

ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DEL LITORAL



FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y MATEMÁTICAS

PROYECTO DE TITULACIÓN

PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE:

“MAGÍSTER EN GESTIÓN INTEGRAL DE LABORATORIOS DE QUÍMICA”

TEMA:

CARACTERIZACIÓN DE LA COMPOSICIÓN PROTEICA Y ENZIMÁTICA DEL VENENO DE *LACHESIS MUTA*.

AUTOR:

EVENCIO JOEL MEDINA VILLAMIZAR

Guayaquil – Ecuador

2022

RESUMEN

El envenenamiento ofídico por el género *Lachesis* ocurre en menor frecuencia en comparación con el género *bothrópico*, pero es de similar relevancia médica por la complejidad del cuadro clínico, resultante de la gran cantidad de veneno inyectado. El tratamiento empleado mundialmente se basa en el uso de antiveneno, el cual debe ser capaz de inmunoreconocer y neutralizar las toxinas determinantes de la sintomatología. En el desarrollo de terapias para este problema, el conocimiento de las toxinas blanco es fundamental, y la caracterización proteómica y enzimática del veneno de *L. muta*, era hasta ahora una tarea pendiente en el Ecuador. La diversidad de toxinas del veneno de *L. muta* se analizó mediante un abordaje integrativo fundamentado en la aplicación de fraccionamiento por RP-HPLC, SDS-PAGE y secuencia de péptidos trípticos por LC/MS en tándem. Se identificaron 11 familias de proteínas, prevaleciendo las SVSP 23%, BPP 21%, CTL 17%, SVMP 11%, PLA2 10%, Desintegrina 6%, NGF 4%, LAAO 3%, CRISP 3%, Ohanin 1%. Por otro lado, la caracterización enzimática del veneno mostró mayor actividad SVSP comparado con los venenos de mayor importancia médica en Ecuador, *B. atrox* y *B. asper*. Esto se alinea con el alto contenido de SVSP encontrado en los componentes del mismo. Además, se evidenció similitud entre los componentes del veneno de *L. muta* ecuatoriana y *L. stenophrys* de América Central. Sin embargo, el proteoma de *L. muta* indica la presencia de proteínas del tipo *desintegrina* y mayor contenido de CTL.

Palabras clave: toxinas, proteómica, enzimática, antiveneno.

ABSTRACT

Ophidian poisoning by the *Lachesis* genus occurs less frequently compared to the *Bothropic* genus. However, it is also relevance because of their complex symptomatology, resulting of the large amount of poison inoculated. The treatment used worldwide is based on the application of antivenom, which must be able to recognize and neutralize the toxins responsable of the symptoms. In the development of therapies for this problem, the knowledge of the target toxins is fundamental, and the proteomic and enzymatic characterization of the venom of *Lachesis muta*, until now, it was a pending task in Ecuador. Toxin diversity of *L. muta* venom was analyzed using an integrative approach based to the application of RP-HPLC fractionation, SDS-PAGE, and tryptic peptide sequencing by tandem LC/MS. 11 protein families were identified, prevailing SVSP 23%, BPP 21%, CTL 17%, SVMP 11%, PLA2 10%, Disintegrin 6%, NGF 4%, LAAO 3%, CRISP 3%, Ohanin 1%. On the other hand, the enzymatic characterization of the venom showed higher SVSP activity compared to the venoms of greater medical importance in Ecuador, *Bothrops atrox* and *Bothrops asper*. This aligns with the high content of SVSP found in the components of the same. Therefore, similarity was found between the components of the venom of Ecuadorian *L. muta* and *L. stenophrys* from Central America. Nevertheless, the proteome of *L. muta* indicates the presence of disintegrin-type proteins and a higher content of CTL.

Key words: toxins, proteomics, enzymatic, antivenom.

DECLARACIÓN EXPRESA

La responsabilidad por los hechos y doctrinas expuestas en este Proyecto de Titulación me corresponde exclusivamente y ha sido desarrollado respetando derechos intelectuales de terceros conforme las citas que constan en el documento, cuyas fuentes se incorporan en las referencias o bibliografías. Consecuentemente este trabajo es de mi total autoría. El patrimonio intelectual del mismo corresponde exclusivamente a la ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DEL LITORAL.

