



UNIVERSIDAD REGIONAL AMAZÓNICA IKIAM

FACULTAD DE CIENCIAS DE LA VIDA

INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

**CARACTERIZACIÓN DE VARIABILIDAD INTERESPECÍFICA
DEL VENENO DE TRES SERPIENTES DEL GÉNERO *Micrurus*
EN ECUADOR**

Proyecto de investigación previo a la obtención del título de:

INGENIERA EN BIOTECNOLOGÍA

AUTOR: JOSSELIN ALEJANDRA HERNÁNDEZ ALTAMIRANO

TUTOR: PHD. JOSÉ RAFAEL DE ALMEIDA

Napo – Ecuador

2022

DECLARACIÓN DE DERECHO DE AUTOR, AUTENTICIDAD Y RESPONSABILIDAD

Yo, JOSSELIN ALEJANDRA HERNÁNDEZ ALTAMIRANO, con documento de identidad N° 1600481392, 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, 30 de noviembre de 2022



Josselin Alejandra Hernández Altamirano

1600481392

CERTIFICADO DE DIRECCIÓN DE TRABAJO DE INTEGRACIÓN CURRICULAR

Certifico que el Trabajo de Integración Curricular Titulado: Caracterización de la variabilidad interespecífica del veneno de tres serpientes del género *Micrurus* en Ecuador, en la modalidad: Proyecto de investigación en formato tesis, fue realizado por: Josselin Alejandra Hernández Altamirano, 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, 30 de noviembre de 2022

José Rafael de Almeida

1757448954

AUTORIZACIÓN DE PUBLICACIÓN EN EL REPOSITORIO INSTITUCIONAL

Yo, Josselin Alejandra Hernández Altamirano, con documento de identidad N° 1600481392, en calidad de autora y titular de los derechos morales y patrimoniales del trabajo de titulación: Caracterización de la variabilidad interespecífica del veneno de tres serpientes del género *Micrurus* en Ecuador. De conformidad con el Art. 114 del CÓDIGO ORGÁNICO DE LA ECONOMÍA SOCIAL DE LOS CONOCIMIENTOS, CREATIVIDAD E INNOVACIÓN, reconozco a favor de la Universidad Regional Amazónica Ikiam una licencia gratuita, intransferible y no exclusiva para el uso no comercial de la obra, con fines estrictamente académicos.

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

Tena, 30 de noviembre de 2022



Josselin Alejandra Hernández Altamirano

1600481392

DEDICATORIA

*Este trabajo va dedicado a todas las personas
que sufren ansiedad y depresión;
y a quienes han sido nuestro grupo de apoyo
para poder hacer frente a esta enfermedad mental,
que ha sido minimizada y desvalorizada.*

*A mi familia, a mis padres Jacqueline Altamirano,
Eduardo Hernández, a mi hermano Jhoan Hernández,
a mi tía Wilma Altamirano y a mis abuelitos maternos,
Segundo Altamirano y Carmen Abril;
por ser el motor e inspiración para cumplir
mi sueño de ser Biotecnóloga.*

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a mi papá Dios, quien me ha dado la fuerza para levantarme cada día, quien me ha consolado y abrazado en mis días de oscuridad. Por acompañarme en mis logros y a Jesús por ser mi ejemplo a seguir. Gracias a Dios por todas las personas que ha puesto en mi vida.

Agradezco a mi tutor José Rafael de Almeida por ser el profesor que me inspiró a estudiar los venenos de serpientes y amar lo que hago. Por motivarme y creer que puedo hacer cosas increíbles. Por ser mi ejemplo a seguir, por enseñarnos a ser mejores personas. Porque cada vez que se paraba frente al pizarrón me contagiaba de su pasión por el estudio y la investigación.

A los técnicos de laboratorio Nina Espinosa de los Monteros, Giovanna Morán y especialmente a Evencio Medina por la paciencia que han tenido conmigo, por estar siempre dispuestos a ayudarme y enseñarme.

A mis buenos amigos que caminaron a mi lado en cada etapa de la Universidad, al grupo de Toxinología.

A Israel Morales por haber sido mi mejor amigo, por aconsejarme, levantarme el ánimo y acompañarme incondicionalmente.

Gracias familia, porque este logro no es solo mío, sino de todos ustedes.

TABLA DE CONTENIDO

CARÁTULA

DECLARACIÓN DE DERECHO DE AUTOR, AUTENTICIDAD Y

RESPONSABILIDAD..... ii

CERTIFICADO DE DIRECCIÓN DE TRABAJO DE INTEGRACIÓN CURRICULAR...iii

AUTORIZACIÓN DE PUBLICACIÓN EN EL REPOSITORIO INSTITUCIONAL..... iv

DEDICATORIA..... v

AGRADECIMIENTOS..... vi

TABLA DE CONTENIDO..... vii

1. CAPÍTULO I: PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN 1

1.1. Antecedentes 1

1.1.1. *Veneno y accidentes ofídicos* 1

1.1.2. *Ofidismo en Ecuador* 2

1.1.3. *Serpientes del Ecuador* 2

1.1.3.1. *Micrurus* 2

1.1.4. *Toxinas del género Micrurus* 4

1.1.4.1. *Neurotoxinas y envenenamiento* 4

1.1.4.2. *Dicotomía 3FTx y PLA2* 5

1.1.5. *Antivenenos anticoral* 5

1.1.6. *Micrurus en Ecuador* 7

1.1.6.1. *Micrurus lemniscatus* 7

1.1.6.2. *Micrurus mipartitus* 8

1.1.6.3. *Micrurus multiscutatus*10

1.1.7. *Venenos como fuente de inspiración*11

1.2. Planteamiento del problema a investigar12

1.3. Justificación de la investigación.....13

1.4. Objetivos de la investigación14

1.4.1.	General	14
1.4.2.	Específicos	14
2.	CAPÍTULO II: MARCO METODOLÓGICO	15
2.1.	Veneno de serpiente	15
2.2.	Fraccionamiento del veneno por RP-HPLC	16
2.3.	Electroforesis SDS-PAGE	17
2.4.	Digestión de proteínas	19
2.4.1.	<i>Digestión trípica en solución</i>	19
2.4.2.	<i>Digestión trípica en gel</i>	19
2.5.	Identificación de proteínas por Cromatografía Líquida acoplada a Espectrometría de Masas (LC/MS)	20
2.6.	Análisis de digeridos trípticos	20
3.	CAPÍTULO III: PRESENTACIÓN DE DATOS Y RESULTADOS	22
4.	CAPÍTULO IV: INTERPRETACIÓN Y DISCUSIÓN	35
5.	CAPÍTULO V: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	41
	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	42

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.	Asignación de las fracciones de RP-HPLC del veneno de <i>Micrurus lemniscatus</i> a familias de proteínas mediante secuenciación en LC-ESI-QTOF	24
Tabla 2.	Asignación de las fracciones de RP-HPLC del veneno de <i>Micrurus mipartitus</i> familias de proteínas mediante secuenciación en LC-ESI-QTOF.....	28
Tabla 3.	Asignación de las fracciones de RP-HPLC del veneno de <i>Micrurus multiscutatus</i> a familias de proteínas mediante secuenciación en LC-ESI-QTOF	31

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Distribución geográfica de los proteomas del veneno de <i>Micrurus</i> con predominio 3FTx/PLA2	3
Figura 2.	Distribución de <i>Micrurus lemniscatus</i> en Ecuador	8
Figura 3.	Mapa de distribución de <i>Micrurus mipartitus</i>	9
Figura 4.	Distribución de <i>Micrurus multiscutatus</i> en Ecuador	10
Figura 5.	Distribución de serpientes del género <i>Micrurus</i> colectadas en Ecuador.....	14
Figura 6.	Esquema del fraccionamiento de los venenos de <i>Micrurus</i> por RP-HPLC.....	15
Figura 7.	Esquema de la identificación de proteínas por SDS-PAGE en condiciones reductoras	17
Figura 8.	Esquema del proceso de digestión con tripsina y análisis MS/MS en el equipo LC-ESI-QTOF.....	20
Figura 9.	Perfil de elución del veneno de A) <i>M. lemniscatus helleri</i> B) <i>M. mipartitus</i> y C) <i>M. multiscutatus</i> fraccionados por RP-HPLC	21
Figura 10.	Fracciones de veneno de <i>M. lemniscatus helleri</i> separada por SDS-PAGE.....	22
Figura 11.	Fracciones de veneno de <i>M. mipartitus</i> separada por SDS-PAGE.....	22
Figura 12.	Fracciones de veneno de <i>M. multiscutatus</i> separada por SDS-PAGE.....	23
Figura 13.	Composición del veneno de A) <i>M. lemniscatus helleri</i> , B) <i>M. mipartitus</i> y C) <i>M. multiscutatus</i> acorde a la familia de proteínas	33

RESUMEN

Las serpientes del género *Micrurus*, con 85 especies son las principales representantes de la familia Elapidae en América del Sur. Los accidentes ofídicos causados por la mordedura por estas serpientes son poco probables, pero desencadenan un envenenamiento severo caracterizado por la alta neurotoxicidad. El presente trabajo tuvo como objetivo evaluar la variabilidad interespecífica de la composición y abundancia relativa de las toxinas presentes en venenos de serpientes coral. Los venenos de tres especies de serpientes del género *Micrurus*: *M. lemniscatus helleri*, *M. mipartitus* y *M. multiscutatus* de Ecuador fueron analizados por “snake venomomics”, una estrategia proteómica para determinar su composición. Las proteínas fueron separadas mediante RP-HPLC y SDS-PAGE, y digeridas con tripsina para su posterior análisis por espectrometría de masas en tándem (MS/MS) y asignación a familias de proteínas. En el veneno de *M. lemniscatus helleri* se encontraron seis familias de proteínas, donde las fosfolipasas A2 (PLA2) predominaron con 72,13%, mientras que en *M. mipartitus*, se hallaron cuatro familias de proteínas, donde las toxinas de tres dedos (3FTx) componen el 63,40% del proteoma total. Sin embargo, para *M. multiscutatus*, no se pudo realizar una buena identificación que determine la predominancia entre los fenotipos PLA2 y 3FTx. El conocimiento de la composición de los venenos de serpientes *Micrurus*, permitiría racionalizar la reactividad cruzada de los antivenenos poliespecíficos y mejorar su eficiencia para neutralizar los envenenamientos.

Palabras clave: Espectrometría de masas, *Micrurus*, fosfolipasa A₂, toxina de tres dedos, proteómica

ABSTRACT

Micrurus is a genus of venomous coral snakes with 85 species, making them the main representatives of the Elapidae family in South America. Ophidian accidents caused by coral snakes are unlikely, but they trigger severe envenoming characterized by high neurotoxicity. The objective of this study was to evaluate the interspecific variability of the composition and relative abundance of the toxins present in coral snake venoms. The venoms of three species of snakes of the genus *Micrurus*: *M. lemniscatus helleri*, *M. mipartitus* y *M. multiscutatus* from Ecuador were analyzed by “snake venomomics” a proteomic strategy to determine their composition. Proteins were separated by RP-HPLC and SDS-PAGE, and digested with trypsin for further identification by ESI tandem mass spectrometry (MS/MS) and assignment to known protein families. Six families of proteins were found in the venom of *M. lemniscatus helleri*, where phospholipases A2 (PLA2) predominated with 72,3%, while in *M. mipartitus*, four families of proteins were found, where three-finger toxins (3FTx) prevailed with 63,40%. However, for *M. multiscutatus*, a significant identification could not be made to determine the predominance between PLA2 y 3FTx. Knowledge of the composition of the venoms of species of the genus *Micrurus* would allow rationalizing the cross-reactivity of polyspecific antivenoms and improving their efficiency in neutralizing envenoming.

Keywords: Mass spectrometry, *Micrurus*, phospholipase A2, three finger toxins, proteomics.

1. CAPÍTULO I: PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

1.1. Antecedentes

1.1.1. *Veneno y accidentes ofídicos*

El veneno es considerado como una secreción compleja de proteínas, péptidos y otras moléculas con múltiples actividades biológicas. Este material biológico biodiverso es producido en una glándula exocrina especializada en las serpientes. Es usado principalmente con la finalidad de inmovilizar, matar y digerir a la presa, también como un mecanismo eficiente de defensa para atacar a posibles depredadores o enemigos [1,2]. Los venenos son fenotipos integrados, complejos y adaptativos que representan sistemas de interés valiosos para investigaciones multidisciplinarias de procesos evolutivos, ecológicos, bioquímicos, farmacológicos, biotecnológicos y epidemiológicos. Estos cuentan la transformación de genes ordinarios en toxinas mortales, sus efectos fisiopatológicos y aplicaciones [3].

El envenenamiento ocasionado por la mordedura de serpiente u ofidismo es una fuente de gran impacto en la morbilidad y mortalidad de los seres humanos [4]. Por tanto, destaca como un problema de salud pública y es reconocido por la Organización Mundial de la Salud (OMS) en la categoría más alta de enfermedades desatendidas (NTD), [5,6], especialmente es relevante en las zonas tropicales y subtropicales en el mundo. Se estima que cada año más de 1,8 y 2,7 millones de personas sufren envenenamiento por mordeduras de serpientes, resultando en una estadística significativa representada por alrededor de 400000 discapacidades y entre 81000 y 138000 muertes [7]. Sin embargo, la cifra real de casos puede ser más alta, dado que esta patología adolece importantes problemas de subregistro y afecta en su mayoría a habitantes de zonas socioeconómicamente vulnerables con poca accesibilidad a sistemas de salud adecuados. De acuerdo a estudios epidemiológicos, la población de trabajadores rurales que se encuentran realizando sus actividades en campo, son generalmente los más afectados [5,8]. Por tanto, los venenos no solo causan impactos catastróficos a las víctimas, sino que también pueden comprometer el futuro de sus familias y comunidades [3].

1.1.2. Ofidismo en Ecuador

El ofidismo en Ecuador aún permanece como un problema de salud pública que no ha sido correctamente atendido ni controlado. Sin tomar en cuenta los casos no notificados, se estima según estadísticas hospitalarias, que ocurrieron de 1400 a 1800 casos del año 2014 al 2019, con una incidencia promedio de 9,1 casos por cada 100000 habitantes y una mortalidad promedio de 0,07 [9]. En el 2020 se registraron aproximadamente 1438 casos de mordedura de serpiente, siendo la Costa y la Amazonía, las regiones con mayor incidencia anual con 49,39% y 37,44% respectivamente, el 16,3% del total de los casos se clasificó como mordedura de serpiente grave. Donde el grupo de edad más afectado es el de 20 a 49 años, predominando el sexo masculino relacionado con factores de exposición laboral [10]. Cabe recalcar que no existe información referente a las comorbilidades asociadas como amputaciones y traumas psicológicos [3,11].

1.1.3. Serpientes del Ecuador

Ecuador es uno de los países megadiversos del mundo, tiene el mayor número de especies de reptiles por unidad de área. Existen alrededor de 240 especies de serpientes, siendo 36 venenosas y se registran dos familias de interés toxicológico: Elapidae y Viperidae, con 19 y 17 especies respectivamente [1,12]. Se encuentran distribuidas en todas las provincias del país, a excepción de Galápagos, donde solo está presente la serpiente marina *Hydrophis platurus* [11,13]. Las serpientes género *Bothrops* de la familia Viperidae, como *B. asper* conocida como equis y *B. atrox* como pitalala, son las que ocasionan el mayor número de accidentes (Valencia et al., 2016). Por el contrario, las serpientes de la familia Elapidae reflejan menor incidencia en accidentes ofídicos con menos de 1% de los envenenamientos [14].

1.1.3.1. *Micrurus*

La familia Elapidae se considera un grupo monofilético que cuenta con 55 géneros, el género *Micrurus* es el más diverso con 85 especies (registradas en Reptile Database), distribuidas desde el sur de Estados Unidos hasta el norte de Argentina [15,16], pero sólo 18 han sido estudiadas con la finalidad de determinar su perfil proteico [17–19]. Varios países latinoamericanos conocen la composición de los venenos de corales presentes en sus territorios. Sin embargo, Ecuador no se encuentra en el mapa (Fig. 1).

