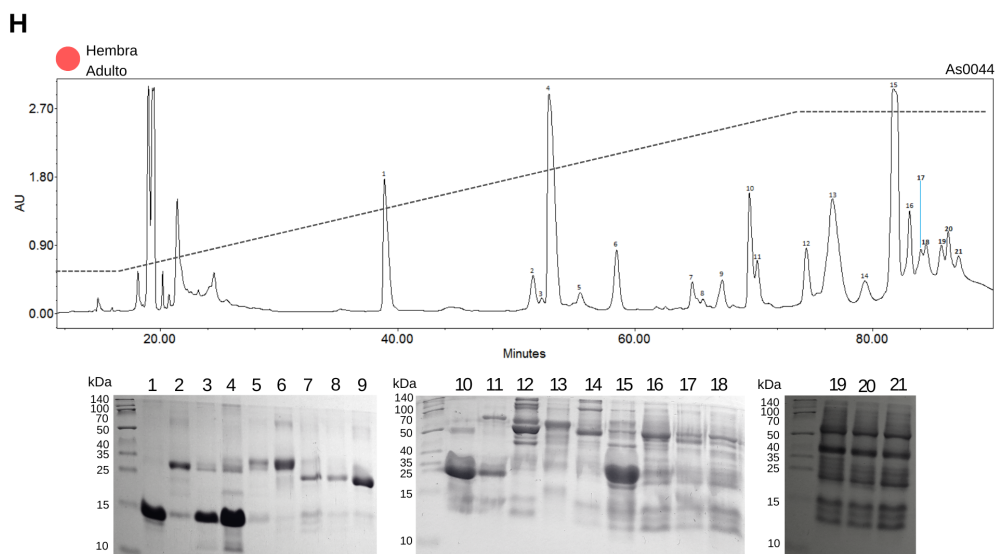
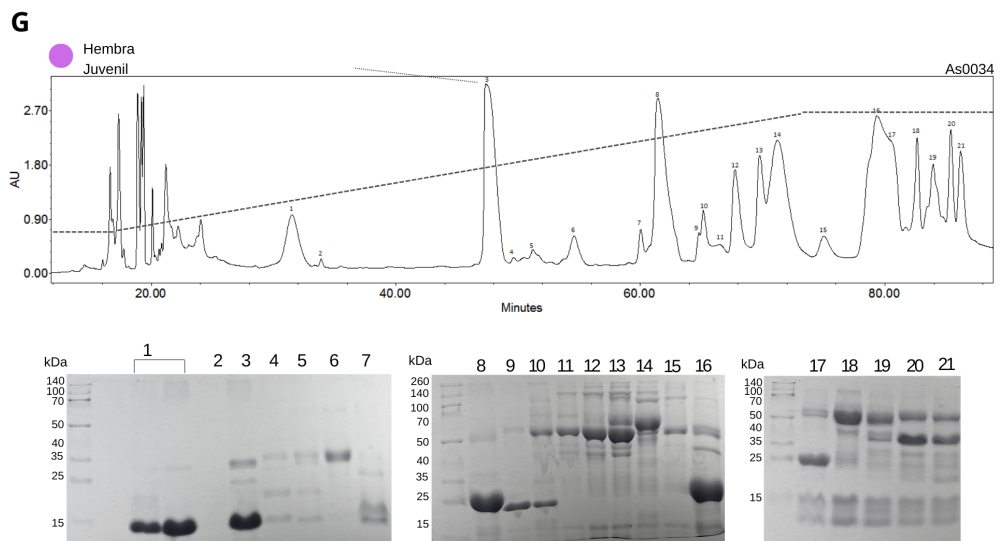
Las muestras de veneno presentan una notable variación individual, donde la ontogenicidad es la variable cualitativa y cuantitativa más evidente al analizar las intensidades de las bandas por grupos (jóvenes, adultos, machos y hembras) (Figura 3). Similar información se pudo evidenciar a partir del fraccionamiento del veneno mediante RP-HPLC. Donde la identificación de las familias proteicas más abundantes se realizó a partir de dos criterios: I) el tiempo de retención de cada familia y área bajo la curva; II) la presencia de bandas asociadas a su masa en los resultados individuales de electroforesis.

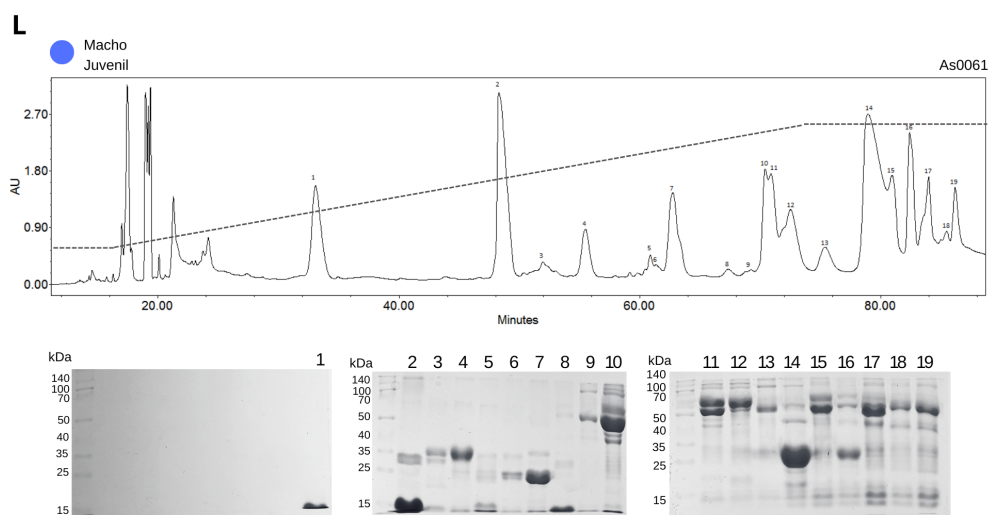
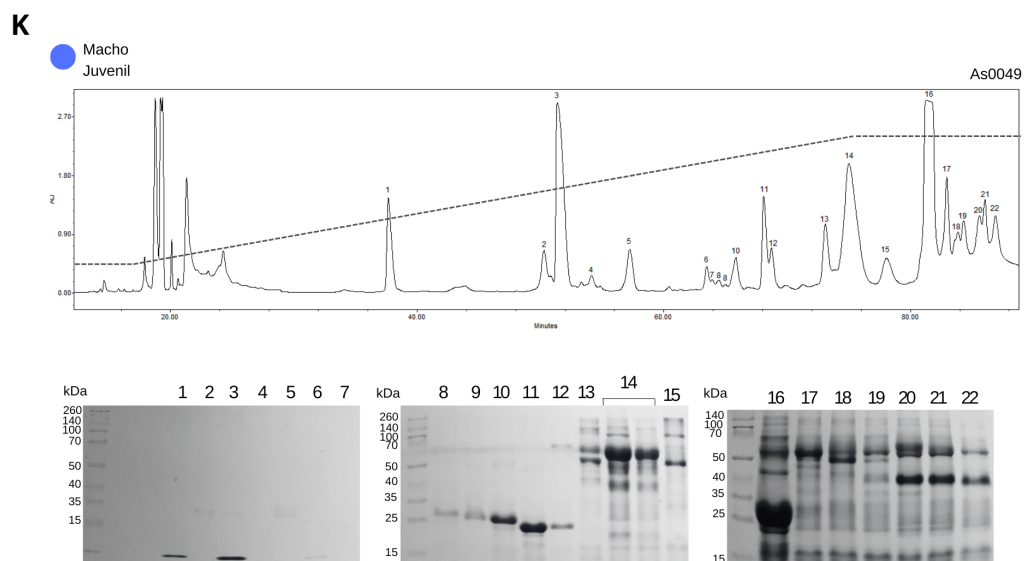
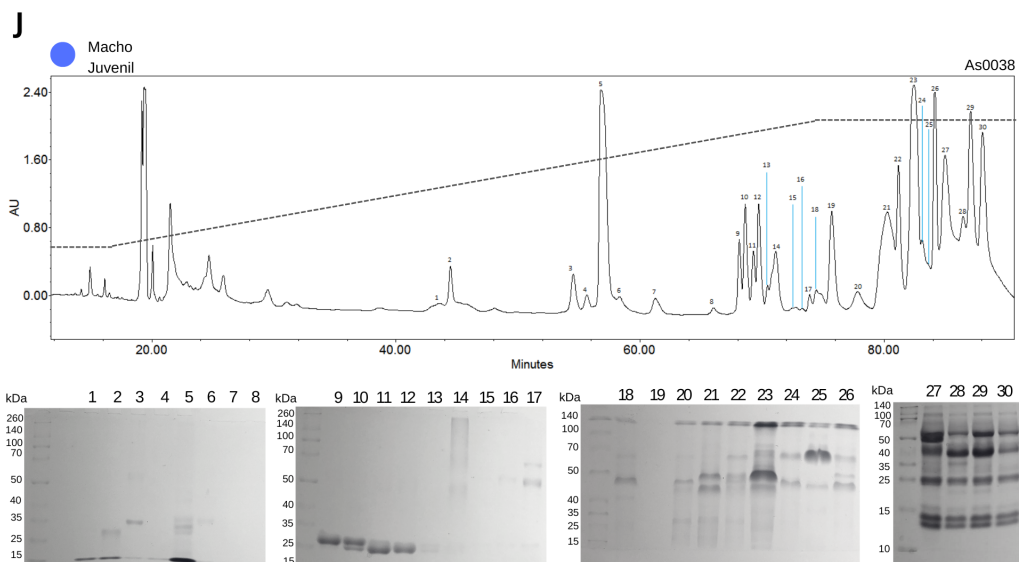
Los venenos de ejemplares juveniles, hembras (Figura 4 A-F) y machos (Figura 4 J-L) mostraron baja expresión en la familia proteica fosfolipasa PLA₂ perteneciente al tiempo de retención ≈40 minutos. Así mismo, al analizar las abundancias relativas de metaloproteasas del tipo III (PIII-SVMPs) (75–90 minutos) se puede distinguir la manifestación más abundante de estas en especímenes juveniles respecto a los adultos. Complementando esta información, se evidenció que las metaloproteasas (SVMPs) del tipo I y III características del tiempo de retención entre 65-90 minutos son las proteínas más abundantes en todos los cromatogramas. Por otro lado, la región de 45-60 minutos, donde eluyen proteínas SVSPs mostró perfiles variables entre los individuos jóvenes, tanto hembras como machos.