En virtud de esta declaración, me responsabilizo del contenido, veracidad y alcance del Trabajo de Titulación referido.

Lcdo. Evencio Joel Medina Villamizar

TRIBUNAL DE GRADUACIÓN



Firmado electrónicamente por:
**JOSE RAFAEL
DE ALMEIDA**

Dr. Joel Eduardo Vielma Puente

PRESIDENTE

José Rafael de Almeida PhD.

TUTOR

MSc. Nadia Flores

DOCENTE EVALUADOR

ABREVIATURAS O SIGLAS

RP-HPLC	Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiencia en Fase Reversa del inglés Reverse Phase High Performance Liquid Chromatography.
HPLC	Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiencia del inglés High Performance Liquid Chromatography.
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico del inglés sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis.
LC/MS	Cromatografía Líquida acoplada a Espectrometría de Masas del inglés Liquid Chromatography Mass Spectrometry.
LC-ESI-MS	Cromatógrafo Líquido acoplado a Espectrómetro de Masas con Ionización Electrospray (Cuádruplo con Tiempo de Vuelo) del inglés Liquid Chromatograph coupled to Mass Spectrometer with Electrospray Ionization (Quadrupole with Time of Flight)
INSPI	Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública.
LD50	Dosis letal media del inglés Median lethal dose.
ANOVA	Análisis de varianza.
BPP/C-NP	Péptidos potenciadores de bradicinina/ péptidos natriuréticos tipo C del inglés Bradykinin Potentiating Peptides and C-type Natriuretic Peptide.
CTL	Lectinas Tipo C del inglés C-type Lectin.
LAAO	L-aminoácido oxidasas del inglés L-amino acid oxidase.
PLA ₂	Fosfolipasas A ₂ del inglés Phospholipase A ₂
SVMP	Metaloproteinasas de venenos de serpientes del inglés Snake Venom Metalloproteinase.
3FTX	Toxinas de tres dedos del inglés Three-finger toxins.

CRISP	Proteína secretoras ricas en cisteína del inglés Cysteine-Rich Secretory Proteins.
NGF	Factor de crecimiento nervioso del inglés Nerve growth factor.
CRD	Dominio Rico en Cisteína del inglés Cysteine-Rich Domain.
TFA	Ácido trifluoroacético del inglés Trifluoroacetic acid.
AF	Ácido fórmico del inglés Formica Acid.
ACN	Acetonitrilo del inglés Acetonitrile.
DTT	Ditiotreitol del inglés Dithiothreitol.
SDS	Sodio dodecil sulfato del inglés sodium dodecyl sulfate.
PSA	Persulfato de amonio del inglés Ammonium persulfate.
TEMED	N,N,N',N'-Tetrametil etilendiamina del inglés N,N,N',N'-Tetramethyl ethylenediamine.
AMBIC	Bicarbonato de amonio del inglés Ammonium bicarbonate.
TCA	Ácido tricloroacético del inglés Trichloroacetic acid.
IAA	Iodoacetamida del inglés Iodoacetamide.
NOBA	Ácido benzoico 4-nitro-3 (octanoiloxi) del inglés (4-Nitro-3-(octanoyloxi) benzoic acid.
DMSO	Dimetilsulfóxido del inglés Dimethyl Sulfoxide.
L-Bapna	Clorhidrato de N α -benzoil-L-arginina 4-nitroanilida del inglés N α -Benzoyl-L-arginine 4-nitroanilide hydrochloride.