En el país se registran 18 especies de corales [1]. Generalmente no presentan comportamiento agresivo, sino que son considerados como animales dóciles, que usan su veneno como mecanismo de defensa y alimentación. Por tanto, los accidentes ofídicos en humanos es poco probable, a menos que sean provocados o por descuidos [1,16,20]. Sin embargo, son serpientes que desencadenan un envenenamiento severo en humanos, caracterizado por la alta neurotoxicidad [2,18,21–24], se estima que 5 mg de veneno pueden ser letales [15]

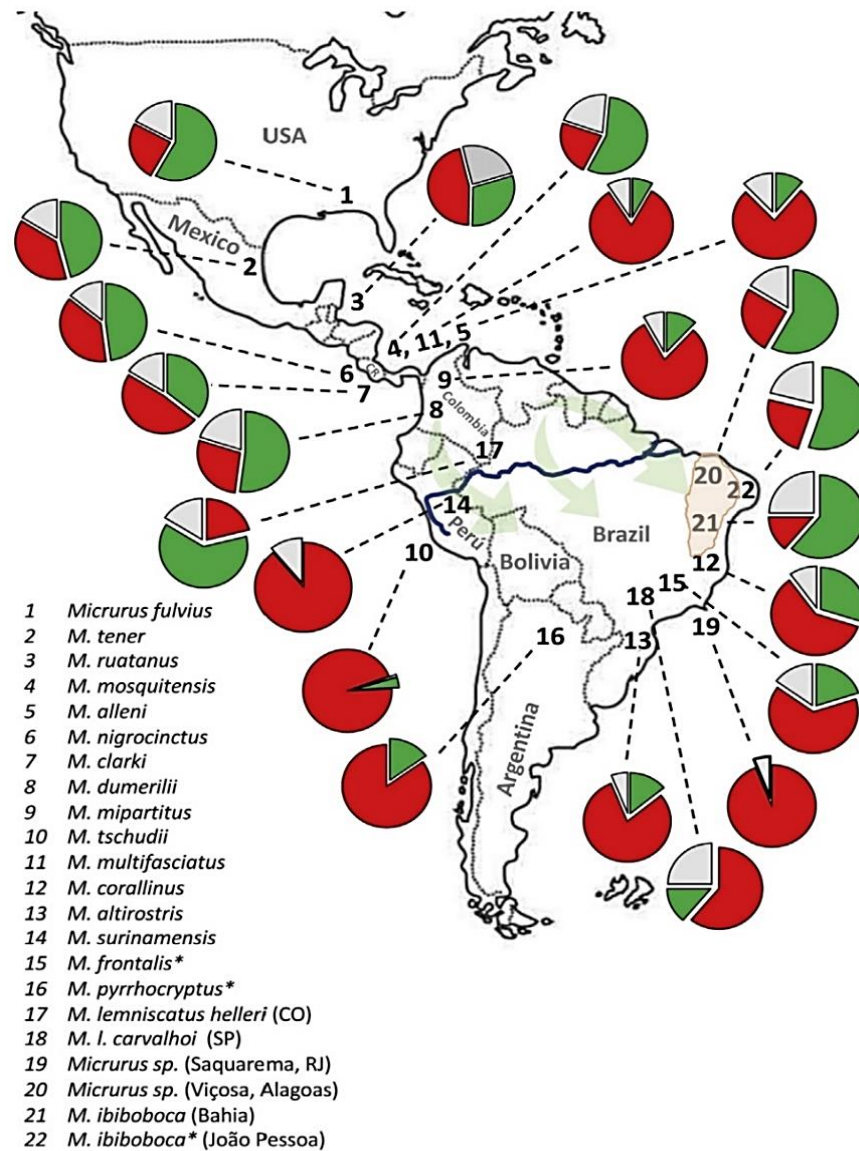


Figura 1. Distribución geográfica de los proteomas del veneno de *Micrurus* con predominio 3FTx/PLA2. Los gráficos de pastel muestran la ocurrencia relativa de 3FTx (rojo), PLA2 (verde) y otras familias (blanco).

Fuente: Sanz et al., 2019.

1.1.4. Toxinas del género *Micrurus*

De las 18 especies de serpientes del género *Micrurus* que han sido estudiadas [17,19], se encontraron 22 familias de proteínas, donde se halló un promedio de 6-8 familias, reportando un mínimo de 3 y un máximo de 11 familias de proteínas diferentes por especie. Las toxinas de tres dedos (3FTx) y las fosfolipasas A₂ (PLA₂) son las únicas familias que se encuentran presentes en todas las especies estudiadas [16]. Las demás familias de proteínas comunes, pero no omnipresentes, incluyen metaloproteinasas (MP), L-amino oxidasas (LAO), inhibidores de serina proteasa de tipo Kunitz (Kun), serin proteasas (SP) y proteínas de tipo lectina tipo C (CTL) [17,25–27].

1.1.4.1. Neurotoxinas y envenenamiento

Las α -neurotoxinas, también conocidas como 3FTx, se caracterizan por producir efectos postsinápticos por su unión en el receptor nicotínico, mientras que las β -neurotoxinas representadas por las PLA₂ del grupo I, son responsables de alterar la liberación de acetilcolina debido a sus efectos presinápticos [6,7,16,19,28]. Los síntomas del envenenamiento aparecen entre 2-6 horas de la mordida y a las 48 horas pueden alcanzar su máximo, aunque se han registrado muertes en menos de 24 horas. Los signos clínicos usados para diagnosticar un envenenamiento son: dolor local, parestesia, visión borrosa y ptosis palpebral (caída de párpados), disartria (dificultad para hablar), sialorrea, disfagia, fasciculación muscular, diplopía y debilitamiento general de los músculos. En casos graves, se desarrolla un paro respiratorio y muerte debido a la parálisis neuromuscular e insuficiencia respiratoria [2,15,19,22]. Se han observado casos de pacientes con síntomas leves o asintomáticos que presentan parálisis en un corto intervalo de tiempo [29]. Por lo tanto, el antiveneno apropiado debe administrarse rápidamente para prevenir la ocupación de los receptores de acetilcolina de la unión neuromuscular [22]. También se han reportado alteraciones en parámetros de coagulación, generación de edemas y miotoxicidad [20]. Cabe recalcar que a diferencia del envenenamiento por la familia Viperidae, las serpientes coral carecen de manifestaciones locales de importancia, solo parestesia, edema y dolor leve [22]. Además, no cruzan la barrera hematoencefálica [7,30].

1.1.4.2. Dicotomía 3FTx y PLA₂

Los venenos que han sido caracterizados proteómicamente demuestran una dicotomía fenotípica desconcertante, caracterizada porque su arsenal de toxinas está dominado por PLA₂ y 3FTx [19,29]. El fenotipo rico en PLA₂ se ha observado en especies filogenéticamente más derivadas, en comparación con el fenotipo rico en 3FTx, que ocurre en especies más basales, probablemente representan la condición del veneno ancestral [17,18]. La falta de agrupamiento filogenético de estos fenotipos divergentes, sugiere que la filogenia por sí sola no puede ser la razón principal de la evolución de los venenos [19].

Se propuso que los fenotipos expresión divergentes parecen estar relacionados con posiciones filogenéticas, patrones históricos de dispersión geográfica y la distribución actual a lo largo del eje Norte-Sur de América [17,31]. Por lo tanto, mediante el mapeo de la dicotomía a través del continente apunta a un patrón filogeográfico. Es evidente que es necesario un conocimiento más profundo de la distribución filogeográfica y evolución de los venenos, para rastrear el camino evolutivo hacia los fenotipos actuales, y de esa manera racionalizar la reactividad cruzada irregular de los antivenenos para serpientes del género *Micrurus* y mejorar su eficiencia para neutralizar los envenenamientos [18].

Cabe recalcar, que los taxones del género *Micrurus* generalmente no se alimentan de roedores, por lo que, correlacionar un fenotipo particular con la dieta requiere un análisis LD50, pero en la presa natural de la serpiente [19]. Además, para comprender de mejor manera el origen de la dicotomía del fenotipo del veneno que se presenta en las serpientes del género *Micrurus*, son necesarios más estudios a nivel intra e interpoblacional de la composición de veneno de otras serpientes corales.

1.1.5. Antivenenos anticoral

Los antivenenos de primera y segunda generación consisten en inmunoglobulinas G (IgG) purificadas, obtenidos a través de la inmunización de un animal con veneno (generalmente de equinos) en concentraciones no letales [23,32]. Estos pueden ser monovalentes (con anticuerpos contra venenos de una sola especie) o polivalentes (anticuerpos contra venenos de diferentes especies) [33]. Sin embargo, la composición del veneno puede ser alterada por variaciones epigenéticas [34], por los diferentes

estadios del desarrollo ontogénico, asociado a cambios filogenéticos, sexo, hábitos alimenticios y condiciones ambientales [2,20]. Tomando en cuenta la variabilidad antigénica, el antiveneno preparado para neutralizar el veneno de ciertas especies de serpientes de una región geográfica determinada, podría tener poca o ninguna eficacia neutralizante con las especies de otra región [22]. Además se ha demostrado que la variación inter e intraespecífica del veneno de serpientes puede afectar la capacidad de neutralización de los antivenenos [35].

La producción de antivenenos de *Micrurus* es compleja y desafiante debido a las características bioquímicas e inmunológicas de los venenos, la dificultad de mantener a los especímenes en cautiverio y a la baja cantidad de veneno producido por la serpiente [6,36,37]. La reactividad inmunológica y la neutralización cruzada parece ser mayor entre especies de regiones geográficas similares. Sin embargo, la reactividad cruzada no siempre está correlacionada con la capacidad neutralizante de los antivenenos, porque no son capaces de neutralizar el efecto letal de los venenos heterólogos [24]. La dicotomía de los patrones del veneno tiene una relación con sus propiedades antigénicas, lo que se correlaciona con sus afinidades filogenéticas. Por tanto, es necesario aclarar estas relaciones con la finalidad de seleccionar venenos para el desarrollo de un antiveneno anticorálico polivalente de amplia cobertura geográfica [17].

Los países productores de antivenenos en América son México: Instituto Bioclon, Costa Rica: Instituto Clodomiro Picado (ICP), Colombia: Laboratorio PRBIOL y el Instituto Nacional de Salud (INS), en Brasil: Instituto Butantan y en Argentina: Instituto Nacional de Producción de Biólogos (ANPB)[24,33]. En Ecuador la producción de antivenenos inició en el Instituto Nacional de Higiene y Medicina Tropical “Dr Leopoldo Izquieta Pérez” que después de ser escindido en 2014, la producción continuó a cargo del Ministerio de Salud Pública e Investigaciones (INSPI), pero en el año 2014 fue suspendido por temas relacionados con Buenas Prácticas de Manufactura (BPM) [38]. Debido a que el antiveneno es el único tratamiento válido contra mordeduras de serpientes, Ecuador importa de otros países como Costa Rica, Colombia y Argentina [9]. En este contexto, es menester subrayar que no existe una evaluación preclínica de la eficiencia y eficacia del antiveneno para serpientes del género *Micrurus*, solo de especies de vipéridos consideradas de importancia médica en Ecuador [39–41].

1.1.6. *Micrurus* en Ecuador

1.1.6.1. *Micrurus lemniscatus*

Micrurus lemniscatus conocida como Coral Acintada Occidental, está distribuida en Bolivia, Brasil, Colombia, Ecuador, Perú, Argentina, Paraguay, Venezuela, Trinidad y Tobago, Guyana Francesa, Guyana y Surinam. Esta especie se divide en cinco subespecies, *Micrurus lemniscatus lemniscatus*, *M. lemniscatus calrvalhoi*, *M. lemniscatus diutius*, *M. lemniscatus frontiafasciatus* y *M. lemniscatus helleri*. En Ecuador se han registrado especies con características que atribuyen características pertenecientes a *Micrurus lemniscatus helleri*. Se encuentra en las provincias de Morona Santiago, Napo, Orellana, Sucumbíos, Pastaza y Zamora Chinchipe (Ver Fig. 2) [1,42]. Se considera una especie de Preocupación Menor (LC) porque tiene una amplia distribución y es una de las serpientes coral más abundante en el país. El largo máximo de esta especie es de 131,5 cm en hembras y 151,7 cm en machos. Es una serpiente grande en comparación con otras corales. En Ecuador, se recolectó un individuo de 114,5 cm de longitud total y existen registros de hasta 145 cm [43]. Posee anillos con tres colores, rojo, negro y blanco (o amarillo o crema) distribuidos en 8 – 11 tríadas, que es el conjunto de tres anillos negros limitados por anillos rojos (más anchos), sin marcas en la zona ventral. Su reproducción es mediante huevos, se ha registrado activa en el día y en la noche, con hábitos fosoriales superficiales, es semiacuática y se alimenta de varios animales como peces, reptiles y anfibios [1].

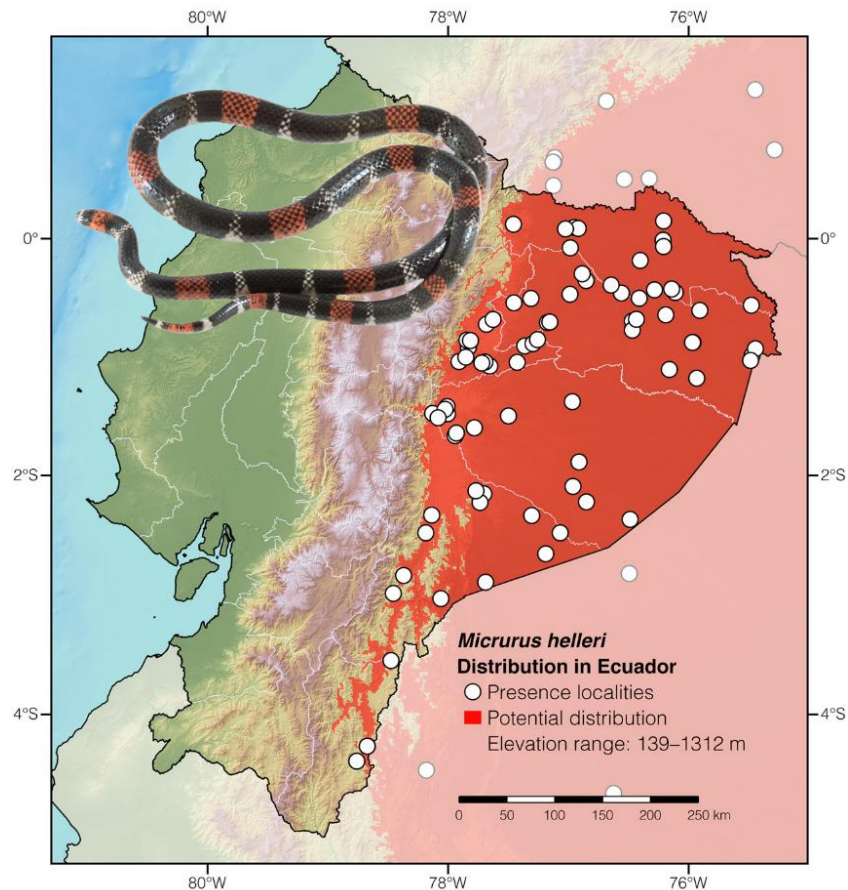


Figura 2. Mapa de distribución potencial de *Micrurus lemniscatus* en Ecuador.

Fuente: Arteaga et al., 2021; Foto Quiroz María José-BIOWEB, <https://bioweb.bio>.

Se reportó un caso de envenenamiento provocado por *M. lemniscatus helleri* en la provincia de Pastaza, al manipular la especie al confundirla con una falsa coral. El paciente fue ingresado a un hospital rural 20 minutos después del accidente. Sin embargo, la administración del antiveneno se llevó a cabo dos días después. Los síntomas iniciales incluyeron dolor intenso y persistente en la zona de la mordedura, trombocitopenia y leucocitosis polimorfonuclear, seguido de neumotórax, obstrucción de bronquios y una leve rabdomiolisis. Sin embargo, el paciente se recuperó después de algunos meses [43,44]

1.1.6.2. *Micrurus mipartitus*

Micrurus mipartitus también llamada rabo de ají, se distribuye en Costa Rica, Panamá, Brasil, Venezuela, Colombia, Ecuador y Perú. En Ecuador se registró como *M. mipartitus decussatus* y se encuentra en las provincias de Bolívar, Carchi, Chimborazo, El Oro, Esmeraldas, Guayas, Imbabura, Loja, Pichincha y Santo Domingo de los Tsáchilas

[1,45]. Esta especie es delgada usualmente con una longitud total de 91,4 cm en hembras y 101,4 cm [1]. Sin embargo, puede alcanzar 120 a 140cm [45,46]. Generalmente *M. mipartitus* es negra y blanca o negra y amarilla con un anillo parietal oscuro rojo-anaranjado y 2-8 anillos caudales rojo-anaranjados, hocico negro. Es una serpiente crepuscular y nocturna y con actividad fosorial superficial. La dieta incluye serpientes, lagartijas, anfibios, cecílicos anfibénidos y lombrices [1]. El envenenamiento tiene efectos neurotóxicos y hemolíticos, siendo en algunos casos, mayor que los accidentes con *Crotalus*. El veneno puede actuar inmediatamente produciendo un dolor transitorio e inflamación, además presentar síntomas como el desarrollo progresivo de ptosis, hipersalivación, disfagia, inestabilidad al caminar y problemas respiratorios con cianosis. Los casos graves por envenenamiento severo, pueden llevar al desarrollo de hemólisis, hemogloburina, falla renal con necrosis bilateral cortical renal [47].