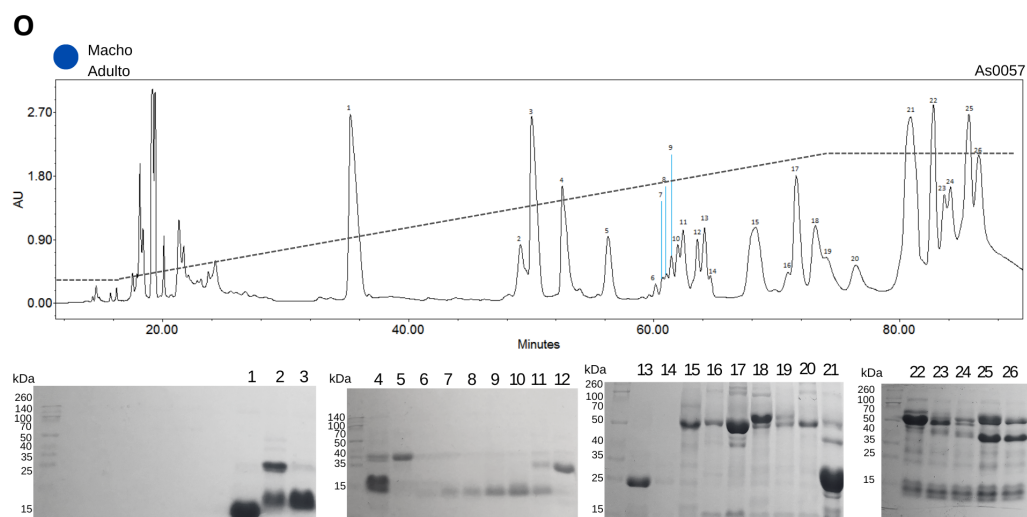
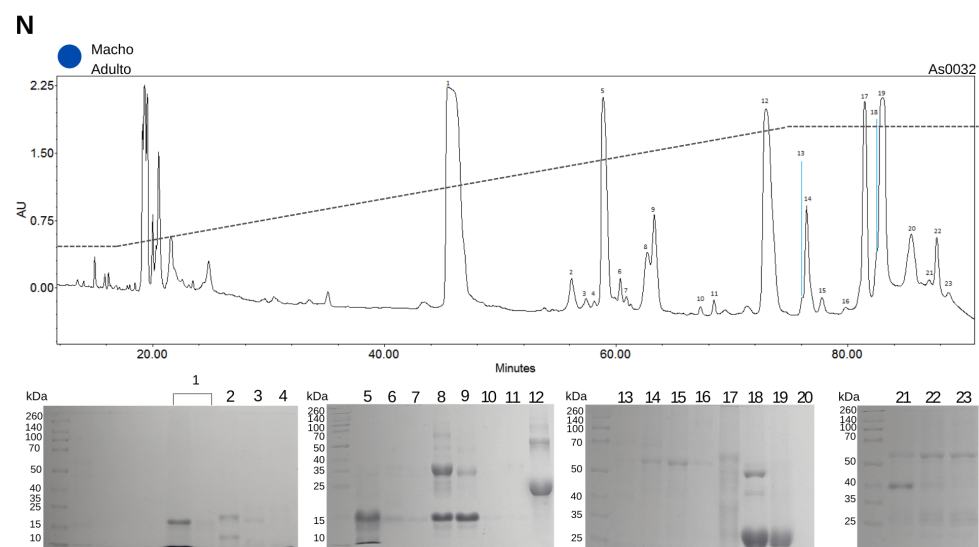
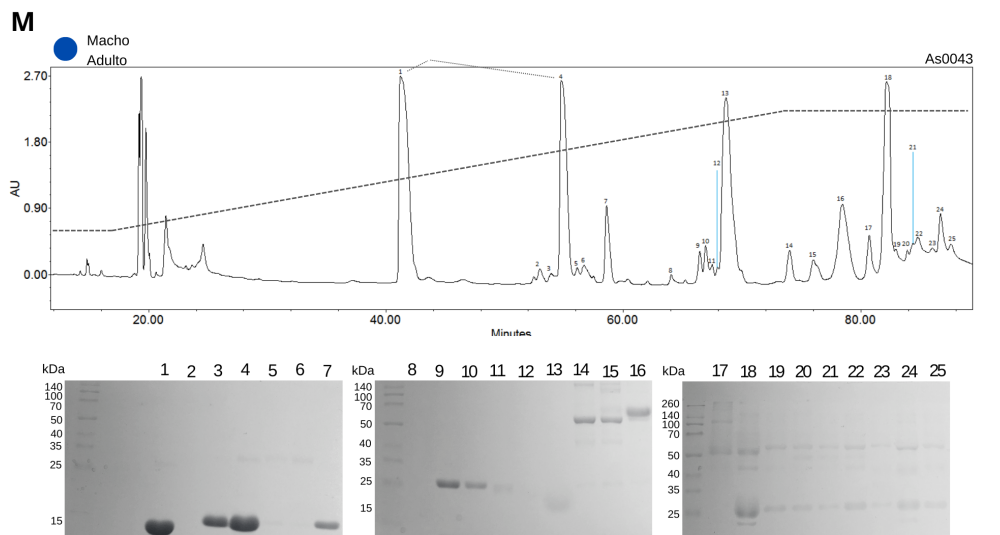
Al analizar los cromatogramas en grupos separados de hembras (Figura 4 A-I) y machos (Figura 4J-P) encasillados como adultos. Se observó que las hembras muestran una mayor abundancia de SVSPs que los machos. En definitiva, los resultados sugieren que la variabilidad ontogénica es elevada al analizar las proteínas K49-PLA₂ y metaloproteinasas tipo III. También se observa que la expresión de SVSPs es más abundante en venenos de especímenes hembras adultas.



D**E****F**







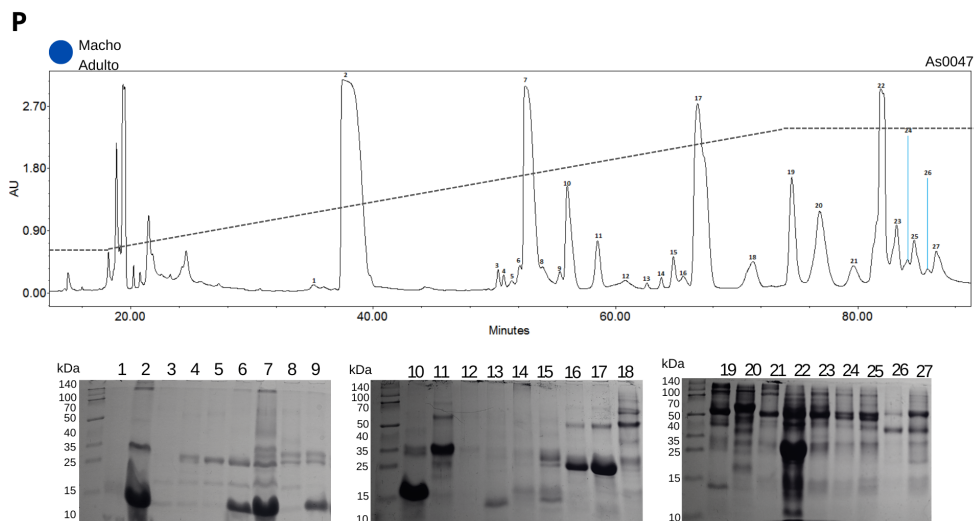


Figura 4. Perfiles cromatográficos de los venenos de individuos de *B. asper*.
Elaborado por: García, 2022.

El sexo, estadio y color asignado de acuerdo con el sexo/estadio de cada espécimen se indica en la esquina superior izquierda. Mientras que, el código de cada ejemplar se indica en la esquina superior derecha. Las corridas cromatográficas fueron monitoreadas a 214 nm y el gradiente de solvente empleado en el fraccionamiento se muestra con la línea discontinua. Los geles de electroforesis en condiciones reductoras muestran las proteínas contenidas en cada fracción. Los números en la parte superior de los geles corresponden a cada uno de los picos respectivamente.

3.2. Caracterización de la actividad enzimática de los venenos de *B. asper*

Los venenos de *B. asper* presentaron toxinas catalíticamente activas capaces de reaccionar con todos los sustratos empleados en esta investigación. En líneas generales, se observó variación individual en todos los ensayos enzimáticos, así como variabilidad a nivel ontogénico y sexual al aplicar análisis grupales.

La actividad PLA₂ que hidrolizó sustrato sintético NOBA (Figura 5A), al igual que sus ensayos homólogos demuestran la presencia de diferencias en las expresiones individuales de los venenos. Las muestras de veneno de hembras adultas, mostraron baja actividad con respecto a algunos venenos juveniles (As0035, 0053 y 0034). De forma general se evidenció una mayor expresión de enzima (D49-PLA₂) en el grupo del veneno de ejemplares machos, predominantemente en adultos.

La actividad L-aminooxidasas (LAAOs) (Figura 5B), evidenció mayor actividad en ejemplares juveniles machos y hembras. La muestra de veneno con menor intensidad

en los resultados es As0032. Mientras que, As0038 es la que mostró mayor actividad, en estos resultados también se evidencia variabilidad individual en los venenos. La actividad serinproteasa (SVSP) (Figura 5C) muestra grandes variaciones de actividad catalítica individual entre los especímenes. As0039, 0035 y 0060 en hembras, junto con As0038, 0043 y 0047 fueron las únicas muestras en expresar actividad.

Por último, en el ensayo caseinolítico (Figura 5D), la variación intraespecífica particular de cada veneno se hace más evidente. Por ejemplo, el espécimen As0059 fue el que mostró mayor actividad al escindir la azocaseína. También, el que menor actividad expresó fue la muestra As0039, ambas de veneno de hembras. Se aprecia mayor variación en los datos de hembras juveniles. La actividad enzimática en hembras adultas, así como de machos adultos, no fueron estadísticamente diferentes entre sí.

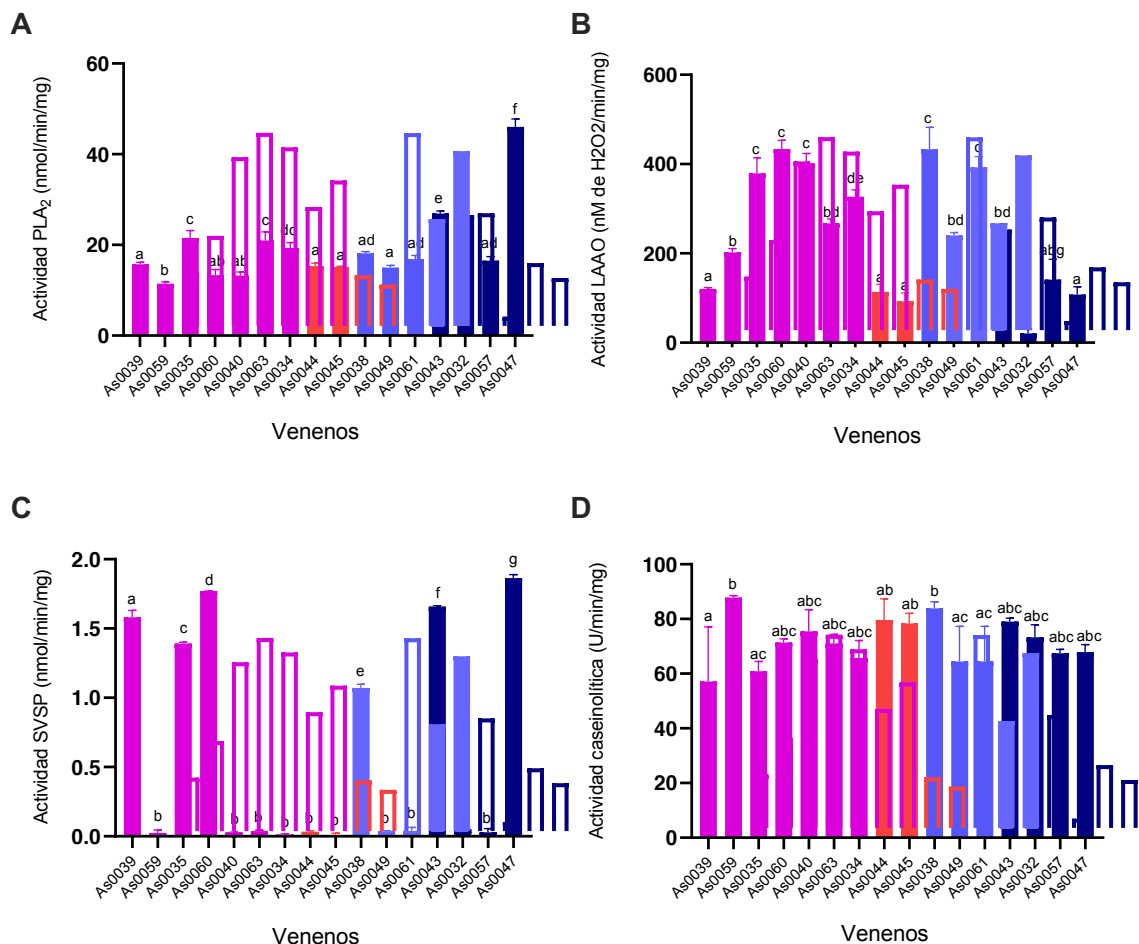


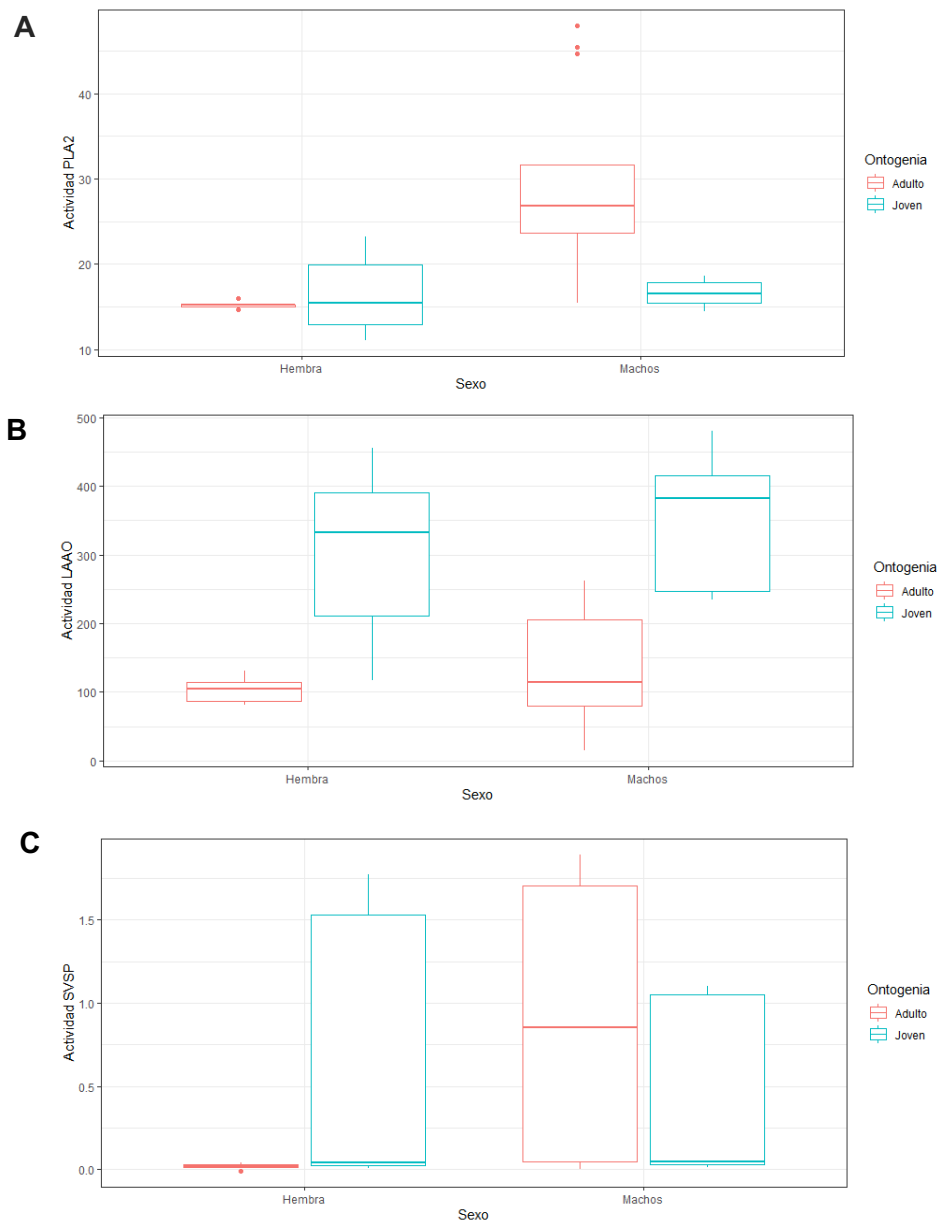
Figura 5. Caracterización enzimática de los venenos de ejemplares de *B. asper*.
Elaborado por: García, 2022.

Las actividades fosfolipasa (PLA₂) (A); L-aminooxidasa (LAAO) (B); serinproteasa (SVSP) (C) y caseinolítica (D) fueron evaluadas mediante métodos colorimétricos. El análisis se realizó empleando ANOVA, con una significancia de $p < 0,05$ para el test de Tukey. Las diferencias estadísticas se determinaron como significativas al comparar la actividad de las muestras entre sí, letras diferentes indican diferencias estadísticas. Los resultados se expresan usando colores en las barras, hembras jóvenes con tonalidades lilas y adultas con tonalidad carmesí, los machos se expresaron con azul claro para jóvenes y azul marino para adultos.

Se usaron diagramas de caja para ampliar la información grupal de los ensayos enzimáticos (Figura 6). Estos confirmaron lo que se describió previamente para venenos individuales. Para este análisis los venenos de ejemplares adultos se encuentran evidenciados con color naranja y los juveniles con azul.

El ensayo de actividad PLA₂ (Figura 6A) muestra alta actividad en machos adultos y menor actividad en hembras adultas. Los resultados muestran mayor distribución en los datos obtenidos de venenos de ejemplares hembras jóvenes y machos adultos. Las pruebas para LAAO (Figura 6B) mostraron ser simétricas entre ejemplares jóvenes y adultos por separado, los jóvenes son más abundantes en promedio. Además, la actividad SVSP (Figura 6C) mostró valores atípicos. Por último, en el análisis de la actividad caseinolítica (Figura 6D) se observa asimetría en los resultados. No obstante, las medias en la variable sexual difieren para hembras donde se evidencia alta acción enzimática en muestras de adultos. Por otro lado, en el caso de machos esta actividad se ve favorecida en los ejemplares juveniles.