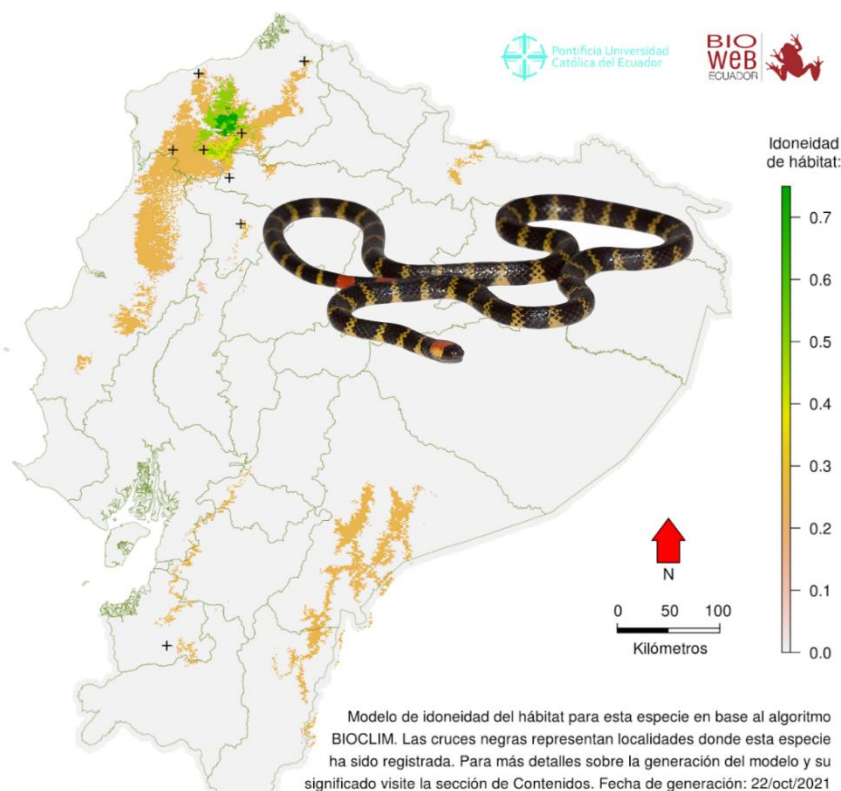


Figura 3. Mapa de distribución potencial de *Micrurus mipartitus* en Ecuador.

Fuente: Rodríguez-Guerra, 2020; Foto Read Morley-BIOWEB, <https://bioweb.bio>.

1.1.6.3. *Micrurus multiscutatus*

Micrurus multiscutatus conocida como coral caucana es una serpiente bicolor, roja y negra con un anillo parietal a veces amarillo, hocico negro muy pequeño [1,48]. El espécimen más largo de esta especie es el holotipo de una hembra que mide 84,2 cm, mientras que 23 cm de largo total máximo en machos (paratipo). Ha sido reportada solo en la provincia de Esmeraldas (Fig. 4) con aproximadamente 10 ejemplares [1,42,49]. Se considera una especie Casi Amenazada. Es una especie nocturna con actividad fosorial profunda, con hábitos alimenticios desconocidos. Se presume que habita bosques primarios o poco perturbados, por lo que la información y registro de esta especie es escasa. Su veneno es neurotóxico, sin embargo, se desconocen accidentes causados por la mordedura de esta serpiente en Ecuador [1].

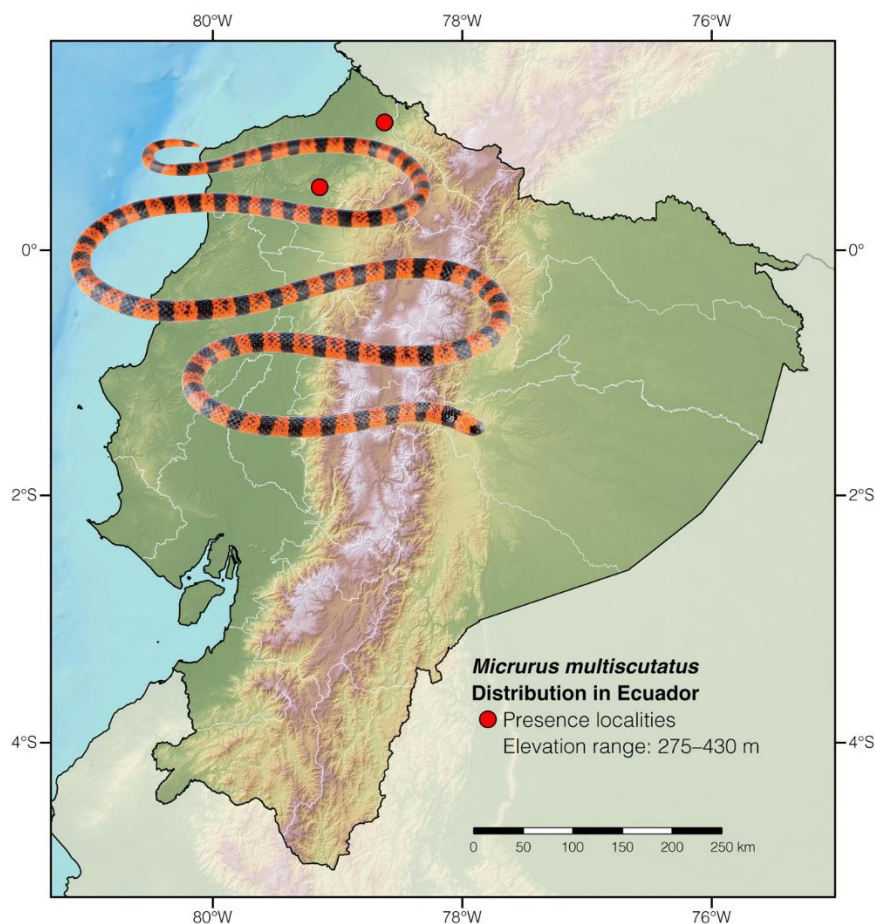


Figura 4. Mapa de distribución potencial de *Micrurus multiscutatus* en Ecuador.

Fuente: Viera José, 2021; Foto: Viera José. <https://reptilesofecuador.com>.

1.1.7. Venenos como fuente de inspiración

Así como las serpientes venenosas son consideradas como un riesgo para las personas debido a sus mordeduras, juegan un papel importante en la naturaleza al formar parte de la dieta de un amplio grupo de animales y como control de plagas [1]. Sin embargo, su rol no se queda en el contexto ecológico, el estudio de sus toxinas ha ganado lugar en la industria como fuente de inspiración para el diseño de nuevas moléculas con actividad farmacológica. Se han desarrollado fármacos que tienen origen en venenos de serpiente. Por ejemplo, Captopril, un inhibidor oral de la enzima convertidora de angiotensina (ECA) usado para tratar la hipertensión arterial e insuficiencia cardíaca [50]; Defibrase es el nombre comercial dado a la batroxobina, una enzima usada como fibrinolítico, ayuda a tratar eventos cerebrales trombóticos [11]. Y sin lugar a duda, el estudio de los venenos ha permitido la producción de los sueros antiofídicos.

1.2. Planteamiento del problema a investigar

La variabilidad impredecible del veneno a lo largo de la filogenia y el rango de distribución de las serpientes ha causado un amplio espectro de manifestaciones patológicas y fisiopatológicas del envenenamiento. Esto representa un gran desafío para el desarrollo de antivenenos y la evaluación preclínica de su eficacia. Por tanto, se requiere conocer los patrones filogeográficos de los venenos de serpientes actuales e identificar las toxinas médicamente más relevantes, y de esa manera evaluar la eficacia específica y parespecífica de los antivenenos contra los diferentes venenos homólogos y heterólogos [3].

Por otro lado, la producción de antivenenos no es una prioridad para las grandes industrias farmacéuticas. Estas se enfocan principalmente en la producción de medicamentos con un mercado más amplio basado en patologías predominantes en naciones con alto nivel de ingresos. Además, debido a la baja demanda, varios fabricantes han interrumpido la producción y se ha evidenciado el incremento de precio [51]. En este sentido, Ecuador no dispone de la producción de antivenenos, y en consecuencia también se encuentra limitado en experiencia en el ámbito científico, como en el estudio de los venenos de serpientes.

Una limitación en el estudio de los venenos de *Micrurus* está relacionada con su disponibilidad, dificultad de su recolección, baja adaptación en cautiverio y escasa cantidad de veneno producido. La mayoría de especies de serpientes coralinas tienen comportamiento relacionado a hábitos fosoriales y nocturnos, por lo que es difícil de recolectarla, además al ser depredadores estenófagos y ofiófagos, no se alimentan fácilmente en cautiverio, y mueren después de unos meses [17,20]. Por tal razón, el veneno de estas serpientes ha sido poco investigado y la disponibilidad de antivenenos es limitada [17].

En Ecuador, no hay reportes de estudios proteómicos, genómicos, transcriptómicos y/o funcionales empleando venenos colectados de serpientes corales. Indudablemente, el conocimiento de la composición proteómica (venoma) de serpientes es una etapa indispensable para la producción de los antivenenos. En virtud de lo expuesto, es relevante en el país llevar a cabo la determinación de los componentes bioquímicos presentes en estas muestras.

1.3. Justificación de la investigación

Los venenos de serpiente han sido de interés médico desde hace mucho tiempo [17], debido al enorme potencial que tienen como fuente de novedad química y farmacológica [3,52]. Las serpientes del género *Micrurus* son las principales representantes de la familia Elapidae en América del Sur [2]. Sin embargo, las características bioquímicas y farmacológicas aún son poco investigadas. Por tanto, la caracterización proteómica de los venenos de serpientes, es necesaria para comprender los procesos patológicos y fisiopatológicos que se producen a consecuencia de su mordedura [52], Además, permitir la generación de tratamientos efectivos para un accidente ofídico, tomando en cuenta la variabilidad antigénica, la variación interespecífica e intraespecífica de la composición del veneno, que pueden afectar significativamente la capacidad de neutralización de los antivenenos.

En Ecuador aún no existe ninguna investigación para este tipo de serpientes, siendo esta, la primera caracterización del veneno de tres serpientes del género *Micrurus*: *M. lemniscatus helleri*, *M. mipartitus* y *M. multiscutatus*. Adicionalmente esta investigación es impulsada debido que *M. mipartitus* y *M. lemniscatus helleri* son consideradas como especies de serpientes de mayor importancia médica en Ecuador [1,12].

1.4. Objetivos de la investigación

1.4.1. General

Evaluar la variabilidad interespecífica de la composición y abundancia relativa de las toxinas presentes en el veneno de tres especies de serpientes del género *Micrurus*: *M. mipartitus*, *M. multiscutatus* y *M. lemniscatus helleri*, colectadas en Ecuador.

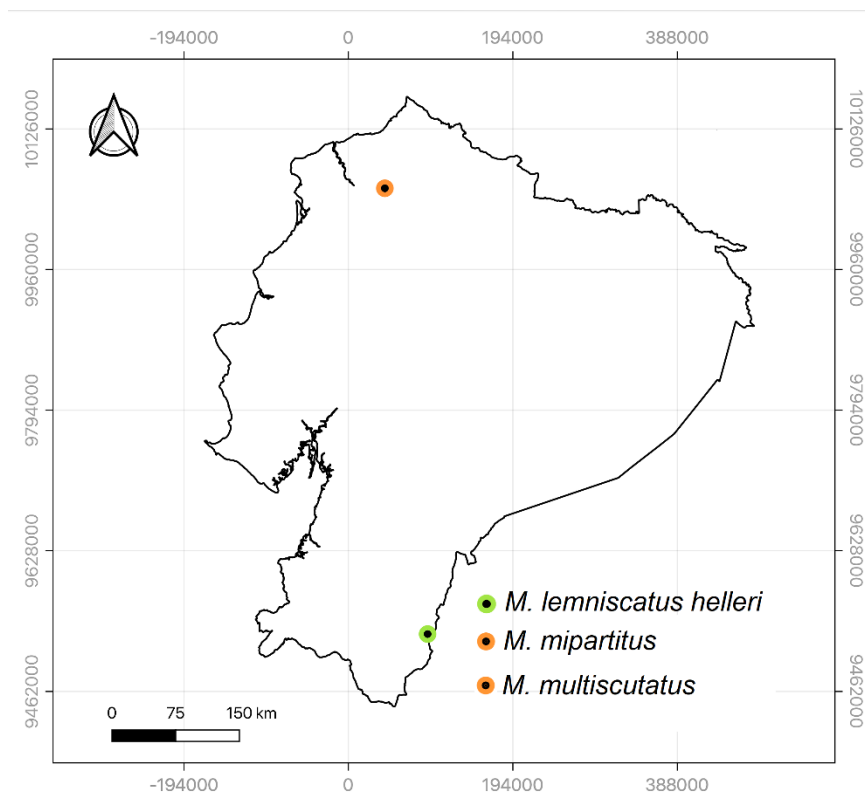
1.4.2. Específicos

- Separar los componentes de los venenos de las tres especies del género *Micrurus* a través del fraccionamiento por cromatografía líquida.
- Identificar las toxinas más abundantes del veneno usando electroforesis y espectrometría de masas.
- Realizar un análisis comparativo del contenido proteico de los venenos de las tres especies de serpientes.

2. CAPÍTULO II: MARCO METODOLÓGICO

2.1. Veneno de serpiente

Los especímenes fueron colectados bajo los permisos de investigación MAE-DNB-CM-2015-0017 y MAE-DNB-CM-2019-0115 emitidos por el Ministerio del Ambiente de Ecuador. Se colectó un espécimen por cada especie: *M. lemniscatus helleri* (Nangaritza, Zamora Chinchipe), *M. mipartitus* y *M. multiscutatus* (Quinindé, Esmeraldas) (Fig. 5). El manejo de las serpientes se realizó con un gancho herpetológico y para su transporte se utilizaron bolsas y contenedores especializados. La extracción del veneno se llevó a cabo en el Centro de Investigación de la Biodiversidad y Cambio Climático (BioCamb), por el Dr. David Salazar. Se utilizaron tubos de sujeción especializados para un manejo seguro del espécimen. Después de asegurar el agarre de la cabeza de la serpiente, se le permitió morder una cuchara estéril y luego se transfirió el veneno a un microtubo. Para desecar las muestras, los tubos con veneno se colocaron abiertos en una cámara sellada al vacío que contenía carbonato de calcio. Se dejó aproximadamente un día, hasta que se formen cristales. Los especímenes se encuentran preservados en el Museo de Herpetología de la Universidad Tecnológica Indoamérica (MZUTI).



N° campo	N° MZUTI	Especies	Longitud [cm]		
			Cabeza	Cola	Total
ZC-0299	5650	<i>M. lemniscatus helleri</i>	2.29	7.5	95
ZC-0317	5667	<i>M. mipartitus</i>	1.36	3.5	72
ZC-0320	5821	<i>M. multiscutatus</i>	0.93	2,4	57.5

Figura 5. Distribución de las especies de serpientes *Micrurus* colectadas en Ecuador.