Complementando la información antes mencionada, se realizaron análisis grupales de la actividad enzimática mediante ANOVA multifactorial desbalanceado, ya que el número de muestras no fue uniforme entre los grupos (Material suplementario (Tabla 1)). La actividad LAAO y caseinolítica fueron los ensayos que cumplieron el supuesto de homogeneidad de la varianza. En LAAO, la ontogenia muestra alta diferencia estadística. Por otro lado, la variabilidad individual presenta diferencia estadística al analizar el intercepto. La actividad caseinolítica se expresa en los datos con un valor de intercepto bajo, así como diferencia estadística en todos los factores analizados.



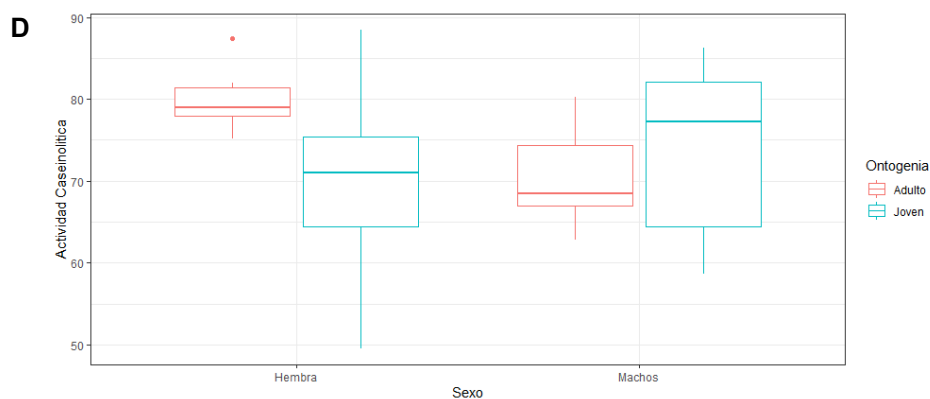


Figura 6. Análisis grupales para la variable “sexo y ontogenia” de ensayos enzimáticos mediante diagramas de caja y bigotes.

Elaborado por: García, 2022.

La actividad PLA_2 (A); LAAO (B); SVSP (C) y caseinolítica (D) de ensayos enzimáticos, fue evaluada por diagramas de caja y bigotes a partir de los datos de venenos individuales agrupados. Hembras y Machos se encuentran indicados en la parte inferior de cada imagen. Especímenes adultos están expresados en diagramas de color naranja, mientras que los especímenes jóvenes con color azul.

El análisis de componentes principales (Figura 7) permite analizar como se ve afectada la actividad enzimática LAAO, PLA_2 , SVSP y caseinolítica por los factores: sexo y ontogenia. Entre la componente 1, 2 y 3 del PCA se logra explicar un 91,1% de la varianza total de los datos.

El análisis se centra en comparar las principales diferencias entre los 3 componentes. PC1 se asocia a la variabilidad de los datos para los 4 ensayos enzimáticos comparados con PC2 que explica la expresión ontogénica y PC3 la expresión sexual. Mediante el análisis de los diagramas A, B, C y D se puede apreciar que los ensayos para SVSP y PLA_2 exponen variabilidad en la información analizada. Mientras que las actividades LAAO y caseinolítica son más uniformes.

Como se muestra en la parte A y E de la Figura 7, los valores mayores a -0.5 de la componente 2 (PC2) relacionan a las muestras de acción enzimática del grupo de serpientes jóvenes. Mientras que los datos que se encuentran en un rango inferior a dicho valor provienen de especímenes adultos. Basado en este análisis, la componente 2 se asocia con la ontogenia. Indicando que existe una diferencia de las actividades de las enzimas PLA_2 , LAAO y caseinolítica que está estrechamente relacionada con la diferencia de edad de la serpiente. Por ejemplo, en el apartado E, mientras más alto sea

el valor de actividad enzimática LAAO, mayor será la posibilidad de discriminación de que el individuo sea joven. Así mismo, mientras mayor sea el valor de acción de PLA₂, más notablemente se podrá distinguir que la serpiente sea adulta.

La influencia del sexo de la serpiente sobre la actividad de las enzimas no se pudo distinguir claramente en los clústeres por las elipses de normalidad en los PCA como sucedió con la ontogenia. No obstante, como se muestra en los diagramas D y F de la Figura 7, los valores que se encuentran entre el rango 1 y -1 de la componente 3 (PC3), se asocian en su mayoría a los especímenes hembras. En el caso de los machos, los valores están distribuidos a lo largo de toda esta componente. Es decir, PC3 resume el comportamiento de la actividad de estas enzimas en relación al género.

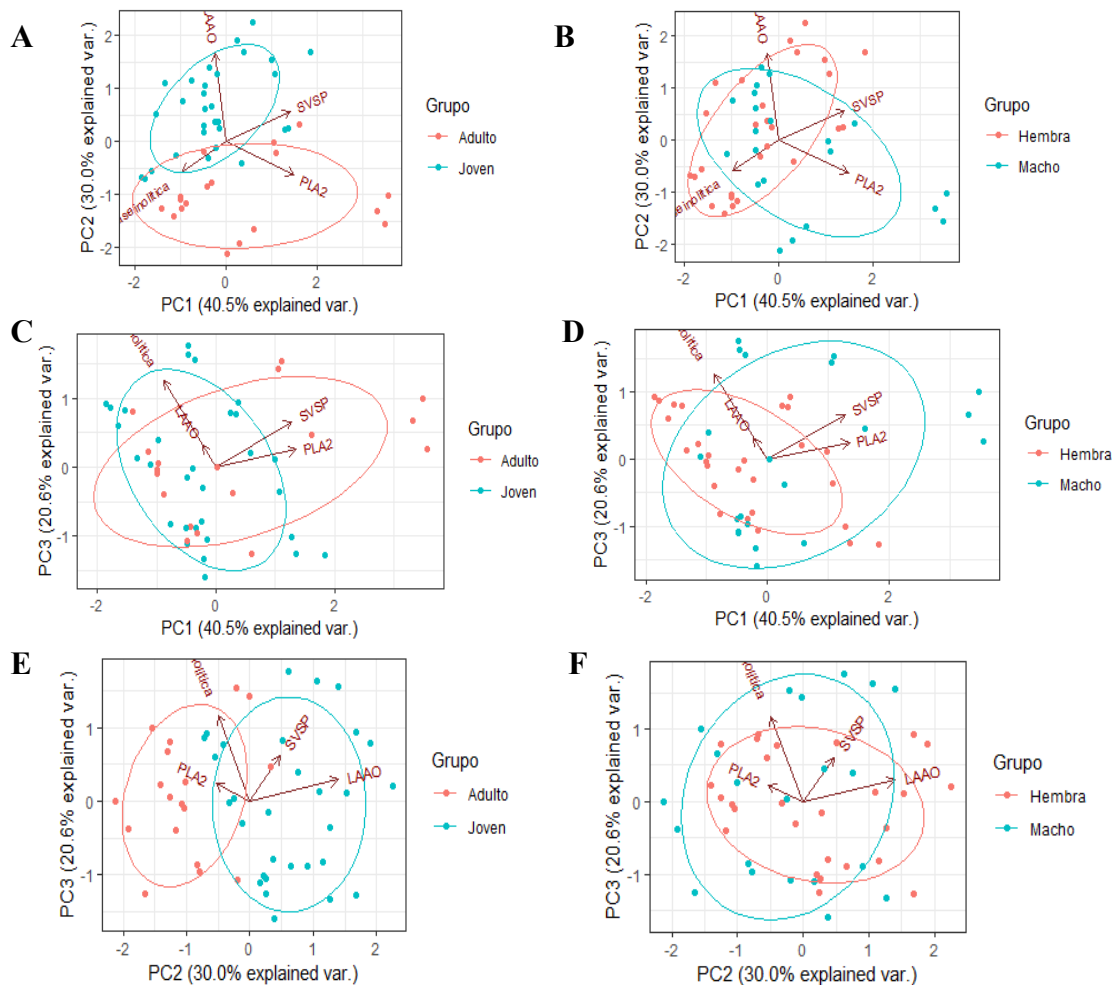


Figura 7: Análisis grupales de componentes principales (PCA) de ensayos enzimáticos.
Elaborado por: García, 2022.

El análisis de componentes principales compara las diferentes variables de esta investigación, siendo PC1 asociada a la variabilidad en los datos, PC2 explica la variabilidad ontogénica. Mientras que, PC3 la variabilidad sexual. A y B abarcan el 70,5 % de la información entre las componentes PC1 y PC2. Por otra parte, C y D explican el 61 % de la varianza entre PC1 y PC3. Finalmente, E y F explican el 50,6 % de la información de PC2 y PC3. Las elipses ayudan a visualizar las muestras más representativas de acuerdo a lo que se analiza. En la parte izquierda, una elipse naranja encierra los especímenes adultos (puntos naranjas) y uno azul los ejemplares jóvenes (puntos azules). En la parte derecha, una elipse naranja encierra muestras de hembras (puntos naranjas) mientras que uno azul, de machos (puntos azules).

3.3. Caracterización del efecto coagulante de los venenos de *B. asper*

La evaluación de la actividad mínima coagulante (MCD), expresó variación individual significativa. Demostrando mediante este ensayo las manifestaciones toxicológicas propias de los 16 venenos empleados (Figura 8). Los resultados expresan la cantidad de μg de veneno/mL de plasma, necesarios para coagular el veneno en un tiempo de 60 segundos. En general, el ensayo de coagulación reveló mayor actividad coagulante proveniente de ejemplares hembras, mostrando significancia estadística entre sus venenos para algunas muestras (As0039, As0035-40, As0034-0045). Las muestras pertenecientes a machos, en su mayoría carecieron de actividad importante sobre el plasma, excepto el espécimen As0043. Los ejemplares juveniles expresan similitud estadística, mientras que los adultos, diferencias.