2.2. Fraccionamiento del veneno por RP-HPLC

La separación bioquímica de los venenos de corales de Ecuador se realizó mediante Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia en Fase Reversa (RP-HPLC) siguiendo el protocolo descrito por Rey-Suárez et al. [27] con algunas modificaciones en el gradiente. Se disolvieron 90 - 200 µg de veneno desecado en 200 µl de una solución que contenía 0,05% (v:v) de ácido trifluoroacético (TFA) y 5% (v:v) acetonitrilo (ACN). Luego se separó el material insoluble mediante centrifugación a 13000 x g durante 10 min. Se utilizó la columna Phenomenex Jupiter C18 (250 x 4.56 mm; 5 µm; 30 Å), el Cromatógrafo Líquido (HPLC) equipado con un sistema de bombas binario (Waters 1525), automuestreador (Waters 2707) y el detector HPLC-PDA (Waters 991). El flujo se fijó en 1 ml/min durante 100 min y la columna se desarrolló en un gradiente lineal

desde 5% a 70% de Solvente B (99,9% (v/v) de acetonitrilo, 0,1% (v/v) de TFA) y usando las siguientes condiciones de elución de la columna: 5% B durante 5 min, seguido de 5% - 25% B durante 10 min, 25% - 45% B durante 60 min y 45% - 70% durante 10 min. La detección de proteínas fue monitoreada a una absorbancia de 215 nm. Las fracciones fueron colectadas de forma manual. La abundancia relativa de cada molécula fue estimada por integración de los picos a 215 nm, usando el software Empower. Después cada fracción colectada fue concentrada hasta que todo el solvente se haya evaporado, mediante el concentrador al vacío (Genevac, miVac Duo) a 35°C durante 24 horas (Ver Fig. 6).

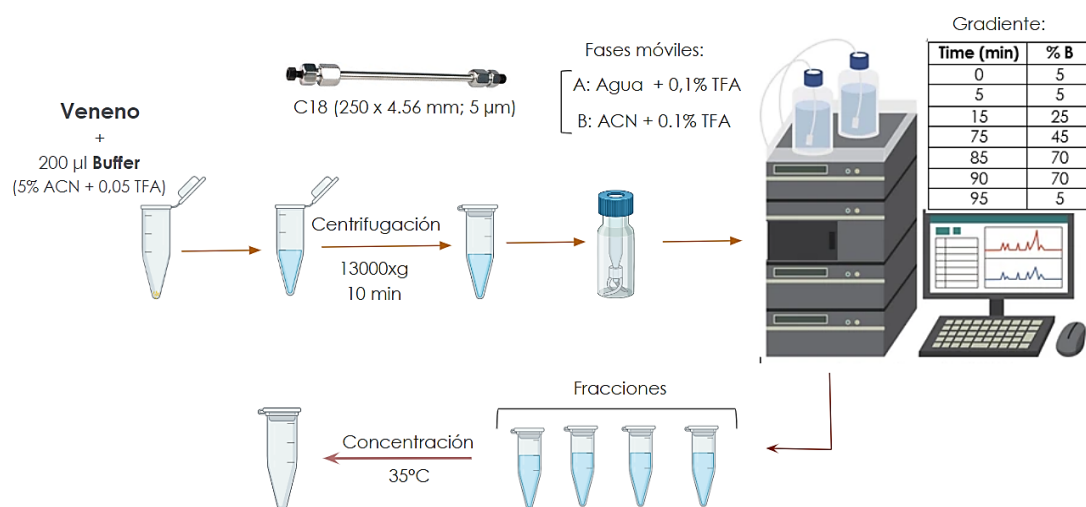


Figura 6. Esquema del fraccionamiento de los venenos de *Micrurus* por RP-HPLC. Creado con BioRender.com.

2.3. Electroforesis SDS-PAGE

Se realizó la separación de proteínas según la metodología propuesta por Laemmli [53] con algunas modificaciones. Cada fracción concentrada fue disuelta en 45 µl de buffer de carga (0,075 M Tris-HCl, pH 6,8; 10% (v/v) glicerol; 4 % (m/v) SDS; 0,001% (m/v) azul bromofenol), la separación se llevó a cabo en condiciones reductoras, por lo que se añadieron 5 µl de 1M DL-Ditriotreitol (DTT) a las muestras. Luego se homogenizaron y calentaron a 95°C en un termobloque (Thermo Scientific™) durante 5 minutos. Se utilizaron 20 µl de cada muestra. La electroforesis se realizó en una cámara vertical BIO-RAD Mini-PROTEAN Tetra en Buffer de corrida 1X (0,025 M Tris-HCL (pH 8,3); 0,192 M glicina; 0,1% (m/v) SDS). La solución de acrilamida fue preparada con 30% de acrilamida y 0,8% de N,N' bis-metilenbisacrilamida, usando un gel de apilamiento con

una concentración de 5% acrilamida:bisacrilamida, 0,067 M Tris-HCL y 0,1% (m/v) SDS; y un gel de corrida con una concentración de 12,5% acrilamida:bisacrilamida, 0,55M Tris-HCl y 0,02 (m/v) SDS a 120 mV. Se utilizó persulfato de amonio (PSA) y tetrametiletilendiamina (TEMED) para polimerizar el gel. Para la identificación de la masa molecular de las proteínas se usaron 5 µl de escalera de peso molecular RunBlue Prestained TriColour (Blue, Red, Green). La separación inició a 35mA por media hora, terminando a 120 mA (Ver Fig. 7).

Para visualizar las bandas, el gel se tiñó en una solución colorante con azul brillante de Coomassie (Blue R-250) por 24 horas en un agitador magnético y se destiñó con una solución decolorante con 40% (m/v) metanol y 10% (m/v) ácido acético. Para los geles que no presentaron bandas con tinción con azul de Coomassie, se usó la tinción con nitrato de plata, que consiste en la fijación del gel con una solución fijadora de 40% (v/v) metanol y 10% (v/v) de ácido acético durante una hora con agitación, después se lavó con etanol 50% (v/v) por 20 minutos con 3 repeticiones. Luego se procedió a realizar la oxidación del gel con una solución reductora con 0,02% (m/v) tiosulfato de sodio durante un minuto, seguido de un lavado con agua destilada por 20 segundos con 3 repeticiones. Para la impregnación con tinte de plata, los geles fueron sumergidos en una solución colorante con 0,2% (m/v) nitrato de plata durante 20 minutos, en la oscuridad; se lavó el gel con agua destilada. Para que las bandas tinturadas con nitrato de plata se revelen se utilizó una solución reveladora con 5% m/v carbonato de calcio y se agitó hasta que aparezcan bandas, la detención de la reacción se realizó con ácido acético 5% (v/v) por 10 minutos. El gel se conservó en una solución de glicerol 8,7%.

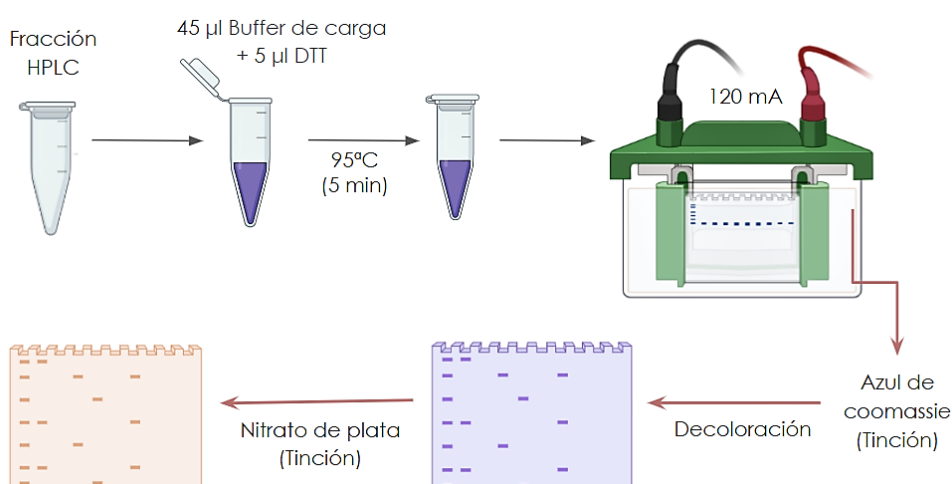


Figura 7. Esquema de la identificación de proteínas por SDS-PAGE en condiciones reductoras. Creado con BioRender.com.

2.4. Digestión de proteínas

2.4.1. Digestión trípica en solución

Se usaron alícuotas de 15 µl de las fracciones obtenidas del RP-HPLC y se añadió bicarbonato de amonio (AMBIC) 1 M hasta completar 20 µl. Se agregaron 6 µl de DTT (100 mM) y se incubó a 56°C durante 30 minutos. Luego se sometió la muestra a alquilación con 3 µl de yodoacetamida por 20 minutos en la oscuridad. Se añadieron 3 µl de DTT (100 mM) y se dejó reposar por 20 minutos a temperatura ambiente. Se digirió con 3 µl de una solución de 20 µg de tripsina en 200 µl de AMBIC 0,1 M durante la noche a 37°C. Después de la digestión, se agregaron 0,2 µl ácido fórmico concentrado. Luego, se evaporó el solvente en la centrífuga al vacío hasta quedar casi seco. Se redisolvió con 40 µl de ácido fórmico 0,1%. Finalmente se transfirieron 25 µl de la muestra a un vial de cromatografía y se añadieron 100 µl de ácido fórmico 0,1%. Se guardó de 4-8°C hasta la inyección en el sistema LC-ESI-QTOF (Ver Fig. 8). Caber recalcar que los reactivos a utilizarse se prepararon al momento del uso.

2.4.2. Digestión trípica en gel

Las proteínas contenidas en las fracciones obtenidas por RP-HPLC y separadas mediante SDS-PAGE en condiciones reductoras y teñidas con azul de Coomassie R-250, se sometieron a un proceso de digestión según la metodología descrita por Sanz et al. (2019) [19] con algunas modificaciones. Los reactivos a utilizarse se prepararon en el momento del uso. Se recortaron de 2 a 3 pedazos pequeños de la banda de interés, se extrajo el colorante azul de Coomassie con una solución de bicarbonato de amonio (AMBIC) 100 mM y ACN (1:1). Se dejó actuar durante una hora a temperatura ambiente.

Luego se descartó la solución y se reemplazó con 50 µl de una solución de AMBIC 100 mM, que posteriormente fue reemplazada por 50 µl ACN y se centrifugó al vacío durante 15 minutos. Después, para reducir las proteínas se rehidrataron con 50 µl de una solución de DTT (1,5 mg/ml, disuelto en AMBIC) y se incubó a 56°C durante 30 minutos, y se descartó el DTT. Se añadieron 50 µl ACN y se centrifugó al vacío por 15 minutos. Para la alquilación, se rehidrataron con 50 µl de una solución de yodoacetamida (IAA) (10,2 mg/ml, disuelta en AMBIC), en la oscuridad por 20 minutos a temperatura ambiente. Se enjuagó con AMBIC y ACN y se centrifugó al vacío por 25 minutos. Después se rehidrataron con 30 µl de tripsina grado de secuenciación (0,1 mg/ml,

disuelta en AMBIC) se dejó a 4°C durante 15 minutos. Para la digestión se agregaron 10 µl de AMBIC y se incubó a 37°C durante la noche.

Posterior a la incubación con tripsina, se centrifugó 15 segundos a 12000 rpm y se recolectó el sobrenadante. Las moléculas resultantes en las bandas se extrajeron con 30 µl de una solución de 60% ACN con 1% ácido fórmico, se sonicó en baño Branson por 10 minutos a 37°C. Se centrifugó 15 segundos a 12000 rpm, se recolectó el sobrenadante y se mezcló con la solución recolectada anteriormente. Se concentró en la centrífuga aproximadamente 40 minutos hasta que quede casi seco. Finalmente, se redisolvió el digerido casi seco en 20 µl de agua con 0,1 ácido fórmico. Se guardó a 4-8°C hasta la inyección en el sistema LC-ESI-QTOF (Ver Fig. 7).

2.5. Identificación de proteínas por Cromatografía Líquida acoplada a Espectrometría de Masas (LC/MS)

La adquisición de datos MS y MS/MS se llevó a cabo en un cromatógrafo líquido de alta eficiencia UPLC AQUITY I-Class, acoplado a un espectrómetro de masas Waters Xevo G2-XS QToF con fuente Lockspray (LC-ESI-QTOF). La separación se realizó a través de la columna ACQUITY UPLC CSH C18 1.7µm. La velocidad se fijó en 0,3 mL/min y se utilizaron las fases móviles 0,1% ácido fórmico (solvente A) y ACN con 0.1% ácido fórmico (solvente B). El gradiente de elución lineal fue establecido isocráticamente en 1% B por 1 min, 1-70% B durante 29 min y el tiempo de corrida fue de 40 min. El espectrómetro de masas operó con un voltaje de capilar de 0.5 KV, tensión de cono de 40 v; 120°C de temperatura de la fuente; 450 °C de temperatura de desolvatación; 30 L/h flujo de gas cono; y 900 L/h de flujo de gas de desolvatación.

2.6. Análisis de digeridos trópticos

Los datos MS fueron adquiridos usando método de adquisición dependiente de datos (DDA) utilizando un barrido de masas en la región m/z de 400 a 1990. Los iones más abundantes de los espectros MS1 con cargas +2 y +3 son seleccionados automáticamente para fragmentación (MS2) mediante disociación por colisión inducida (CID) de los 15 iones más intensos. Los espectros se interpretaron manualmente mediante una versión con licencia del programa MASCOT DISTILLER 2.7 (<https://www.matrixscience.com/distiller.html>) contra una base de datos privada Swiss-Prot. También se creó una base de datos de proteínas para serpientes del género

Micrurus y otros géneros de la familia Elapidae descargadas de UniProt. Los parámetros de búsqueda se realizaron según Rey-Suárez et al. (2011) [27], como la carbamidoximetil cisteína (C) y la oxidación de la metionina (M) que fueron seleccionadas como modificaciones fijas y variables, respectivamente.

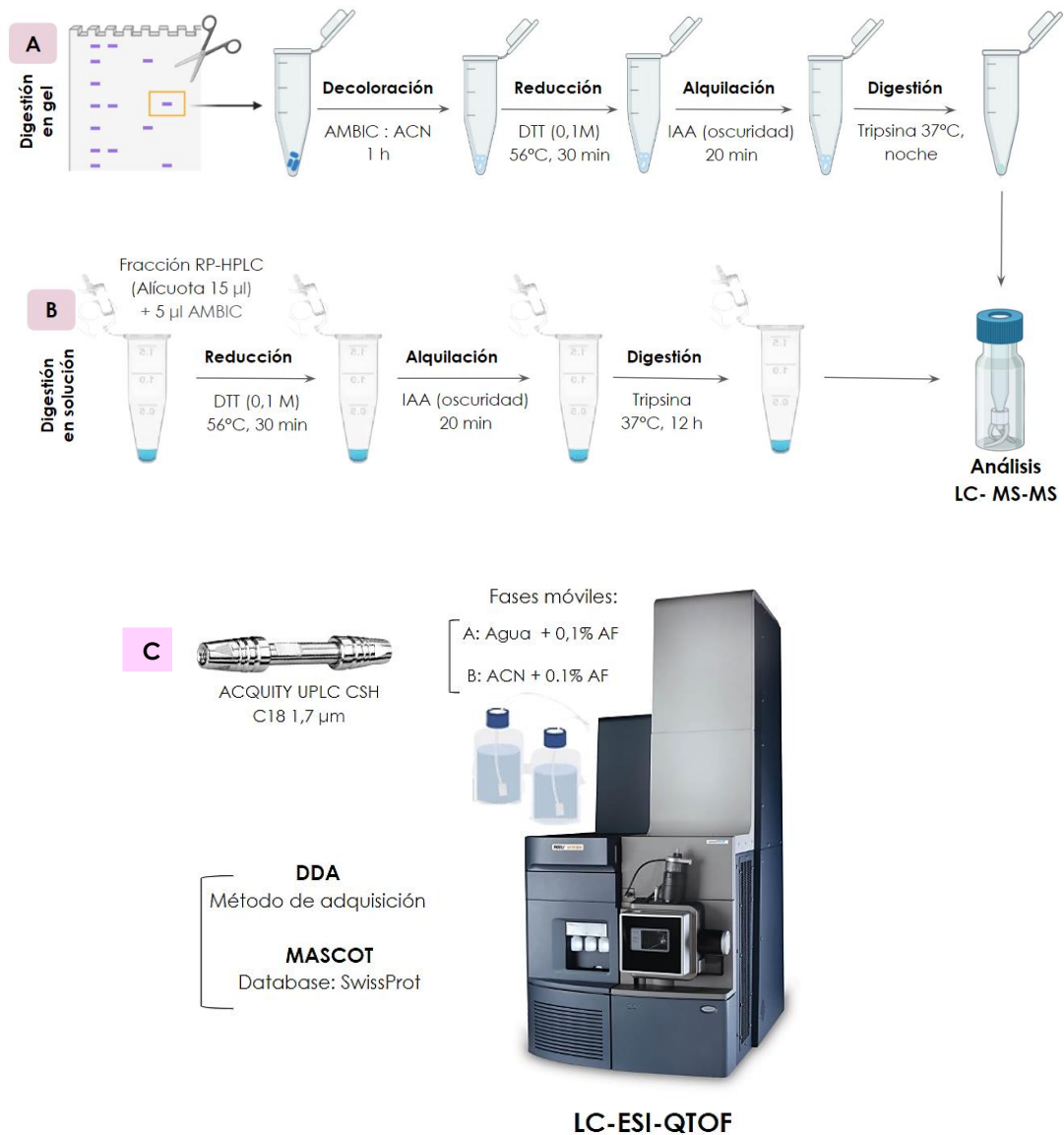


Figura 8. Esquema del proceso de digestión con tripsina y análisis MS/MS en el equipo LC-ESI-QTOF.

El esquema muestra el proceso que se lleva a cabo en la digestión en gel (A) y digestión en solución (B) utilizando DTT como agente reductor, yodoacetamida como alquilante y tripsina como la enzima encargada de la digestión. C) Cuando se obtienen los péptidos trípticos resultantes de la digestión se inyectan en el equipo de Cromatografía Líquida acoplada a espectrometría de masas LC-ESI-QTOF.

3. CAPÍTULO III: PRESENTACIÓN DE DATOS Y RESULTADOS

Los venenos crudos de *M. lemniscatus helleri*, *M. mipartitus* y *M. multiscutatus* se fraccionaron mediante RP-HPLC. El perfil cromatográfico reveló diferentes grados de complejidad para cada veneno, donde se obtuvieron 25 fracciones del veneno de *M. lemniscatus*, (Fig. 9A), 20 de *M. mipartitus* (Fig. 9B) y 17 de *M. multiscutatus* (Fig. 9C). La mayoría de las fracciones eluyeron en los 50 minutos iniciales.

Según el perfil de elución, el pico 18 de *M. lemniscatus helleri*, tiene la mayor abundancia relativa con 34,63% y eluye en un tiempo de retención de 42 minutos. Para *M. mipartitus* el pico 6 presenta una abundancia relativa de 40,26% y eluye a los 20 minutos aproximadamente. En *M. multiscutatus* los picos con mayor abundancia relativa son el 5 con 22,78% que eluye a los 21 minutos y el pico 11 con 15,70% que eluye a 35 minutos.

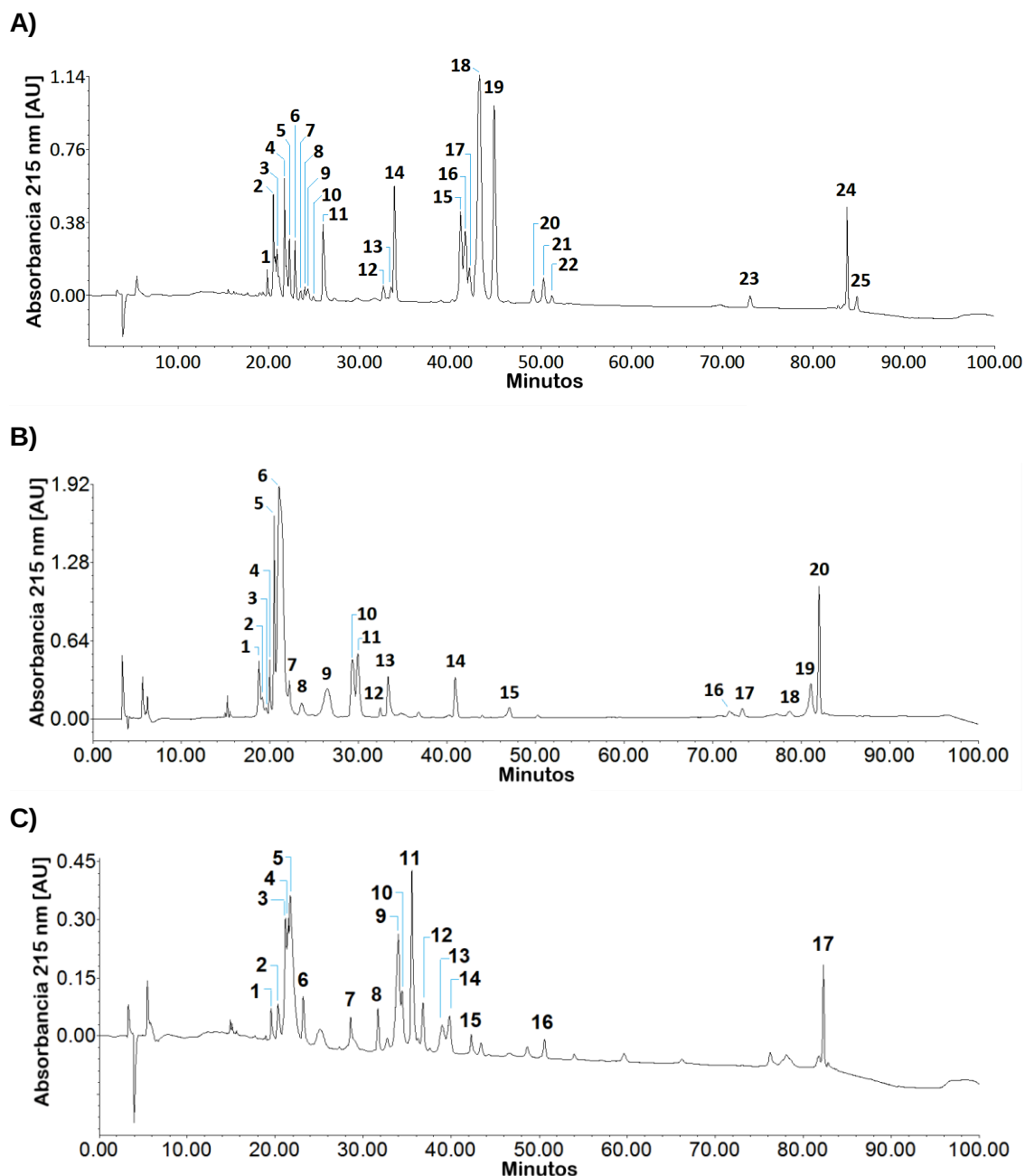


Figura 9. Perfil de elución del veneno de A) *Micrurus lemniscatus* B) *Micrurus mipartitus* y C) *Micrurus multiscutatus* fraccionados por RP-HPLC.

Las fracciones de HPLC separadas por electroforesis SDS-PAGE en condiciones reductoras, mostraron bandas en su mayoría, de bajo peso molecular (< 20 KDa). En *M. lemniscatus helleri* (Fig. 10), Las bandas anteriores a la fracción 14 tienen un peso molecular menor a los 13 KDa. Desde la fracción 13 a la 21, se observan bandas de 13 y 14. La fracción 18 muestra dos bandas, una a la altura de los 14 KDa y otros a los 28 KDa. Las fracciones 23 y 24 muestran bandas superiores a los 60 KDa. Para *M. mipartitus* (Fig. 11), solo la fracciones 9, 10 y 11 presentan bandas de 13 y 14 KDa,

mientras que las demás se encuentran bajo los 13 KDa. Las últimas fracciones: 17, 18, 19 y 20, tienen un peso superior a los 60 KDa. Los geles de *M. multiscutatus* (Fig. 12) también muestran bandas con un peso inferior a 13 KDa, salvo la fracción 11 que tiene una banda alrededor de los 28KDa y la banda de la fracción 17 con un peso mayor a 30 KDa.

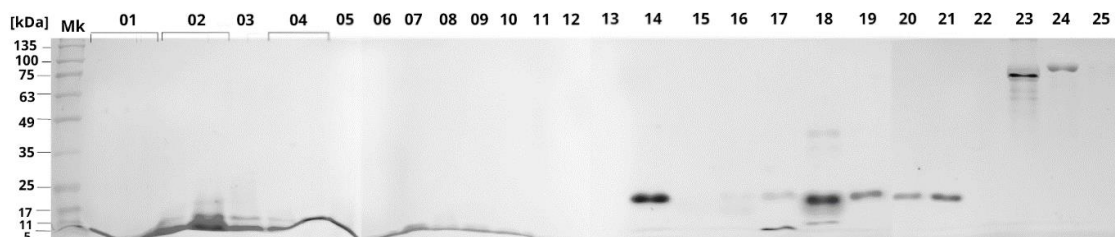


Figura 10. Fracciones de veneno de *M. lemniscatus helleri* separada por SDS-PAGE.

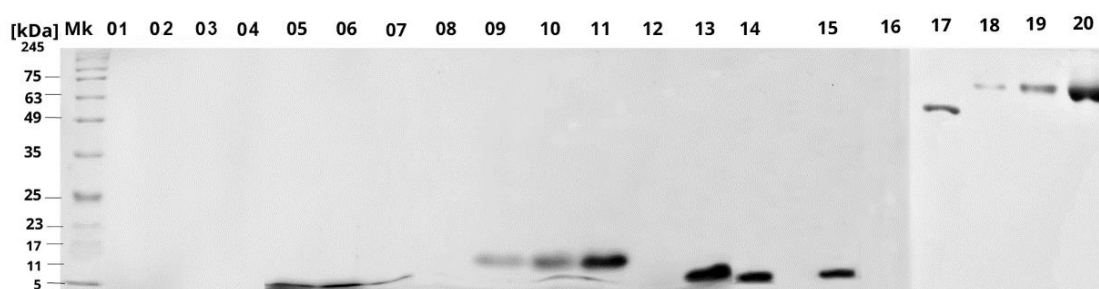


Figura 11. Fracciones de veneno de *M. mipartitus* separada por SDS-PAGE.

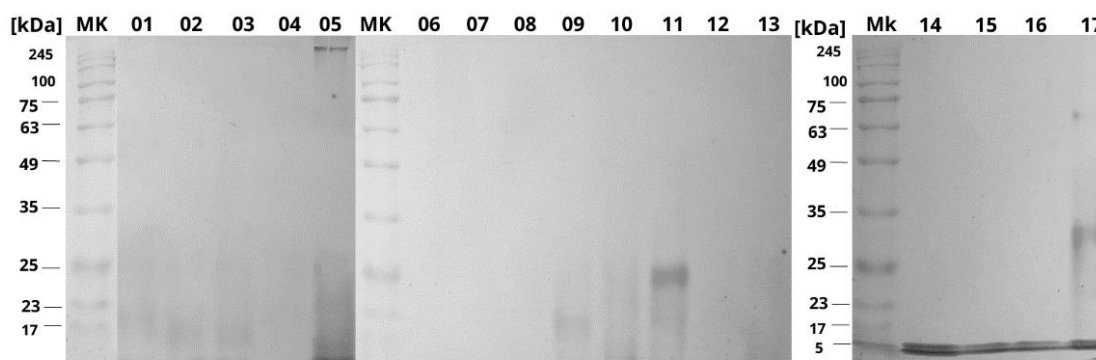


Figura 12. Fracciones de veneno de *M. multiscutatus* separada por SDS-PAGE.

Las fracciones obtenidas por RP-HPLC separadas mediante SDS-PAGE en el gradiente 4-20% Tris-Glicina bajo condiciones reductoras. Las secuencias obtenidas por espectrometría de masas en tándem fueron analizadas en MASCOT, donde se logró identificar y asignar familias de proteínas a las fracciones de los venenos de *M. lemniscatus helleri* (Tabla 1), *M. mipartitus* (Tabla 2) y *M. multiscutatus* (Tabla 3). Así mismo, se encontró que las proteínas mayoritarias están representadas por PLA₂ y 3FTx. En el veneno de *M. lemniscatus helleri*, se encontraron proteínas pertenecientes a seis familias, predominando las PLA₂ con 72,13% (Figura 13A). A partir de la fracción 14 a la fracción 20, se encontraron PLA₂, que eluyeron desde el minuto 33 hasta el minuto 50. Las primeras fracciones (1-13) que mostraron menos de 20 KDa de peso molecular en los geles fueron: 3FTx, inhibidor de serinproteasa tipo Kunitz (Kun) y péptidos inhibidores de bradicinina (PIB). Por otro lado, las fracciones 23 y 24 representan a proteínas alto peso molecular, como hialuronidasa (HYA), amino oxidasa (AO), L-amino ácido oxidasa (LAAO), que eluyeron a partir de los 72 minutos. Para *M. mipartitus* se encontraron cuatro familias de proteínas, y se halló una predominancia de 3FTx con 63,40% (Figura 13B). Las proteínas con mayor peso molecular como metaloproteinasas (SVMP), amino oxidasas (AO) y L-amino ácido oxidasas (LAAO), eluyeron a partir de los 78 minutos. Sin embargo, no todas las fracciones pudieron identificarse en el caso de *M. multiscutatus*, donde el 74,04% del veneno no fue asignado a una familia de proteínas.

Tabla 1. Asignación de las fracciones de RP-HPLC del veneno de *Micrurus lemniscatus helleri* a familias de proteínas mediante secuenciación en LC-ESI-QTOF de iones peptídicos resultantes de la digestión con tripsina en gel y en solución.

Frac ^a	Abund. Relat. ^b	Ion del péptido		Secuencia del péptido	Proteína relacionada		Entrada Uniprot	Digestión
		m/z	z		Familia ^c	Especie		
1	0,65	No identificado						
2	3,79	414,80	3+	TRCDGFCGNR	3FTx	<i>Naja atra</i>	E2IU01	Solución
		461,23	2+	TIDECQR	Kun	<i>Bungarus fasciatus</i>	P25660	Solución
		532,28	2+	TPPAGPDVGPR	BIP	<i>Agkistrodon bilineatus</i>	P85025	Gel
3	0,78	532,28	2+	TPPAGPDVGPR	BIP	<i>Agkistrodon bilineatus</i>	E2IU01	Gel
4	3,34	532,28	2+	TPPAGPDVGPR	BIP	<i>Agkistrodon bilineatus</i>	E2IU01	Gel
5	1,83	520,73	2+	YNKISFIR	3FTx	<i>Micrurus altirostris</i>	F5CPD4	Solución
6	2,42	532,28	2+	TPPAGPDVGPR	BIP	<i>Agkistrodon bilineatus</i>	P85025	Solución
7	0,46	484,27	2+	IICCRSC	3FTx	<i>Micrurus frontralis</i>	P86420	Solución
8	0,40	484,27	2+	IICCRSC	3FTx	<i>Micrurus frontralis</i>	P86420	Solución
9	0,51	484,27	2+	IICCRSC	3FTx	<i>Micrurus frontralis</i>	P86420	Solución
10	0,16	457,33	3+	FCELPADSGSCK	Kun	<i>Phesudechis rosignolii</i>	E7FL13	Solución

		464,69	3+	GCASSCPKNGLIK	3FTx	<i>Micrurus diastema</i>	A0A0H4BKJ5	Solución
11	5,43	464,69	3+	GCASSCPKNGLIK	3FTx	<i>Micrurus diastema</i>	A0A0H4BKJ5	Solución
12	0,94	447,24	2+	LAALCFAK	PLA ₂	<i>Micrurus mipartitus</i>	C0HKB9	Solución
13	0,41	447,24	2+	LAALCFAK	PLA ₂	<i>Micrurus mipartitus</i>	C0HKB9	Solución
14	6,88	447,24	2+	LAALCFAK	PLA ₂	<i>Micrurus mipartitus</i>	C0HKB9	Solución
15	4,94	582,32	2+	NLVQFGNMIK	PLA ₂	<i>Micrurus lemniscatus carvalhoi</i>	A0A2H6NAU5	Solución
		594,78	2+	GGSGTPVDDLDR	PLA ₂	<i>Micrurus spixii</i>	A0A2D4NMB1	Solución
16	3,34	594,78	2+	GGSGTPVDDLDR	PLA ₂	<i>Micrurus spixii</i>	A0A2D4NMB2	Solución
17	1,25	594,78	2+	GGSGTPVDDLDR	PLA ₂	<i>Micrurus spixii</i>	A0A2D4NMB3	Solución
18	33,72	594,78	2+	GGSGTPVDDLDR	PLA ₂	<i>Micrurus spixii</i>	A0A2D4NMB4	Solución
		687,26	2+	CQDFVCNCDR	PLA ₂	<i>Micrurus lemniscatus carvalhoi</i>	A0A2H6NAU5	Solución
		440,72	2+	VAANCFKAK	PLA ₂	<i>Micrurus lemniscatus carvalhoi</i>	A0A2H6NAU6	Solución
		590,31	2+	NLVQFGNM ^{OX} IK	PLA ₂	<i>Micrurus lemniscatus carvalhoi</i>	A0A2H6NAU5	Gel