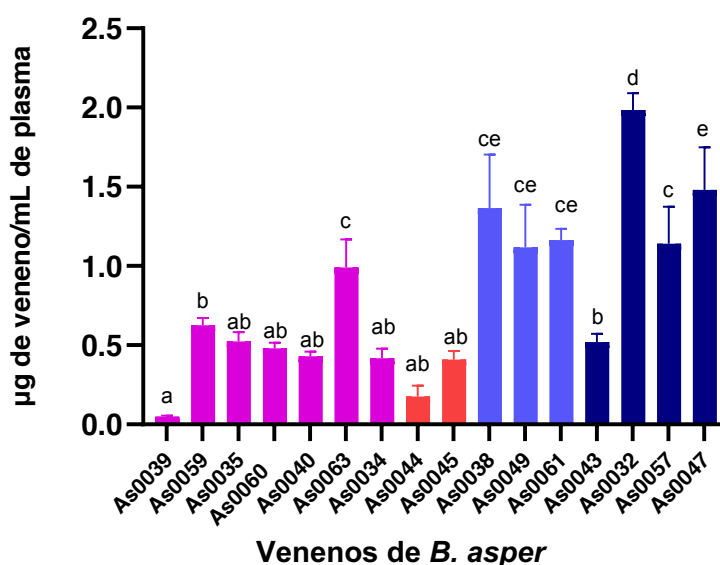


Figura 8: Caracterización del potencial coagulante de los venenos de *B. asper*.

Elaborado por: García, 2022.

El análisis se realizó empleando ANOVA, con una significancia de $p < 0,05$ para el test de Tukey, letras diferentes indican diferencias estadísticas. Los resultados se expresan empleando colores en las barras, hembras jóvenes con tonalidades lilas y adultas con tonalidad carmesí, los machos se expresaron con un azul claro para jóvenes y azul marino para adultos. Los tiempos fueron recolectados de forma manual empleando un cronómetro. El tiempo mínimo de coagulación (MCD) se registró como la cantidad mínima de veneno necesaria para coagular plasma citratado en un tiempo de 60 segundos.

3.4. Neutralización de la actividad enzimática por antiveneno

La neutralización se determinó mediante análisis de la capacidad inhibitoria para la actividad caseinolítica del antiveneno polivalente (ICP) (Figura 7). Al analizar las variaciones de manera individual se puede evidenciar que la actividad de las metaloproteasas ha disminuido considerablemente incluso desde la primera dilución. Los especímenes jóvenes muestran una mayor neutralización para esta proporción (1:1) (veneno:antiveneno), mientras que no se observó diferencia en el análisis sexual. La capacidad del antiveneno para neutralizar los venenos en la relación 1:2 mostró una capacidad neutralizante superior al 50% para todos los individuos. Sin embargo, las diferencias a nivel ontogénico y sexual en este caso ya no eran notorias. Finalmente, para la relación (1:4) de veneno:antiveneno, la mayoría de venenos alcanzaron el 100% de neutralización y las diferencias a nivel grupal son indiscernibles.

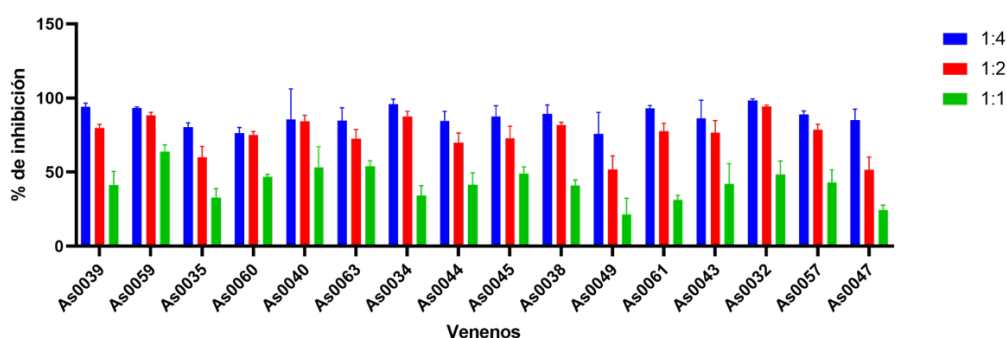


Figura 9: Disminución porcentual de la actividad caseinolítica por neutralización de antiveneno ICP.

Elaborado por: García, 2022.

La actividad neutralizante del suero antiofídico del Instituto Clodomiro Picado (ICP), se midió por porcentaje de reducción en la actividad proteolítica de 20 μg de veneno a diferentes diluciones de antiveneno. Los resultados representan barras de medias para cada caso y la significancia para cada relación veneno:antiveneno se analizaron mediante ANOVA unidireccional con una significancia de ($p < 0.001$). Los colores representan las proporciones veneno:antiveneno empleadas.

3.5. Neutralización de la actividad coagulante por antiveneno

Mediante ensayos de neutralización se midió la capacidad inhibitoria del antiveneno. Para este caso se emplearon cuatro diluciones (veneno:antiveneno) (Figura 8). Los resultados expresan variación en el cambio de los tiempos en relación al valor de 2(MCD) de cada veneno.

Para el primer caso, una relación 1:1 (veneno:antiveneno) las variaciones en los tiempos ya eran importantes, duplicando en casi todos los casos los tiempos de las muestras con veneno. Así también, en la relación 1:2 ya se muestra un cambio de 3 veces el tiempo de 2(MCD) en algunos de los venenos (As0059, 0035, 0040 y 0044) para hembras. Para los machos, los venenos individuales (As0038, 0049, 0043 y 0057) fueron los que ya demostraban un 100% de neutralización. Según el análisis grupal, los ejemplares jóvenes mostraron una mejor respuesta al antiveneno, siendo más largos los tiempos de coagulación. Este resultado se mantiene en la relación 1:4 donde se registró los mayores tiempos para los cocktails proteicos de hembras jóvenes.

Según el fabricante del antiveneno, una relación 1:3 (veneno:antiveneno) es necesaria para una neutralización del 100%. Dicha aseveración es corroborada en este ensayo, donde en una relación 1:3 se observó un 100% de efectividad del antiveneno en todos los casos.

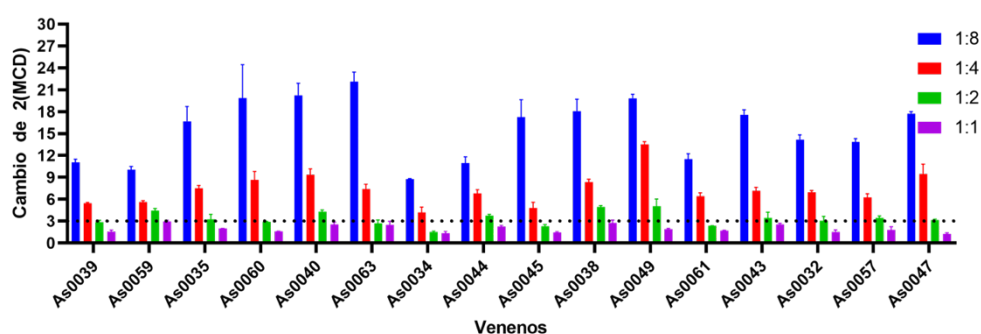


Figura 10: Cambio en los tiempos de coagulación del plasma por neutralización de antiveneno.

Elaborado por: García, 2022.

Los tiempos de coagulación se tomaron a partir de los ensayos previamente realizados. Para el análisis de neutralización se tomó el doble de MCD de cada veneno como dosis desafío y se incubó con diferentes concentraciones de antiveneno durante 30 min a 37°C. Se consideró un 100% de neutralización una vez que el antiveneno haya triplicado el tiempo de coagulación de la dosis desafío (línea punteada). Se evaluó la significancia para cada relación mediante ANOVA unidireccional con una significancia de ($p < 0.001$). Los colores representan las proporciones veneno:antiveneno empleadas.

CAPÍTULO IV: INTERPRETACIÓN Y DISCUSIÓN

El envenenamiento por mordedura de serpiente es una enfermedad prioritaria que afecta fundamentalmente a personas pobres que habitan regiones rurales. En los países de América Latina constituye un grave problema de salud pública. *B. asper* es una de las especies que causa más accidentes en la región [10]. En Ecuador, está catalogada como de alta importancia médica por su alta incidencia y factores que desencadena la inoculación del veneno [49]. Se ha demostrado que ciertas especies de serpientes experimentan cambios importantes en la composición proteica de sus venenos durante la transición de juveniles a adultos [52-56] y en menor proporción una variación sexual [44,56].

El veneno de *B. asper*, ha sido estudiado extensamente en otros países evidenciando una importante variabilidad intraespecífica (ontogénica y sexual) en los venenos de sus ejemplares [25, 50-51]. A pesar de los antecedentes presentados con anterioridad, en el país no existen estudios que analicen la variabilidad intraespecífica del veneno de *B. asper*. Este estudio, contribuye al desafío que supone el desarrollo de un potencial antiveneno de fabricación local, al establecer variaciones intraespecíficas de carácter sexual y ontogénico. Para esto se obtuvo el perfil bioquímico de 16 venenos: 9 hembras (7 juveniles y 2 adultas) y 7 machos (3 juveniles y 4 adultos).

Los resultados revelaron similitudes en la complejidad de los venenos de hembras y machos en los ensayos cromatográficos. Sin embargo, hubo diferencias notables en ejemplares con base en su ontogenicidad. Las muestras catalogadas como juveniles muestran menor presencia de bandas electroforéticas de la isoforma miotoxina K49-PLA₂. Mismo resultado mostrado en estudios anteriores donde los especímenes más jóvenes (menores de 10 días) tenían una actividad muy baja o nula de esta proteína [25,57]. Estos resultados demuestran una clara regulación ontogénica en la expresión de PLA₂ en *B. asper*. Los ejemplares jóvenes tienen mayor actividad letal, hemorrágica y proteolítica en relación a la actividad de las muestras de adultos, debido a la alta presencia de metaloproteinasas del tipo I y III (SVMP I y III) [58-59]. En este estudio se evidencia (figura 3 A y B) que las muestras machos/juveniles (As0038, 0049, 0061) y hembras/juveniles (As0034, 0035, 0039, 0040, 0059, 0060, 0063) expresan una presencia exacerbada de estas proteínas en relación a los ejemplares adultos.