		590,31	2+	NLVQFGNM ^{OX} IK	PLA ₂	<i>Micrurus lemniscatus carvalhoi</i>	A0A2H6NAU6	Gel
		566,27	2+	GSGTPVDDLDR	PLA ₂	<i>Micrurus lemniscatus carvalhoi</i>	A0A2H6NFP9	Gel
		503,74	2+	MIECANIR	PLA ₂	<i>Micrurus lemniscatus carvalhoi</i>	A0A2H6NFP10	Gel
		687,26	2+	CKDFVCNCDR	PLA ₂	<i>Micrurus dumerilii</i>	C0HKB8	Gel
19	17,41	594,77	2+	GGSGTPVDDLDR	PLA ₂	<i>Micrurus spixii</i>	A0A2D4NMB1	Solución
		440,73	2+	VAANCFAK	PLA ₂	<i>Micrurus surinamensis</i>	A0A2D4PZ69	Solución
20	1,04	521,21	2+	AFVCNCDR	PLA ₂	<i>Micrurus mipartitus</i>	C0HKB9	Gel
21	1,82	521,21	2+	AFVCNCDR	PLA ₂	<i>Micrurus mipartitus</i>	C0HKB9	Gel
22	0,38	521,21	2+	AFVCNCDR	PLA ₂	<i>Micrurus mipartitus</i>	C0HKB9	Gel
23	0,96	721,69	3+	ISFM ^{OX} TAHDYSLPVFVYTR	HYA	<i>Micrurus corallines</i>	A0A2D4H401	Solución
24	4,22	742,85	2+	EADYEEFLEIAR	AO	<i>Micrurus tener</i>	A0A194ARE6	Gel
		577,78	2+	FDEIVGGFDR	AO	<i>Micrurus tener</i>	A0A194ARE7	Gel
		742,85	2+	EADYEEFLEIAR	LAAO	<i>Micrurus mipartitus</i>	A0A2U8QNR2	Gel
		497,24	2+	FWEADGIR	LAAO	<i>Micrurus mipartitus</i>	A0A2U8QNR3	Gel

		746,88	2+	FDEIVGGFDRLPK	LAAO	<i>Micrurus paraensis</i>	A0A2D4K1Y6	Gel
		586,29	2+	DHGWIDSTIK	LAAO	<i>Micrurus paraensis</i>	A0A2D4KMW9	Gel
		627,32	2+	SASQLYQESLK	LAAO	<i>Micrurus paraensis</i>	A0A2D4KYN2	Gel
25	0.93	742,85	2+	EADYEEFLEIAR	LAAO	<i>Micrurus mipartitus</i>	A0A2U8QNR2	Gel

^a Fraccion; ^b Abundancia relativa; ^cAbreviaciones: 3FTx: toxina de tres dedos; PLA2: fosfolipasa A2; Kun: inhibidor de la serin proteasa tipo Kunitz; BIP: péptido inhibidor de bradicinina; HYA: hialuronidasa; AO: amino oxidasa; LAAO: L-amino acida oxidasa.

Realizado por: Hernández, Josselin 2022.

Tabla 2. Asignación de las fracciones de RP-HPLC del veneno de *Micrurus mipartitus* a familias de proteínas mediante secuenciación en LC-ESI-QTOF de iones peptídicos resultantes de la digestión con tripsina en gel y en solución.

Frac.	Ab. Relat.	Ion del péptido		Secuencia del péptido	Proteína relacionada		Entrada Uniprot	Digestión
		m/z	z		Familia	Especie		
1	3,07				No identificado			
2	0,30	559,28	2+	GCAVTCPPKPK	3FTx	<i>Micrurus mipartitus</i>	A0A2P1BSS8	Gel
3	0,17	559,28	2+	GCAVTCPPKPK	3FTx	<i>Micrurus mipartitus</i>	A0A2P1BSS8	Gel
4	2,06	733,34	2+	KGIEINCCTTDR	3FTx	<i>Naja sputatrix</i>	O57327	Solución
		676,02	3+	VDLGCAATCPKVKPGVNIK	3FTx	<i>Naja nivea</i>	P01390	Solución
		733,34	2+	KGIELNCCTTDR	3FTx	<i>Naja mossambica</i>	P01431	Solución
5	7,61	733,34	2+	KGIELNCCTTDR	3FTx	<i>Naja mossambica</i>	P01431	Solución
6	40,26	733,34	2+	KGIELNCCTTDR	3FTx	<i>Naja mossambica</i>	P01431	Solución
		722,34	2+	LVPLFSKTCPPGK	3FTx	<i>Naja atra</i>	P60307	Solución
7	1,07	733,34	2+	KGIEINCCTTDR	3FTx	<i>Naja sputatrix</i>	O57327	Solución
8	1,73	733,34	2+	KGIEINCCTTDR	3FTx	<i>Naja sputatrix</i>	O57327	Solución
9	7,89	447,25	2+	LAALCFAK	PLA ₂	<i>Micrurus mipartitus</i>	C0HKB9	Solución
		521,22	2+	AFVCNCDR	PLA ₂	<i>Micrurus mipartitus</i>	C0HKB9	Gel

10	5,54	440,78	2+	VAANCFAK	PLA ₂	<i>Micrurus surinamensis</i>	A0A2D4PZ69	Solución
		447,73	2+	VAAKCFAK	PLA ₂	<i>Micrurus surinamensis</i>	A0A2D4PRR8	Gel
11	5,16	448,73	2+	VAAKCFAK	PLA ₂	<i>Micrurus surinamensis</i>	A0A2D4PRR8	Gel
12	0,51	448,73	2+	VAAKCFAK	PLA ₂	<i>Micrurus surinamensis</i>	A0A2D4PRR8	Gel
13	3,89	841,43	3+	KTLLLNLVVVTIVCLDFGYTIK	3FTx	<i>Bungarus flaviceps</i>	D5J9P5	Solución
14	4,06	841,43	3+	KTLLLNLVVVTIVCLDFGYTIK	3FTx	<i>Bungarus flaviceps</i>	D5J9P5	Solución
15	1,26	841,43	3+	KTLLLNLVVVTIVCLDFGYTIK	3FTx	<i>Bungarus flaviceps</i>	D5J9P5	Solución
16	0,99	775,91	2+	CVINATGPFTDTR	3FTx	<i>Micrurus lemniscatus lemniscatus</i>	A0A2D4IKM1	Gel
17	0,97	694,86	2+	YIEFYVAVDNR	SVMP	<i>Bungarus multicinctus</i>	A8QL49	Gel
18	0,72	705,36	3+	IDFNGNTLGLAHIGSLCSPK	SVMP	<i>Micrurus fulvius</i>	U3EPC7	Solución
		632,84	2+	SNVAVTLDLFGK	SVMP	<i>Micrurus fulvius</i>	U3EPC7	Gel
		708,86	2+	YIEFYVVVDNR	SVMP	<i>Micrurus fulvius</i>	U3EPC7	Gel
19	4,3	660,34	2+	KMNDNAQLLTR	SVMP	<i>Micrurus fulvius</i>	A0A0F7YYV1	Gel
		503,95	3+	RPECILNKPLNR	SVMP	<i>Micrurus fulvius</i>	A0A0F7YYV1	Gel
20	8,45	934,97	2+	TLPSVTADYVIVCSTSR	LAAO	<i>Micrurus mipartitus</i>	A0A2U8QNR6	Gel
		624,37	2+	KVIVTYQTPAK	LAAO	<i>Micrurus mipartitus</i>	A0A2U8QNR6	Gel

649,02	3+	HVVVVGAGM ^O ×SGLSAAYVLAK	LAAO	<i>Micrurus mipartitus</i>	A0A2U8QNR6	Gel
742,85	2+	EADYEEFLEIAR	LAAO	<i>Micrurus mipartitus</i>	A0A2U8QNR6	Gel
519,79	2+	IFLTCTKR	LAAO	<i>Micrurus mipartitus</i>	A0A2U8QNR6	Gel
568,79	2+	IHFAGEYTAK	LAAO	<i>Micrurus mipartitus</i>	A0A2U8QNR6	Gel
742,85	2+	EADYEEFLEIAR	AO	<i>Micrurus tener</i>	A0A194ARE6	Gel
627,32	2+	SASQLYQESLK	LAAO	<i>Micrurus paraensis</i>	A0A2D4KYN2	Gel

^aAbreviaciones: 3FTx: toxina de tres dedos; PLA2: fosfolipasa A2; SVMP: metaloproteinasa; AO: amino oxidasa; LAAO: L-amino acida oxidasa.

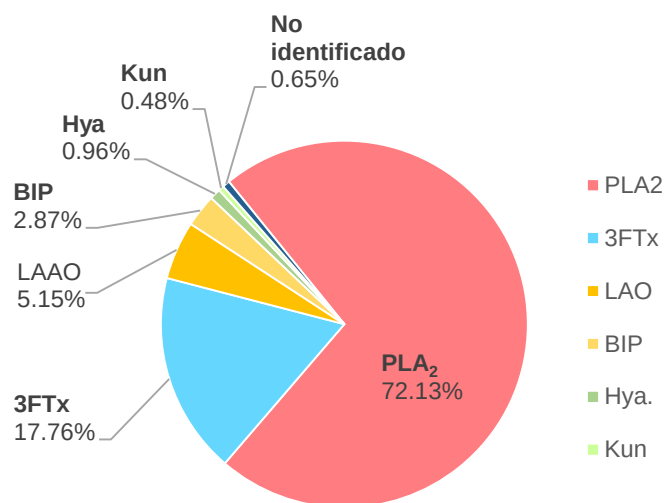
Realizado por: Hernández, Josselin 2022

Tabla 3. Asignación de las fracciones de RP-HPLC del veneno de *Micrurus multiscutatus* a familias de proteínas mediante secuenciación en LC-ESI-QTOF de iones peptídicos resultantes de la digestión en solución.

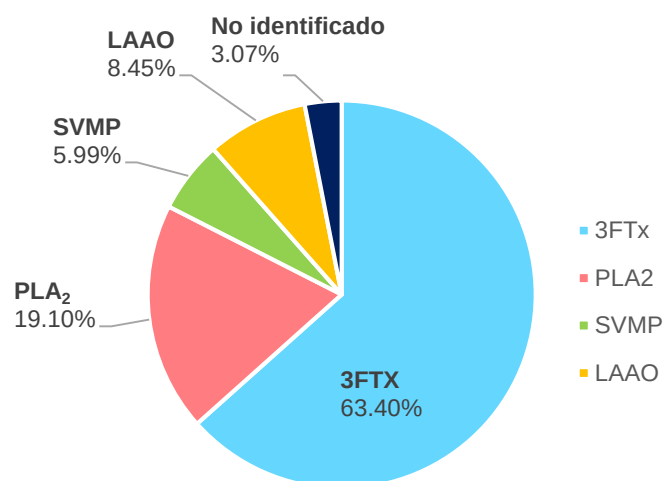
Frac	Abund. Relat.	Ión del péptido		Secuencia del péptido	Proteína relacionada		Entrada Uniprot	Digestión
		m/z	z		Familia	Especie		
1	2,19	No identificado						
2	2,89	No identificado						
3	10,27	421,21103	2+	TCCGTDK	3FTx	<i>Micrurus diastema</i>	BDM - A0A0H4BJD4	Solución
4	7,3	No identificado						
5	22,78	No identificado						
6	3,26	No identificado						
7	2,74	No identificado						
8	3	No identificado						
9	9,99	No identificado						
10	1,67	No identificado						
11	15,7	572,78254	2+	GGSGTPVDALDR	PLA ₂	<i>Micrurus mipartitus</i>	BDM - C0HKB9	Solución
12	3,88	No identificado						
13	2,82	No identificado						
14	3,1	No identificado						
15	1,47	No identificado						
16	1,59	No identificado						
17	5,36	No identificado						

Realizado por: Hernández, Josselin 2022

A)



B)



C)

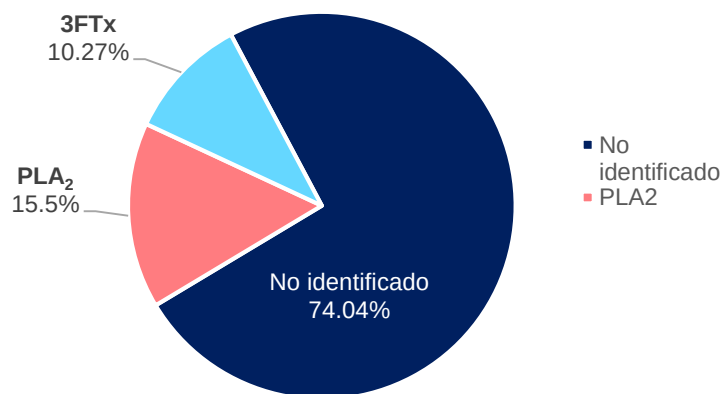


Figura 13. Composición del veneno de A) *M. lemniscatus helleri*, B) *M. mipartitus* y C) *M. multiscutatus* acorde a la familia de proteínas.

4. CAPÍTULO IV: INTERPRETACIÓN Y DISCUSIÓN

Para analizar el perfil proteómico de venenos de serpientes, se usó una estrategia analítica “bottom-up” combinada denominada “snake venomics”, que consiste en el fraccionamiento y cuantificación de sus componentes por cromatografía líquida, la separación de las fracciones obtenidas mediante electroforesis SDS-PAGE (unidimensional) y la digestión con tripsina de las bandas de proteínas del gel para su posterior análisis por espectrometría de masas en tándem (MS/MS) [54,55]. La cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa (RP-HPLC) en una columna C18, separa las proteínas según su polaridad, donde las proteínas hidrofílicas eluirán primero y las hidrofóbicas eluirán al final; mientras que en la electroforesis SDS-PAGE en condiciones reductoras, la separación ocurre en función al peso molecular, donde las proteínas más pequeñas migrarán más lejos y las más grandes serán retenidas en los poros del gel.

Existen más estrategias de análisis del proteoma de venenos además de la estrategia combinada “snake venomics”, se conocen como “Gel-based” y “LC-based”. Sin embargo, al compararlas con respecto al equipo básico que utilizan para el fraccionamiento del veneno, la estrategia “Gel-based” requiere utilizar electroforesis bidimensional (2DE) que separa las proteínas de acuerdo al enfoque isoelectrico, este equipo es costoso en comparación con el que se utiliza para SDS-PAGE. Para “LC-based” o también conocido como “shotgun proteomics”, se requiere cromatógrafos HPLC multidimensionales de nanoflujo más costosos que los cromatógrafos HPLC usados en “snake venomics”. Además, usar RP-HPLC a escala analítica, permite el uso de cargas de veneno considerables (dentro del rango de los miligramos), lo cual permite recuperar fracciones en cantidades suficientes para los análisis complementarios [54].

En la espectrometría MS/MS ocurre una ionización por electrospray (ESI) de los iones carga +2 y +3, que después fueron seleccionados en el cuadrupolo (Q) y fragmentados en iones más pequeños por disociación inducida por colisión (CID), para su posterior separación mediante la técnica de tiempo de vuelo (TOF) [56]. Los sistemas híbridos Q-TOF permitieron la obtención de espectros de fragmentación a una alta resolución con errores entre 2 y 5 ppm. Para la identificación se lleva a cabo una comparación con los espectros teóricos derivados de las secuencias anotadas en una base de datos [57].