Mediante trabajos que involucran a especímenes bothrópicos podemos saber que los primeros picos en los perfiles cromatográficos representan la expresión de desintegrinas. Continuando, en el rango de 30-50 minutos se encuentran expresadas las proteínas K49-PLA₂; en el tiempo de retención entre 50 a 60 min se encuentran las proteínas D49-PLA₂, SVSPs y algunas isoformas de SVMPs-PI. Finalmente, en los tiempos de retención entre 60 y 70 minutos se encuentran las proteínas SVMPs-PIII [60, 62-63, 79] estas últimas representan el mayor componente proteico de los venenos [25].

Los análisis cromatográficos son complementarios con los geles de electroforesis. Es decir, con la información de estudios previos y resultados propios de esta investigación, se puede asociar a los componentes venómicos con determinados picos. De esta forma se puede inferir que las principales familias proteicas presentes en cada individuo de *B. asper* se encuentran expresadas después del minuto 60, por lo que corresponden a proteínas SVMP-PI y PIII. Como se evidencia de igual forma en el estudio de Mora et al. [25] donde realiza un análisis de serpientes *B. asper* de Ecuador y del sur-este de Colombia y Alape et al [55] donde analizan los venenos de ejemplares de la región del Caribe y vertientes del pacífico de Costa Rica.

Los ensayos enzimáticos permiten identificar y comparar las diferencias funcionales de los venenos. Anteriormente esto ya se ha realizado en venenos del género *Bothrops* para análisis de variación sexual [63] y ontogénica [54, 56]. Se inició evaluando la actividad de fosfolipasa PLA₂, donde se demostró diferencias individuales en todas las muestras tratadas. Sin embargo, estos resultados tan solo muestran una fracción del potencial de esta proteína. Debido a que la actividad de esta enzima se ve reducida por su homónima (Lys-49) que no posee actividad catalítica y al sustituirla se pierde gran parte del potencial de unión al calcio. Un paso esencial en el mecanismo de hidrólisis y que es expresado por el sustrato NOBA [62, 66]. La enzima PLA₂ capaz de hidrolizar lípidos y por lo tanto catalíticamente activa es D49-Pla₂. Donde el grupo de veneno de machos presentó una mayor actividad que los venenos de hembras, mismo resultado ha sido mostrado para *B. atrox*, *B. moojeni* y *B. jararaca* [63, 81-82].

Por otro lado, las metaloproteasas se caracterizan por ser precursoras de hemorragia inducido por la degradación de fibrinógeno, escisión de proteínas de tejido, hemostasia entre otros [70, 71]. Las enzimas LAAO que se expresan en pesos moleculares altos, al

igual que las metaloproteasas tienen la capacidad de inducir e inhibir la agregación plaquetaria y edema [63]. Con lo anterior expuesto y con los resultados cromatográficos, electroforéticos y enzimáticos presentados en esta investigación. Se puede inferir que los ejemplares más jóvenes de *B. asper* tienen potencial hemorrágico y presentan alteraciones sistémicas importantes sobre sus presas, el mismo resultado se ha reportado para *B. jararaca* y *B. asper* [54, 55]. Un estudio demuestra que en la naturaleza el género *Bothrops* prefiere la alimentación de anuros en su etapa de desarrollo más temprano, con el tiempo las mismas crecen y su dieta se ve afectada perdiendo gran parte de su toxicidad (metaloproteinasas) [64].

Por otro lado, la actividad de las enzimas SVSPs demostró ser más abundante en hembras que en machos. Estas toxinas circulantes son precursoras de la formación de fibrina a partir de fibrinógeno y responsables de la agregación plaquetaria [72, 73]. La coagulación está directamente relacionada a la actividad SVSPs que convierten fibrinógeno así como serinproteasas que activan protrombina [74]. Finalmente, la actividad proteolítica sobre la caseína, que es un sustrato degradado por proteínas SVSPs y SVMPS [86, 87], mostró poca diferencia estadística entre los grupos analizados similar a lo descrito por Hatakeyama para *B. atrox* [63]. Aunque en este caso se observaron algunas variaciones individuales, sobre todo en muestras de juveniles.

Van de velde [75] mediante ensayos *in vivo*, detalla que existe una incoagulabilidad en ratones inoculados con veneno debido a un efecto antiagregante presente en el dominio-DC (Desintegrina y Cisteína) por las serinproteasas mediante la degradación de la matriz extracelular y acción sobre la células endoteliales. Esto impide la extravasación de sangre, es decir, la ausencia de hemorragia aumenta la coagulación. Tomando en cuenta lo antes explicado, los venenos de especímenes jóvenes son los precursores de actividad hemorrágica. Debido a la alta presencia de metaloproteasas, resultado que es apreciable en este estudio. Al analizar los ensayos de coagulación los ejemplares adultos sobre todo de hembras, fueron los que mostraron mayor actividad coagulante. El mismo resultado se ha evidenciado en un estudio realizado por Hatakeyama et al [63] para *B. atrox* y corresponde a una mayor presencia de SVSPs en hembras que en machos.

Se determinó la actividad neutralizante caseinolítica que está asociada con SVMPS y SVSPs, puesto que la caseína es degradada por estas familias proteicas [63, 77]. Los

resultados expresan la neutralización de los diferentes venenos, siendo los especímenes jóvenes (As0035, 0060 y 0049) los que no alcanzaron la máxima neutralización en una relación 1:4 (veneno:antiveneno). Esto sugiere que requieren una dosis superior de antiveneno para ser neutralizados por completo. Este resultado se relaciona con lo expuesto por Mora y colaboradores [79], donde la neutralización de *B. asper* es la más prominente para este tipo de antiveneno en específico.

Para la actividad coagulante, se consideró un 100% de neutralización una vez se haya triplicado el tiempo de coagulación de la dosis desafío 2(MCD) [76, 79]. La actividad inhibitoria del antiveneno demostró ser altamente efectiva para este ensayo logrando inhibir todos los venenos en una relación 1:4 (veneno:antiveneno). Bourke [78] demuestra que en comparación con otros antivenenos, el antiveneno polivalente ICP es el que refleja mayor neutralización sobre la actividad coagulante de *B. asper*. Sin embargo, también se demuestra que la inhibición del veneno no llega a ser tan elevada como para el caso de los ejemplares endémicos de donde proviene dicho antiveneno (Costa Rica).

CAPÍTULO V: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

La caracterización de venenos de ejemplares en cautiverio *B. asper* procedentes de Guale, Manabí, en la región costera del país. Evidenció variabilidad individual propia de cada espécimen, así como variabilidad ontogénica y sexual. Mediante los análisis cromatográficos se apreció una prominente presencia de fosfolipasa PLA₂ en especímenes adultos vs juveniles. En ejemplares juveniles se encontró una mayor presencia de metaloproteasas.

Al analizar las actividades enzimáticas, se identificaron variaciones en cuanto a los diferentes grupos analizados, lo cual comprobó que la actividad fosfolipasa con acción catalítica tiene mayor actividad en ejemplares adultos que en juveniles. Por otro lado, la caracterización de la actividad LAAO presentó actividad visiblemente más alta en veneno de ejemplares juveniles. Los ensayos de actividad SVSP y caseinolítica mostraron variabilidad individual, sin embargo, no se aprecia variación sexual u ontogénica estadísticamente significativa. Por otra parte, el ensayo de coagulación demostró que el plasma citratado coagula en menor tiempo en muestras de hembras con relación a los machos. Adicionalmente, se identificó que el antiveneno polivalente (ICP) no es del todo efectivo en ensayos proteolíticos. Por el contrario, en la neutralización de la actividad coagulante logró un 100% de inhibición en todas las muestras, al emplear como mínimo cuatro dosis de antiveneno con una de veneno.

En un futuro sería importante identificar las familias de toxinas usando LC-MS/MS con la finalidad de ser más específicos en la identificación bioquímica de los venenos. Además, se podría ampliar la presente investigación realizando pool's por grupo a analizar. Finalmente, se podría incluir ensayos toxicológicos con animales (ratones CD-1) para evaluaciones de letalidad, hemorrágicos y edema. Debido a la importancia de los accidentes ofídicos en el país, es necesario continuar con los trabajos de investigación con venenos y contribuir con información al desarrollo de posibles nuevos sueros antiofídicos de fabricación local.

REFERENCIAS:

1. Chippaux J, Williams V, White J. Snake venom variability: methods of study, results and interpretation. *Toxicon*. 1991; 29: 1279-1303.
2. Taoulis T, Isbister G. A Review and Database of Snake Venoms Proteome. *Toxins*. 2017; 9(9): 290.
3. Post Y, Puschhof J, Beumer J, Kerckamp H, G de Bakker M, Slagboom J, et al. Snake Venom Gland Organoids. *Cell*. 2020; 180(2): 233–247.
4. Gomes da mata E, Farias C, Rangel M, Ferroni E. Antiviral activity of animal venom peptides and related compounds. *J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis*. 2017; 23: 3.
5. Rodríguez S. Aspectos toxinológicos y clínicos de la mordedura por serpientes venenosas en animales domésticos. *Revista de la Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia*. 2006; 53: 105-115.
6. Tapia D. Mordedura de serpientes y sus complicaciones en pacientes atendidos en el centro de salud la Maná tipo C. Trabajo de titulación especial para la obtención del grado de magíster en emergencias médicas, Universidad de Guayaquil. 2016
7. Bhaumik S. Snakebite: a forgotten problem. *BMJ*. 2013; 346: 628.
8. Chippaux. Snake-bites: appraisal of the global situation. *Bull World Health Organ*. 1998; 76(5): 515-524.
9. Houghton P. *In vitro* testing of some West African and Indian plants used to treat snakebite. *Médicamentet nutrition:l'approche ethnopharmacologique*. 1993; 263: 24-27.
10. Gutiérrez JM. Envenenamientos por mordeduras de serpientes en América Latina y el Caribe: Una visión integral de carácter regional. *Bol Mal Salud Amb*. 2011; 51: 1-16.
11. Kasturiratne A, Wickremasinghe A, De Silva N, Gunawardena N, Pathmeswaran A, Premaratna R, et al. The global burden of snakebite: a literature analysis and modeling based on regional estimates of envenoming and deaths. *PLoS Medicine*. 2008; 5: 218.
12. Ministerio de Salud Pública. Subsecretaría de Vigilancia De La Salud Pública Subsistema De Vigilancia Sive-Alerta Efectos Tóxicos Año 2021 Introducción. En: Salud.gob.ec [Internet]. [citado 26 May 2022]. Disponible en: <https://www.salud.gob.ec/wp-content/uploads/2021/09/GACETA-GENERAL-EFECTOS-TOXICOS-SE-34.pdf>.
13. Warelli D. Snake Bite. *Lancet*. 2010; 375: 77-88.
14. Castro E, Benard M, Gil G, Borja M, Lopez J, Alagon A. Serpientes venenosas en México: Una revisión al estudio de los venenos, los antivenenos y la epidemiología. *Revista Latinoamericana De Herpetología*. 2020; 03: 05-22.
15. Gutiérrez JM, León G, Lomonte B, Angulo Y. Antivenoms for Snakebite Envenomings. *Inflammation & Allergy - Drug Targets*. 2011; 10: 369-380.
16. Gutiérrez JM, Solano G, Pla D, Herrera M, Segura A, Vargas M, et al. Preclinical Evaluation of the Efficacy of Antivenoms for Snakebite Envenoming: State-of-the-Art and Challenges Ahead. *Toxins*. 2017; 9: 163.
17. Williams D, Habib A, Warrelli D. Clinical studies of the effectiveness and safety of antivenoms. *Toxicon*. 2018; 150: 1-10.

18. Del Carmen Teran M, Lomonte B. Actividad letal de seis venenos de serpientes de importancia médica en el Ecuador. *Revista Ecuatoriana De Medicina Y Ciencias Biológicas*. 2016; 37: 25-29.
19. Uetz P, Freed P, Aguilar R, Hošek J. The Reptile Database. [citado 26 May 2022]. Disponible en: <http://www.reptile-database.org>.
20. Gutierrez JM. *Bothrops asper*: Beauty and peril in the Neotropics. *Toxicon*. 2009; 54: 901-903.
21. Vasquez H, Diaz L. Reporte de *Melanomys caliginosus* (RODENTIA:CRICETIDAE) en la dieta de *Bothrops asper* (SQUAMATA: VIPERIDAE) en las estribaciones noroccidentales de los Andes, Chitua, Santo Domingo de los Tsáchilas, Ecuador. *aci*. 2019; 11: 266-273.
22. Freire A, Kuch U. A note on the geographical distribution of *Bothrops asper* in Ecuador. *The SNAKE*. 1994; 26: 135-139.
23. Cisneros D, Touzet J. Distribution and conservation status of *Bothrops asper* in Ecuador. *HERPETOZOA*. 2004; 17: 135-141.
24. Sasa M, Wasko D, Lamar W. Natural history of the terciopelo *Bothrops asper* (Serpentes: Viperidae) in Costa Rica. *Toxicon*. 2009; 54: 904-922.
25. Mora D, Salazar D, Pla D, Lomonte B, Guerrero J, Ayerbe S, et al. Venom variation in *Bothrops asper* lineages from North-Western South America. *Journal of Proteomics*. 2020; 229: 103945.
26. Solorzano A, Cerdas L. Reproductive Biology and Distribution of the Terciopelo, *Bothrops asper* Garman (Serpentes: Viperidae), in Costa Rica. *Herpetologica*. 1989; 45: 444-450.
27. Ministerio de Salud Pública. Manejo clínico de pacientes con mordeduras de serpientes venenosas y picaduras de escorpiones. Protocolo basado en la evidencia. Primera ed. Quito: Dirección Nacional de Prevención y Control y Dirección de Normatización. 2017.
28. Rodríguez D, Reyes Y, Solorzano Y, Sanchez J. Accidentes ofídicos: una mirada hacia la epidemiología en Manabí. *Dom. Cien*. 2021;7: 169-181.
29. Cajas L, Leonidas L. Características clínicas epidemiológicas de los accidentes ofídicos bothropicos en el Servicio de Emergencia del Hospital Bsico de Sucua en el año 2013-2018. Trabajo de titulación-Medicina, Universidad Catolica de Cuenca. 2019.
30. Gomez A, Segura A, Solano G, Chacón D, Corrales G. Influence of sexual dimorphism on venom composition in *Bothrops asper* and *Crotalus simus* (Serpentes: Viperidae) and its potential implications on the snake antivenom production. *Toxicon*. 2021; 204: 1-4.
31. Mora D, Salazar D, Pla D, Lomonte B, Guerrero J, Ayerbe S, et al. Venom variation in *Bothrops asper* lineages from North-Western South America. *J proteomics*, 2020;229: 103945.
32. Girón A, Sanz L, Escolano J, Flores M, Madrigal M, Sasa, M. Snake Venomics of the Lancehead Pitviper, *Bothrops asper*: Geographic, Individual, and Ontogenetic Variations. 2008; 7(8): 3556–357.
33. Valarezo D, Pazmiño A, SarzosaV, Morales N, Acuña, P. Accidente ofídico en pacientes del Hospital Básico de Jipijapa (Manabí-Ecuador). 2017. *Correo Científico Médico*; 21(3): 647-656.
34. Organización Mundial de la Salud. Consejo Ejecutivo. Carga mundial de mordedura de serpiente. 2017. [citado 26 May 2022]. Disponible en: https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/274116/B142_17-sp.pdf.
35. Bhatia S, Vasudevan K. Comparative proteomics of geographically distinct saw-scaled viper (*Echis carinatus*) venoms from India. 2020. *Toxicon*; 7: 100048.

36. Kohlhoff M, Borges M, Yarleque A, Cabezas C, Richardson M, Sanchez, F. Exploring the proteomes of the venoms of the Peruvian pit vipers *Bothrops atrox*, *B. barnetti* and *B. pictus*. 2017. *Journal of proteomics*; 75(7): 2181-2195.
37. De Roodt A, Estévez J, Paniagua F, Litwin S, Carvajal A, Dolab, et al Toxicidad de venenos de serpientes de importancia médica en México. 2005. *Gaceta médica de México*; 141(1): 13-22.
38. Ofelia C Acosta de Pérez; Patricia Koscinczuk; Pamela Teibler; Marcial Sánchez Negrette; Raquel Ruiz; Silvana Maruñak; Guisella Bogarín. Actividades hemorrágica y edematizante y alteraciones histológicas en almohadilla plantar del ratón inducidas por venenos de serpientes de los géneros *Bothrops* y *Crotalus* de Argentina. 1998 , 36(8), 0–1172.
39. Yarlequé A, Clavo M, Lazo F, Millán B, Mendoza J, Vivas D, Ortiz C. Acción neutralizante de la toxicidad del veneno de *Bothrops atrox* por extracto de plantas amazónicas. *Revista de la Sociedad Química del Perú*. 2012; 78(4): 234-241.
40. Silva J, Abreu L, Rodrigues C, Galizio N, Aguiar W, Serino C, et al. Geographic variation of individual venom profile of *Crotalus durissus* snakes. 2020. *Journal of venomous animals and toxins including tropical diseases*; 26.
41. Del-Rei T, Sousa L, Rocha M, Freitas L , Travaglia S, Grego K. Functional variability of *Bothrops atrox* venoms from three distinct areas across the Brazilian Amazon and consequences for human envenomings. 2019. *Toxicon*; 164: 61-70.
42. Laines J, Segura A, Villalta M, Herrera M, Vargas M, Alvarez G, et al. Toxicity of *Bothrops sp* snake venoms from Ecuador and preclinical assessment of the neutralizing efficacy of a polyspecific antivenom from Costa Rica. *Toxicon*. 2014;88:34-7.
43. National Research Council Committee for the Update of the Guide for the C, Use of Laboratory Animals. Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. Washington (DC): National Academies Press (US) National Academy of Sciences. 2011.
44. Milene C. Menezes; Maria F. Furtado; Silvia R. Travaglia-Cardoso; Antonio C.M. Camargo; Solange M.T. Serrano (2006). *Sex-based individual variation of snake venom proteome among eighteen Bothrops jararaca siblings.* , 47(3), 0–312.doi:10.1016/j.toxicon.2005.11.007
45. Andrade y Chippaux. Snake bite envenomation in Ecuador. 2010. *Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*; 104: 588–591.
46. Chippaux J Estimating the global burden of snakebite can help to improve management. *PLoS Med* 2008;5:e221.
47. Gené J, Roy A, Rojas G, Gutierrez J, Cerda L Comparative study on coagulant, desfibrinating, fibrinolytic and fibrigenolytic activities of Costa Rican crotaline snake venoms and their neutralization by a polyvalent antivenom. 1989. *Toxicon*; 37: 841-848.
48. Ochoa-A, et al. Viperidae snakebites in Ecuador: A review of epidemiological and ecological aspects Angélica. 2020. *Toxicon*; 100051.
49. Arenas C , Gamboa L, Rivero C , López K Y Chiappa X. Estimating geographic patterns of ophidism risk in Ecuador. *NEOTROPICAL BIODIVERSITY*. 2008; vol. 4, No. 1: 55–61.
50. Segura A et al. Venom of *Bothrops asper* from Mexico and Costa Rica: Intraspecific variation and cross-neutralization by antivenoms. *Toxicon*. 2012; Vol 59: 155-162.