Las serpientes elápidas del género *Micrurus* en comparación con las especies de vipéridos, son organismos poco investigados, pero los resultados hallados hasta la fecha las llevaron a considerarse como un género prometedor para estudios ecológicos, evolutivos, filogenéticos, farmacológicos, fisiológicos y proteómicos [17]. La primera investigación proteómica del veneno de una serpiente coral se llevó a cabo en 2008 en Perú [58]. Hasta la actualidad solo se ha estudiado el venoma del 27% de las serpientes *Micrurus*, que corresponde a 23 especies: tres en Norteamérica [15,28,59], seis en Centroamérica [27,60–64] y las demás en Suramérica [2,19,27,31,65–68]. Sin embargo, no hay estudios de este tipo de venenos en Ecuador, pero existen 18 especies de *Micrurus* disponibles para ser investigadas [1].

En este estudio se caracterizó el veneno de tres especies de corales y al comparar sus perfiles cromatográficos, se evidencia una diferencia significativa con respecto a la cantidad de picos y a su tiempo de elución. Los picos que eluyen en el primer tercio del cromatograma corresponden a proteínas pequeñas, principalmente a 3FTx, desintegrinas e inhibidores de serin proteasa tipo Kunitz. Las proteínas de mediano peso molecular como las PLA₂, lectinas tipo C (CTL), serin proteasas (SP), entre otras, eluyen aproximadamente desde los 40 hasta los 65 minutos. Las proteínas más grandes e hidrofóbicas como metaloproteinasas (MP), fosfolipasas C (PLC), hialuronidasas (HYA) y L-amino ácido oxidasa (LAAO), eluyen al final [54].

El fraccionamiento del veneno de *M. lemniscatus helleri* mostró picos prominentes en la región central del cromatograma y un mayor número de fracciones en comparación con las otras especies. Esta tendencia de los venenos ricos en PLA₂, se observa en los venenos de las serpientes corales del norte y del centro de América, como en *M. fulvius* [15], *M. tener* [28], *M. nigrocintus* [62], *M. mosquitensis* [63], *M. browni* [59] y *M. yatesi* [61]. Por el contrario, las toxinas separadas del veneno de *M. mipartitus* y *M. multiscutatus* eluyeron en el primer tercio del cromatograma, al igual que la mayoría de los venenos de América del Sur, donde predominan 3FTx [17] como: *M. spixii*, *M. surinamensis* [58,65], *M. altirostris*, *M. corallinus* [66], *M. tschudii* [31], *M. pyrrhocryptus* [67] y *M. lemniscatus carvalhoi* [19]. La caracterización bioquímica del veneno muestra patrones electroforéticos similares al de otras especies de serpientes corales que han sido estudiadas con el mismo enfoque “bottom up”, donde se evidencia que la mayoría de los componentes migran a 5-17 KDa, peso molecular típico de las dos proteínas más abundantes (PLA₂ y 3FTx) [19].

Mediante el análisis por espectrometría de masas en tándem MS/MS, las fracciones separadas del veneno lograron ser asignadas a una familia de proteínas y según la distribución de la abundancia relativa, se identificó la presencia de dos patrones de composición divergentes: PLA₂ y 3FTx, siendo la razón por la que se conocen como venenos dicotómicos [19]. Existe una tendencia general marcada por la polarización de los fenotipos de los venenos de *Micrurus* a lo largo del eje Norte-Sur [17,62]. Además, se destaca la omnipresencia de ambas proteínas, que son las más abundantes en los tres venenos, los demás componentes varían de acuerdo con la especie.

El veneno con predominancia en PLA₂ corresponde a *M. lemniscatus helleri*, mientras que *M. mipartitus* posee mayor contenido de 3FTx. Esto indica que en Ecuador coexisten especies con ambos perfiles proteómicos, situación similar a Costa Rica [27,60–63], Colombia y Brasil [19,27,66,68]. Sin embargo, esta dicotomía fenotípica de los venenos se relaciona con la baja reactividad cruzada de los antivenenos de elápidos [17,19,64,67]. Por lo tanto, se destaca la importancia de la producción de un tratamiento con alta cobertura taxonómica, que tenga la capacidad de neutralizar ambos fenotipos presentes en las serpientes corales del país. Así mismo, llevar a cabo evaluaciones preclínicas con la finalidad de evaluar la eficiencia de los antivenenos.

El veneno de *M. lemniscatus* fue caracterizado en Colombia y Brasil, se reportan dos subespecies: *M. lemniscatus carvalhoi* (Brasil) y *M. lemniscatus helleri* (Colombia) [19]. La composición relativa de las toxinas de dos ejemplares reveló que en Brasil predomina significativamente el fenotipo 3FTx con 76,7% y 71,3%. Por lo contrario, en Colombia el fenotipo PLA₂ fue el más abundante con 62,5%. Al comparar estos resultados con el presente estudio, se encontró que *M. lemniscatus helleri* de Ecuador también presenta predominancia en los niveles de expresión de PLA₂ con 72,13%.

La predominancia de 3FTx (63,40%) en *M. mipartitus* en Ecuador, también se evidenció en el estudio realizado por Rey-Suárez et al. (2011) [27], que indica que *M. mipartitus* de Colombia y Costa Rica posee un fenotipo predominante de 3FTx, representado con 61,1% y 83,0%, respectivamente. Rey-Suárez et al. (2012) encontró una 3FTx abundante y letal en el veneno de la serpiente colombiana, llamada Mipartoxina-I [69], que también logró ser identificada en el veneno de este estudio. En cuanto a la presencia de metaloproteinasas del tipo III (SVMP-III), la especie de Ecuador tiene mayor abundancia relativa con 5,9%, en comparación con las especies de Colombia y Costa Rica con 1,6% y 3,6% respectivamente.

La dieta juega un papel importante en la composición proteica del veneno [4,20,27]. Cabe recalcar, que se ha observado que la toxicidad del veneno posee mayor efectividad contra la presa preferida [17]. Además, si se toma en cuenta la distribución geográfica, la región Amazónica posee mayor cantidad de especies por unidad de área en comparación con la región Costa [70], es decir, las serpientes que habitan en la Amazonía tendrán a su disposición un espectro más amplio de presas, por lo que la composición del veneno será más compleja [27]. En este contexto, se encontró predominancia del fenotipo PLA₂ para *M. lemniscatus helleri* (Amazonía), mientras que, para *M. mipartitus* (Costa) fue el fenotipo 3FTx.

La complejidad presentada por los venenos ricos en PLA₂ se caracteriza por la expansión del número de proteoformas, que se ve reflejada en la diversidad estructural y funcional [17,18], mostrando una variedad de actividades toxicológicas [71] como la neurotoxicidad, miotoxicidad, cardiotoxicidad, hemólisis, entre otras [15,58,62,72]. Esto con la finalidad tener la capacidad de hacer frente a diferentes tipos de presas y desempeñar funciones adaptativas asociadas con la inmovilización y digestión de las mismas [17,18].

Vergara et al. (2014) resaltan que los péptidos de la toxina 3FTx del veneno de *M. fulvius* tienen baja toxicidad y son las PLA₂ las responsables de la letalidad [15]. Así mismo, una fracción de PLA₂ del veneno *M. clarki*, evidenció elevada actividad letal en ratones, aunque las toxinas más abundantes fueron 3FTx, estas no presentaron toxicidad significativa [64]. En este contexto, se rompe el paradigma de que la neurotoxicidad de los venenos de *Micrurus* se atribuye principalmente a las 3FTx. Sin embargo, se debe tomar en cuenta que no todas las PLA₂ son neurotóxicas, sino que también existen PLA₂ miotóxicas. Rey-Suárez et al. (2017), aislaron y caracterizaron dos PLA₂: MmipPLA₂ de *M. mipartitus* y MdumPLA₂ de *M. dumerilii*. Ambas toxinas difieren significativamente en su toxicidad desencadenando actividades biológicas divergentes, donde MmipPLA₂ presenta alta letalidad en ratones, pero es levemente miotóxica, mientras que MdumPLA₂, mostró tener elevada miotoxicidad, pero baja letalidad [18]. La mipartoxina-I, aislada y caracterizada del veneno de *M. mipartitus*, también mostró alta letalidad en ratones [69], que sumado la letalidad de las PLA₂ mencionada anteriormente, sugieren que el veneno de *M. mipartitus* de este estudio es potencialmente letal.

La lemnitoxina es la toxina predominante en el veneno de *M. lemniscatus*, una PLA₂ que fue aislada y caracterizada del veneno de *M. lemniscatus* [73]. Se determinó que induce miotoxicidad en ensayos *in vivo* y mostró un efecto anticoagulante en el plasma humano,

además de desencadenar una actividad proinflamatoria al inducir el edema en ratones [74]. Sin embargo, no evidenció letalidad significativa [73]. Por lo tanto, se presume que el veneno de *M. lemniscatus helleri* también tendrá PLA₂ potencialmente miotóxicas. Cabe recalcar, que la miotoxicidad no ha sido considerada como una característica clínica importante en los accidentes ofídicos en humanos [17,75].

Los componentes más abundantes en el veneno de *Micrurus* han mostrado que juegan un papel importante en la toxicidad, siendo las 3FTx y PLA₂ las principales toxinas con funcionalidades tóxicas. Sin embargo, no se puede excluir que haya actividades sinérgicas con otros componentes de menor abundancia. Por ejemplo, el complejo heterodimérico MitTx que es el responsable del dolor, consiste en una subunidad tipo Kunitz unida de manera no covalente a un homólogo de PLA₂ catalíticamente inactivo [17]. Este complejo se aisló del veneno de *M. tener* y también se encontró en especies con fenotipo PLA₂ predominante: *M. mosquitensis* [63], *M. nigrocintus* y *M. dumerilii* [68]. Tomando en cuenta que en *M. lemniscatus helleri* de este estudio, también se encontraron inhibidores de serin proteasas tipo Kunitz, se presume de la existencia de este complejo en su veneno. La presencia de estas toxinas puede racionalizarse en un valor adaptativo doble: sirve para inmovilizar potencialmente a la presa, en compensación a la baja letalidad y como un código de señalización al poseer un patrón de color que disuaden a los depredadores. Esta característica es de valor, porque ha impulsado la selección de patrones de coloración miméticos por colúbridos conocidas corales falsas [17].

En el caso de *M. multiscutatus*, que ha sido reportada solo en Ecuador y Colombia, no existe ningún estudio sobre su caracterización proteómica, siendo esta la primera. Por este motivo, las secuencias de sus proteínas no se hallan en las bases de datos, lo cual evita una buena identificación (solo se identificaron 2 de 17 fracciones). Aunque la mayor abundancia relativa corresponde a PLA₂, se presume que al igual que el veneno de *M. mipartitus*, tiene una predominancia de 3FTx, debido a la baja cantidad en picos en comparación a *M. lemniscatus helleri*. En Ecuador, *M. multiscutatus* se han reportado menos de 10 hallazgos [1,42,49], sin mencionar la baja cantidad de veneno producido debido a su tamaño, que dificultan mucho más su estudio.

Las toxinas del veneno de *Micrurus*, además de desencadenar múltiples efectos toxicológicos, también poseen efectos farmacológicos como la citotoxicidad y actividad bactericida [71], despertando aún más interés en su investigación. Sin embargo, la cantidad de veneno producido por las corales ha sido la principal limitante para que sus

componentes sean aislados y caracterizados. En este estudio se utilizó un solo espécimen por cada especie de serpiente, dificultando tener una imagen representativa de la distribución espacial total. Así mismo, es la baja cantidad de veneno extraído, la razón que obstaculizó que más ensayos funcionales y de enfoque antivenómico se lleven a cabo. A pesar de estas limitaciones, este primer escalón logró añadir más piezas al estado de arte de la dicotomía fenotípica presente en los venenos de *Micrurus*, motivando a realizar futuras investigaciones con las 15 especies que aún no han sido estudiadas.

5. CAPÍTULO V: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

La caracterización de los venenos de tres especies del género *Micrurus* de Ecuador: *M. lemniscatus helleri*, *M. mipartitus* y *M. multiscutatus*, evidenció la presencia de variaciones interespecíficas relevantes en cuanto a la composición y abundancia relativa. Se determinó que las 3FTx y PLA₂ son las proteínas omnipresentes y más abundantes en los venenos. *M. lemniscatus helleri* mostró predominancia en el fenotipo PLA₂, mientras que en *M. mipartitus* prevalecieron las 3FTx. Sin embargo, para *M. multiscutatus*, no se pudo realizar una buena identificación que determine la predominancia entre PLA₂ y 3FTx.

El estudio proteómico de los venenos es indispensable para la producción de antivenenos. Al conocer la composición de los componentes predominantes se puede racionalizar la reactividad cruzada irregular de los antivenenos y mejorar su eficiencia para neutralizar los envenenamientos. Así mismo, permitir el diseño de antídotos poliespecíficos para este grupo tan diverso de elápidos en América.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Valencia JH, Garzón-Tello K, Barragán-Paladines ME. Serpientes venenosas del Ecuador: sistemática, taxonomía, historia natural, conservación, envenenamiento y aspectos antropológicos. Fundación Herpetológica Gustavo Orcés.; 2016. Available: <https://books.google.com.ec/books?id=LlvfwQEACAAJ>
2. Ciscotto PHC, Rates B, Silva DAF, Richardson M, Silva LP, Andrade H, et al. Venomic analysis and evaluation of antivenom cross-reactivity of South American *Micrurus* species. *J Proteomics*. 2011;74: 1810–1825. doi:10.1016/j.jprot.2011.07.011
3. Calvete JJ, Lomonte B. Present and Future of Snake Venom Proteomics Profiling. *Handbook of Venoms and Toxins of Reptiles*. Second edition. | Boca Raton : CRC Press, 2021.: CRC Press; 2021. pp. 19–28. doi:10.1201/9780429054204-3
4. Mackessy SP, Mackessy SP, editors. *Handbook of Venoms and Toxins of Reptiles*. CRC Press; 2016. doi:10.1201/9781420008661
5. Chippaux J-P. Snakebite envenomation turns again into a neglected tropical disease! *J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis*. 2017;23: 38. doi:10.1186/s40409-017-0127-6
6. Romero LE, Nuñez V, Rey P, Pulido S, Saldarriaga M, Pereañez JA. Inmunógenos recombinantes tipo fosfolipasa A2 y toxina de tres dedos para la producción de antivenenos de interés clínico en Colombia. *Iatreia*. 2021;34: S-26-S-28. doi:10.1007/s10616-017-0109-0.10.
7. Gutiérrez JM, Calvete JJ, Habib AG, Harrison RA, Williams DJ, Warrell DA. Snakebite envenoming. *Nat Rev Dis Prim*. 2017;3: 17063. doi:10.1038/nrdp.2017.63
8. Sasa M, Vazquez S. Snakebite envenomation in Costa Rica: a revision of incidence in the decade 1990–2000. *Toxicon*. 2003;41: 19–22. doi:10.1016/S0041-0101(02)00172-1
9. Ochoa-Avilés A, Heredia-Andino OS, Escandón SA, Celorio-Carvajal CA, Arias-Peláez MC, Zaruma-Torres F, et al. Viperidae snakebites in Ecuador: A review of epidemiological and ecological aspects. *Toxicon X*. 2020;7: 100051. doi:10.1016/j.toxcx.2020.100051
10. Ecuador M de SP, “. Efectos Tóxicos Mordedura de Serpientes Ecuador 2020. 2020 p. 5. Available: www.salud.gob.ec/wp-content/uploads/2021/01/Toxicos-y-quimicos-SE-53.pdf
11. Santacruz-Ortega, P., Salazar-Valenzuela D 2020. Envenenamiento por mordeduras de serpientes en Ecuador. *BIOWEB Pontif Univ Católica del Ecuador*. 2020; 1–10.
12. 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*. 2019;13: 209–229.
13. Rodríguez-Guerra A. *Hydrophis platurus*. 2020. Available: [https://bioweb.bio/faunaweb/reptiliaweb/FichaEspecie/Hydrophis platurus](https://bioweb.bio/faunaweb/reptiliaweb/FichaEspecie/Hydrophis%20platurus), acceso Jueves, 6 de Octubre de 2022.
14. Chippaux J-P. Incidence and mortality due to snakebite in the Americas. Gutiérrez JM, editor. *PLoS Negl Trop Dis*. 2017;11: e0005662. doi:10.1371/journal.pntd.0005662
15. Vergara I, Pedraza-Escalona M, Paniagua D, Restano-Cassulini R, Zamudio F, Batista CVF, et al. Eastern coral snake *Micrurus fulvius* venom toxicity in mice is mainly determined by neurotoxic phospholipases A2. *J Proteomics*. 2014;105: 295–306. doi:10.1016/j.jprot.2014.02.027
16. Cardona-Ruda A, Rey-Suárez P, Núñez V. Anti-Neurotoxins from *Micrurus mipartitus* in the Development of Coral Snake Antivenoms. *Toxins (Basel)*. 2022;14: 265. doi:10.3390/toxins14040265
17. Lomonte B, Rey-Suárez P, Fernández J, Sasa M, Pla D, Vargas N, et al. Venoms of *Micrurus* coral snakes: Evolutionary trends in compositional patterns emerging from proteomic analyses. *Toxicon*. 2016;122: 7–25. doi:10.1016/j.toxicon.2016.09.008
18. Rey-Suárez P, Núñez V, Saldarriaga-Córdoba M, Lomonte B. Primary structures and partial toxicological characterization of two phospholipases A2 from *Micrurus mipartitus* and *Micrurus dumerilii* coral snake venoms. *Biochimie*. 2017;137: 88–98. doi:10.1016/j.biochi.2017.03.008

19. Sanz L, Quesada-Bernat S, Ramos T, Casais-e-Silva LL, Corrêa-Netto C, Silva-Haad JJ, et al. New insights into the phylogeographic distribution of the 3FTx/PLA 2 venom dichotomy across genus *Micrurus* in South America. *J Proteomics*. 2019;200: 90–101. doi:10.1016/j.jprot.2019.03.014
20. Bolivar Barbosa JA. Caracterización bioquímica parcial del veneno de las especies *Micrurus medemi*, *Micrurus sangilensis* y *Micrurus lemniscatus* de Colombia. Universidad Nacional de Colombia. 2019. Available: <https://repositorio.unal.edu.co/bitstream/handle/unal/76571/1030537666.2019.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
21. 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
22. Lomonte B. Venenos de serpiente: de la investigación al tratamiento. *Acta Med Costarric*. 2012;54: 86–96. Available: http://www.scielo.sa.cr/scielo.php?pid=S0001-60022012000200004&script=sci_arttext
23. Sarmiento K, Rodríguez A, Quevedo-Buitrago W, Torres I, Ríos C, Ruíz L, et al. Comparación de la eficacia, la seguridad y la farmacocinética de los antivenenos antiofídicos: revisión de literatura. *Univ Médica*. 2019;61. doi:10.11144/Javeriana.umed61-1.anti
24. Castillo-Beltrán MC, Hurtado-Gómez JP, Corredor-Espinel V, Ruiz-Gómez FJ. A polyvalent coral snake antivenom with broad neutralization capacity. Gutiérrez JM, editor. *PLoS Negl Trop Dis*. 2019;13: e0007250. doi:10.1371/journal.pntd.0007250
25. Rey-Suárez P, Acosta C, Torres U, Saldarriaga-Córdoba M, Lomonte B, Núñez V. MipLAAO, a new L-amino acid oxidase from the redbellied coral snake *Micrurus mipartitus*. *PeerJ*. 2018;2018: 1–21. doi:10.7717/peerj.4924
26. Rey-Suárez P, Saldarriaga-Córdoba M, Torres U, Marin-Villa M, Lomonte B, Núñez V. Novel three-finger toxins from *Micrurus dumerilii* and *Micrurus mipartitus* coral snake venoms: Phylogenetic relationships and characterization of Clarkitoxin-I-Mdum. *Toxicon*. 2019;170: 85–93. doi:10.1016/j.toxicon.2019.09.017
27. Rey-Suárez P, Núñez V, Gutiérrez JM, Lomonte B. Proteomic and biological characterization of the venom of the redbellied coral snake, *Micrurus mipartitus* (Elapidae), from Colombia and Costa Rica. *J Proteomics*. 2011;75: 655–667. doi:10.1016/j.jprot.2011.09.003
28. Bénard-Valle M, Carbajal-Saucedo A, de Roodt A, López-Vera E, Alagón A. Biochemical characterization of the venom of the coral snake *Micrurus tener* and comparative biological activities in the mouse and a reptile model. *Toxicon*. 2014;77: 6–15. doi:10.1016/j.toxicon.2013.10.005
29. De Castro KLP, Lopes-De-souza L, de Oliveira D, Machado-De-ávila RA, Paiva ALB, de Freitas CF, et al. A combined strategy to improve the development of a coral antivenom against *micrurus* spp. *Front Immunol*. 2019;10: 1–13. doi:10.3389/fimmu.2019.02422
30. Del Brutto OH, Del Brutto VJ. Neurological complications of venomous snake bites: a review. *Acta Neurol Scand*. 2012;125: 363–372. doi:10.1111/j.1600-0404.2011.01593.x
31. Sanz L, Pla D, Pérez A, Rodríguez Y, Zavaleta A, Salas M, et al. Venomic analysis of the poorly studied desert coral snake, *Micrurus tschudii* *tschudii*, supports the 3FTx/PLA2 dichotomy across *Micrurus* venoms. *Toxins (Basel)*. 2016;8: 9–12. doi:10.3390/toxins8060178
32. Espino-Solis GP, Riaño-Umbarila L, Becerril B, Possani LD. Antidotes against venomous animals: State of the art and perspectives. *J Proteomics*. 2009;72: 183–199. doi:10.1016/j.jprot.2009.01.020
33. Piedrahita JD, Rey-Suárez P. Reconocimiento y neutralización de un antiveneno anticoral polivalente colombiano sobre los venenos de *Micrurus mipartitus* y *Micrurus dumerilii* Resumen. 2021. Available: <https://bibliotecadigital.udea.edu.co/handle/10495/20915>
34. Salazar-Valenzuela D, Kuch U, Torres-Carvajal O, Valencia JH, Gibbs HL. Divergence of tropical pitvipers promoted by independent colonization events of dry montane Andean habitats. *J Biogeogr*. 2019;46: 1826–1840. doi:10.1111/jbi.13661
35. Fry BG, Winkel KD, Wickramaratna JC, Hodgson WC, Wüster W. Effectiveness of Snake Antivenom: Species and Regional Venom Variation and Its Clinical Impact. *J Toxicol Toxin Rev*. 2003;22: 23–34. doi:10.1081/TXR-120019018

36. Bolaños R, Cerdas L, Abalos JW. Venenos de las serpientes coral (*Micrurus* spp.): informe sobre un antiveneno polivalente para las Américas. *Boletín la Of Sanit Panam (OSP)*; 84 (2), feb 1978. 1978.
37. de Roodt RA, Lanari LC, Ramírez JE, Gómez C, Barragán J, Litwin S, et al. Cross-reactivity of some *Micrurus* venoms against experimental and therapeutic anti-*Micrurus* antivenoms. *Toxicon*. 2021;200: 153–164. doi:10.1016/j.toxicon.2021.07.011
38. Fan HW, Natal Vigilato MA, Augusto Pompei JC, Gutiérrez JM. Situación de los laboratorios públicos productores de antivenenos en América Latina. *Rev Panam Salud Pública*. 2019;43: 1. doi:10.26633/RPSP.2019.92
39. Obando-Mora D. Venómica y antivenómica de venenos botrópicos Colombia y Ecuador. 2021. Available: <https://roderic.uv.es/handle/10550/77823>
40. Terán M del C, 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
41. 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
42. Arteaga A, Bustamante L, Vieira J, Guayasamin JM. Reptiles of Ecuador: life in the middle of the world. *Tropical Herping*; 2022. doi:10.47051/MNHT9360
43. Pazmiño-Otamendi G. *Micrurus lemniscatus*. 2020. Available: <https://bioweb.bio/faunaweb/reptiliaweb/FichaEspecie/Micrurus lemniscatus>
44. Manock SR, Suarez G, Graham D, Avila-Aguero ML, Warrell DA. Neurotoxic envenoming by South American coral snake (*Micrurus lemniscatus helleri*): case report from eastern Ecuador and review. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2008;102: 1127–1132. doi:10.1016/j.trstmh.2008.03.026
45. Rodríguez-Guerra A. *Micrurus mipartitus*. 2020. Available: <https://bioweb.bio/faunaweb/reptiliaweb/FichaEspecie/Micrurus mipartitus>
46. Vera Pérez LE, Zúñiga Baos JA, Ayerbe González S. Nuevos registros de longitud y dieta de *Micrurus mipartitus* (Duméril, Bibron y Duméril, 1854) (Serpentes: Elapidae). *Rev Noved Colomb*. 2019;14: 49–56. doi:10.47374/novcol.2019.v14.1434
47. Roze JA. Coral Snakes of the Americas: Biology, Identification, and Venoms. Krieger; 1996. Available: <https://books.google.com.ec/books?id=2kJ4QgAACAAJ>
48. Vieira J. Cauca Coralsnake (*Micrurus multiscutatus*). 2021 pp. 2–6. doi:10.47051/NRVR4173
49. Rodríguez-Guerra A. *Micrurus multiscutatus*. 2020 pp. 6–8. Available: <https://bioweb.bio/faunaweb/reptiliaweb/FichaEspecie/Micrurus multiscutatus>
50. Koh DCI, Armugam A, Jeyaseelan K. Snake venom components and their applications in biomedicine. *Cell Mol Life Sci*. 2006;63: 3030–3041. doi:10.1007/s00018-006-6315-0
51. World Health Organization. Snakebite envenoming. 2021. Available: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/snakebite-envenoming>
52. Calvete JJ. Snake venomomics: From the inventory of toxins to biology. *Toxicon*. 2013;75: 44–62. doi:10.1016/j.toxicon.2013.03.020
53. Laemmli UK. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature*. 1970;227: 680–685. doi:10.1038/227680a0
54. Lomonte B, Calvete JJ. 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: 1–12. doi:10.1186/s40409-017-0117-8
55. Calvete, Juan J.; Lomonte, Bruno; Sanz, Libia; Gutiérrez JM. Venómica y Antivenómica: Herramientas proteómicas para hacer frente a la patología desatendida del envenenamiento ofídico. 2015.
56. Munuera Mora JJ. Caracterización proteómica de venenos de serpientes de interés biomédico. 2016.
57. Abián J, Carrascal M, Gay M. Introducción a la Espectrometría de Masas para la caracterización de

péptidos y proteínas en Proteómica. *Proteómica*. 2008;2: 17–31.

58. Olamendi-Portugal T, Batista CVF, Restano-Cassulini R, Pando V, Villa-Hernandez O, Zavaleta-Martínez-Vargas A, et al. Proteomic analysis of the venom from the fish eating coral snake *Micrurus surinamensis*: Novel toxins, their function and phylogeny. *Proteomics*. 2008;8: 1919–1932. doi:10.1002/pmic.200700668
59. Bénard-Valle M, Neri-Castro E, Yañez-Mendoza MF, Lomonte B, Olvera A, Zamudio F, et al. Functional, proteomic and transcriptomic characterization of the venom from *Micrurus browni browni*: Identification of the first lethal multimeric neurotoxin in coral snake venom. *J Proteomics*. 2020;225: 103863. doi:10.1016/j.jprot.2020.103863
60. Lippa E, Török F, Gómez A, Corrales G, Chacón D, Sasa M, et al. First look into the venom of Roatan Island's critically endangered coral snake *Micrurus ruatanus*: Proteomic characterization, toxicity, immunorecognition and neutralization by an antivenom. *J Proteomics*. 2019;198: 177–185. doi:10.1016/j.jprot.2019.01.007
61. Mena G, Chaves-Araya S, Chacón J, Török E, Török F, Bonilla F, et al. Proteomic and toxicological analysis of the venom of *Micrurus yatesi* and its neutralization by an antivenom. *Toxicon X*. 2022;13: 100097. doi:10.1016/j.toxcx.2022.100097
62. Fernández J, Alape-Girón A, Angulo Y, Sanz L, Gutiérrez JM, Calvete JJ, et al. Venomic and antivenomic analyses of the Central American coral snake, *Micrurus nigrocinctus* (Elapidae). *J Proteome Res*. 2011;10: 1816–1827. doi:10.1021/pr101091a
63. Fernández J, Vargas-Vargas N, Pla D, Sasa M, Rey-Suárez P, Sanz L, et al. Snake venomomics of *Micrurus alleni* and *Micrurus mosquitensis* from the Caribbean region of Costa Rica reveals two divergent compositional patterns in New World elapids. *Toxicon*. 2015;107: 217–233. doi:10.1016/j.toxicon.2015.08.016
64. Lomonte B, Sasa M, Rey-Suárez P, Bryan W, Gutiérrez J. Venom of the Coral Snake *Micrurus clarki*: Proteomic Profile, Toxicity, Immunological Cross-Neutralization, and Characterization of a Three-Finger Toxin. *Toxins (Basel)*. 2016;8: 138. doi:10.3390/toxins8050138
65. Sanz L, de Freitas-Lima LN, Quesada-Bernat S, Graça-de-Souza VK, Soares AM, Calderón L de A, et al. Comparative venomomics of Brazilian coral snakes: *Micrurus frontalis*, *Micrurus spixii spixii*, and *Micrurus surinamensis*. *Toxicon*. 2019;166: 39–45. doi:10.1016/j.toxicon.2019.05.001
66. Corrêa-Netto C, Junqueira-de-Azevedo I de LM, Silva DA, Ho PL, Leitão-de-Araújo M, Alves MLM, et al. Snake venomomics and venom gland transcriptomic analysis of Brazilian coral snakes, *Micrurus altirostris* and *M. corallinus*. *J Proteomics*. 2011;74: 1795–1809. doi:10.1016/j.jprot.2011.04.003
67. Olamendi-Portugal T, Batista CVF, Pedraza-Escalona M, Restano-Cassulini R, Zamudio FZ, Benard-Valle M, et al. New insights into the proteomic characterization of the coral snake *Micrurus pyrrhocryptus* venom. *Toxicon*. 2018;153: 23–31. doi:10.1016/j.toxicon.2018.08.003
68. Rey-Suárez P, Núñez V, Fernández J, Lomonte B. Integrative characterization of the venom of the coral snake *Micrurus dumerilii* (Elapidae) from Colombia: Proteome, toxicity, and cross-neutralization by antivenom. *J Proteomics*. 2016;136: 262–273. doi:10.1016/j.jprot.2016.02.006
69. Rey-Suárez P, Floriano RS, Rostelato-Ferreira S, Saldarriaga-Córdoba M, Núñez V, Rodrigues-Simioni L, et al. Mipartoxin-I, a novel three-finger toxin, is the major neurotoxic component in the venom of the redtail coral snake *Micrurus mipartitus* (Elapidae). *Toxicon*. 2012;60: 851–863. doi:10.1016/j.toxicon.2012.05.023
70. Bravo-Velásquez E. La Biodiversidad en el Ecuador. Quito; 2014. Available: <https://dspace.ups.edu.ec/handle/123456789/6788>
71. Gutiérrez JM, Lomonte B. Phospholipases A2: Unveiling the secrets of a functionally versatile group of snake venom toxins. *Toxicon*. 2013;62: 27–39. doi:10.1016/j.toxicon.2012.09.006
72. Arce-Bejarano R, Lomonte B, Gutiérrez JM. Intravascular hemolysis induced by the venom of the Eastern coral snake, *Micrurus fulvius*, in a mouse model: Identification of directly hemolytic phospholipases A2. *Toxicon*. 2014;90: 26–35. doi:10.1016/j.toxicon.2014.07.010
73. Casais-e-Silva LL, Teixeira CFP, Lebrun I, Lomonte B, Alape-Girón A, Gutiérrez JM. Lemnitoxin, the major component of *Micrurus lemniscatus* coral snake venom, is a myotoxic and pro-inflammatory phospholipase A2. *Toxicol Lett*. 2016;257: 60–71. doi:10.1016/j.toxlet.2016.06.005
74. Casais-e-Silva LL, da Cruz-Hofling MA, Teixeira CFP. The edematogenic effect of *Micrurus*

lemniscatus venom is dependent on venom phospholipase A2 activity and modulated by non-neurogenic factors. *Toxicol Lett.* 2022;369: 12–21. doi:10.1016/j.toxlet.2022.08.003

75. Bucarechi F, De Capitani EM, Vieira RJ, Rodrigues CK, Zannin M, Da Silva NJ, et al. Coral snake bites (*Micrurus* spp.) in Brazil: a review of literature reports. *Clin Toxicol.* 2016;54: 222–234. doi:10.3109/15563650.2015.1135337