51. Gutierrez. J et al. Impact of Regional Variation in *Bothrops asper* Snake Venom on the Design of Antivenoms: Integrating Antivenomics and Neutralization Approaches; *J. Proteome Res.* 2010, 9, 1, 564–577.
52. Mackessy S. Venom ontogeny in the Pacific rattlesnakes, *Crotalus viridis helleri* and *C. viridis oreganus*. *Copeia* 1988: 92–101
53. Santoro. M et al. Ontogenetic Variation in Biological Activities of Venoms from Hybrids between *Bothrops erythromelas* and *Bothrops neuwiedi* Snakes. 2015. *PLOS ONE* 10(12): e0145516.
54. Zelanis A, Tashima A, Rocha M, Furtado M, Camargo Cho P. Analysis of the Ontogenetic Variation in the Venom Proteome/Peptidome of *Bothrops jararaca* Reveals Different Strategies to Deal with Prey. 2010 *J. Proteome Res.* 9, 5, 2278–2291
55. Alape A, Sanz L, Escolano J, Flores M, Madrigal M, Sasa M. Snake venomomics of the lancehead pitviper *Bothrops asper*: geographic, individual, and ontogenetic variations. 2008. *J proteome res.* Aug;7(8):3556-71
56. Tashima et al. Analyzing the influence of age and sex in *Bothrops pauloensis* snake venom. *Toxicon.* 2022;214:78-90.
57. Lomonte B y Carmona E. Individual expression patterns of myotoxin isoforms in the venom of the snake *Bothrops asper*. *Comparative biochemistry and physiology.* 1992; VOL:102.
58. Chaves Pathological and biochemical changes induced in mice after intramuscular injection of venom from newborn specimens of the snake *Bothrops asper* (Terciopelo). *Toxicon.* 1992; 1099-1109
59. Gutierrez J, Chaves F, Bolaños R. Estudio comparativo de venenos de ejemplares recién nacidos y adultos de *B. asper*. *Rev. Biol. Trop.* 1980; 28(2): 341-351.
60. Lomonte B, Calvete J. Strategies in 'snake venomomics' aiming at an integrative view of compositional, functional, and immunological characteristics of venoms. *J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis.* 2017; 23: 26.
61. Girón A, Díaz A, Sanz L, Madrigal M, Escolano J, Sasa M, Calvete J. Studies on the venom proteome of *Bothrops asper*: Perspectives and applications. *Toxicon.* 2009; 54(7), 0–948.
62. Patiño R, Salazar D, Medina E, Mendes B, Proaño C, da Silva S, Almeida R. *Bothrops atrox* from Ecuadorian Amazon: Initial analyses of venoms from individuals. *Toxicon.* 2021; 193: 63-72.
63. Hatakeyama D. Tanaka A. venom complexity of *Bothrops atrox* (common lancehead) siblings. *J. Venom. Anim. Toxins.* 2020. 26: e20200018.
64. Andrade D y Abe S. Relationship of venom ontogeny and diet in bothrops. *Herpetologica.* 1999; 55(20): 200-204
65. Neri E, Benard M, Alagón A, Gil G, Lopez J y Borja M. Serpientes venenosas en México: Una revisión al estudio de los venenos, los antivenenos y la epidemiología. Vol. 3 Núm. 2 (2020): *Anfibios y Reptiles: diversidad e historia natural*
66. Rodríguez et al. Isolation and structural characterization of bioactive compound from *Aristolochia aprucei* aqueous extract with anti-myotoxic activity. *Toxicon.* 2020. 1000049
67. Gutierrez J y Lomonte B. Envenenamiento ofídico en América Latina. *Animales venenosos de Brasil.* 310-323.

68. Fernandes C, Borges R, Lomonte B, Fontes M. A structure-based proposal for a comprehensive myotoxic mechanism of phospholipase A2-like proteins from viperid snake venoms. 2014. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*, 1844(12), 2265–2276.
69. Posas I. Caracterización toxicológica del veneno de *Crotalus ruber lucasensis* (Serpiente Viperidae:Crotalinae) de la península de Baja California, México.
70. Bellido C. et al. Purificación y caracterización de una hemorragina de alto peso molecular presente en el veneno de la serpiente *Bothrops pictus*. *Revista de la Sociedad Química del Perú*. 2016, vol. 82, no 2: 142-151.
71. Sanchez E, Elda E, et al. Caracterización bioquímica y biológica del veneno de la serpiente Neotropical Macagua (*Bothrops colombiensis*) de la región de Barlovento, estado Miranda, Venezuela. *Revista Cubana de Medicina Tropical*. 2015, vol. 67, no 2
72. Mackessy, Stephen P. Thrombin-like enzymes in snake venoms. En *Toxins and Hemostasis*. Springer, Dordrecht. 2010. 519-557.
73. Santos B, Serrano M, Kuliopulos A, & Niewiarowski S. Interaction of viper venom serine peptidases with thrombin receptors on human platelets. *FEBS letters*; 2000. 477(3): 199-202.
74. Markland F. Snake venoms and the hemostatic system. *Toxicon*; 1998. 36: 1749-1800.
75. Van de Velde A (2017). Rol de las metaloproteinasas hemorrágicas en las alteraciones hemostáticas inducidas por el veneno de *Bothrops alternatus*. 2017
76. Bhatia S, Blotra A & Vasudevan K. Evaluating Antivenom Efficacy against *Echis carinatus* Venoms—Screening for In Vitro Alternatives. *Toxins*; 2022. 14(7): 481.
77. Roldán O, Castro J, García J, Cruz S, Díaz F, Saldaña C & García T. Snake venom hemotoxic enzymes: Biochemical comparison between *Crotalus* species from central Mexico. *Molecules*; 2019. 24(8): 1489.
78. Bourke L, Zdenek C, Neri-Castro E, Bénard-Valle M, Alagón A, Gutiérrez J & Fry B. Pan-American lancehead pit-vipers: Coagulotoxic venom effects and antivenom neutralisation of *Bothrops asper* and *B. atrox* geographical variants. *Toxins*; 2021. 13(2): 78.
79. Mora-Obando D, Pla D, Lomonte B, Guerrero-Vargas J, Ayerbe S, & Calvete. Antivenomics and in vivo preclinical efficacy of six Latin American antivenoms towards south-western Colombian *Bothrops asper* lineage venoms. *PLoS Neglected Tropical Diseases*; 202. 15(2), e0009073.
80. Pornmuttakun D & Ratanabanangkoon K. Development of an in vitro potency assay for antivenom against Malayan pit viper (*Calloselasma rhodostoma*). *Toxicon*; 2014. 77: 1-5.
81. Amorim G, Costa R, Baiwir D, De Pauw E, Quinton L, & Sampaio V. Proteopeptidomic, functional and immunoreactivity characterization of *Bothrops moojeni* snake venom: Influence of snake gender on venom composition. *Toxins*; 2018 10(5): 177.
82. Furtado M, Travaglia-Cardoso S & Rocha M. Sexual dimorphism in venom of *Bothrops jararaca* (Serpentes: Viperidae). *Toxicon*; 2006. 48(4): 401-410.
83. Lomonte B, Gutiérrez JM. Proteolytic activity of snake venoms of Costa Rica on casein. *Rev Biol Trop*. 1983;31(1):37-40. PubMed PMID: 6364267.
84. Kishimoto M, Takahashi T. A spectrophotometric microplate assay for L-aminoacid oxidase. *Anal. Biochem*; 2001. 298, 136–139.

85. Munekiyo S y Mackessy S. Effects of Temperature and storage Conditions on the Electrophoretic, Toxic and enzymatic Stability of Venom Components. *Comp. Biochem. Physiol.* 1998; 119B, No. 1: 119–127.
86. Serrano S, Maroun RC. Snake venom serine proteinases: sequence homology vs. substrate specificity, a paradox to be solved. *Toxicon*; 2005.45(8): 1115–1132.
87. Fox J, Serrano S. Timeline of key events in snake venom metalloproteinase research. *J Proteomics*. 2009;72(2): 200–209.

ANEXOS

Tabla 1. Evaluación de actividades enzimáticas mediante ANOVA multifactorial desbalanceado

En el análisis de dos vías se obtuvieron los supuestos de homogeneidad y distribución normal en base a los siguientes valores de homogeneidad de varianza: 0.0026 - PLA₂, 0.02042 - SVSP, 0.0664 - LAAO y 0.05366 – Caseinolítica, valores mayores a un valor p de 0,05 se consideran válidos debido a que se acepta la hipótesis nula de que los datos presentan homogeneidad en la varianza, estos fueron la actividad LAAO y caseinolítica.

Fosfolipasa A₂ (PLA₂)				
Variable	Suma de Cuadrados	Valor F	Probabilidad	Significancia Estadística
Intercepto	1390,19	35,64	3,738E-07	0,001
Sexo	759,83	19,48	0,000065	0,001
Ontogenia	7,71	0,198	0,658892	0,01
Sexo:Ontogenia	454,84	11,66	0,001383	0,01
LAAO				
Variable	Suma de Cuadrados	Valor F	Probabilidad	Significancia Estadística
Intercepto	63840	7,077	0,01085	0,05
Sexo	3065	0,34	0,5629	1
Ontogenia	188882	20,94	0,00003857	0,001
Sexo:Ontogenia	1330	0,148	0,70283	1
SVSP				
Variable	Suma de Cuadrados	Valor F	Probabilidad	Significancia Estadística
Intercepto	0,0024	0,005	0,94687	1
Sexo	3,1028	5,749	0,02081	0,05
Ontogenia	2,1112	3,912	0,05424	1
Sexo:Ontogenia	3,4731	6,435	0,01481	0,05
Caseinolítica				
Variable	Suma de Cuadrados	Valor F	Probabilidad	Significancia Estadística
Intercepto	38450	459,8	2,00E-16	0,001
Sexo	366	4,376	0,04225	0,05
Ontogenia	478	5,71	0,02122	0,05
Sexo:Ontogenia	362	4,334	0,04321	0,05

Elaborado por: García, 2022.