TABLA DE CONTENIDO

CAPÍTULO 1	1
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Antecedentes.....	3
1.2. Descripción del problema	6
1.3. Objetivos.....	8
1.4. Hipótesis	9
1.5. Alcance	9
CAPÍTULO 2	10
2. MARCO TEÓRICO.....	10
2.1. Envenenamiento ofídico a nivel mundial.....	10
2.2. Registro de mordeduras de serpientes en Ecuador.....	12
2.3. Biodiversidad y serpientes en Ecuador.....	13
2.4. <i>Lachesis muta</i>	14
2.5. Manifestaciones clínicas ocasionadas por el envenenamiento por mordeduras de serpientes	16
2.6. Antivenenos	17
2.7. Venenos y su composición	17
2.8. Descripción de los componentes tóxicos del veneno	20
CAPÍTULO 3	29
3. METODOLOGÍA.....	29
3.1. Población y muestra	30
3.2. Equipos, materiales y reactivos	31
3.3. Caracterización Bioquímica	33
3.4. Caracterización enzimática.....	40
CAPÍTULO 4	45
4. RESULTADOS.....	45
4.1. Caracterización bioquímica.....	45
4.2. Caracterización enzimática.....	55
4.3. Discusión	56
CAPÍTULO 5	63
5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	63

5.1. Conclusiones	63
5.2. Recomendaciones	64
6. Referencias	65
7. Anexos	71

LISTADO DE FIGURAS

Figura 2.1 Distribución geográfica del número estimado de envenenamientos y muertes por mordedura de serpiente[23].	11
Figura 2.2 Casos de mordeduras de serpientes, por provincia en Ecuador, SE01-53, año 2020[26].	12
Figura 2.3 Individuos de <i>Lachesis muta</i> del Parque Nacional Llanganates, provincia de Pastaza, Ecuador[17].	15
Figura 2.4 Niveles de toxinas en el veneno de vipéridos y elápidos[23].	19
Figura 2.5 Ejemplo de la estructura tridimensional de una 3FTx. Erabutoxina A, es una toxina con acción en el sistema nervioso que es miembro de la superfamilia 3FTx. Los tres "dedos" pueden ser visualizados como I, II y III. Adicionalmente, los cuatro enlaces disulfuro conservados se muestran en amarillo. Renderizado de PDB : 1QKD[36].	20
Figura 2.6 Alineación múltiple de la secuencia parcial de aminoácidos de Bj-CRP con otros CRISP de veneno de serpiente . Los residuos de cisteína relacionados con los enlaces disulfuro se destacan en amarillo[38].	21
Figura 2.8 Estructura general de LAAO (PDB ID: 1F8R; <i>Calloselasma rhodostoma</i> LAAO) (A) representación del sitio activo, la unión a FAD y los residuos de aminoácidos de glicosilación se muestran como barras verdes. Los puentes disulfuro están representados por barras amarillas. (B-D), residuos involucrados en la glicosilación y la unión a FAD resaltados. Las partes de la estructura secundaria que pertenecen a los dominios de unión a FAD, unión a sustrato y helicoidal están coloreadas en azul, rojo y verde, respectivamente[41].	24
Figura 3.1 Sitio de muestreo (1) del individuo <i>L. muta</i> para recolección de muestra de veneno[51].	30
Figura 3.2 Esquema ilustrativo de las etapas relacionadas a la preparación de muestra y fraccionamiento de proteínas del veneno de <i>L. muta</i> mediante RP-HPLC.	34

Figura 3.3 Representación de la identificación de proteínas mediante electroforesis SDS-PAGE en condiciones reductoras.....	35
Figura 3.4 Etapas usadas para la digestión de gel y digestión en solución y análisis de péptidos trípticos.....	39
Figura 3.5 Resumen del ensayo in vitro usado para evaluar la actividad proteolítica del veneno.....	41
Figura 3.6 Representacion de la cuantificacion de la actividad fosfolipasa A2 del veneno.....	42
Figura 3.7 Ilustración de la determinación de la actividad serín proteasa del veneno.....	43
Figura 3.8 Esquema de estimación de la actividad L-aminoácido oxidasa del veneno.....	44
Figura 4.1 Fraccionamiento del veneno de serpiente <i>Lachesis muta</i> mediante RP-HPLC.....	45
Figura 4.2 Electroforesis SDS-PAGE unidimensional de las fracciones de veneno de serpiente <i>Lachesis muta</i> obtenidas por RP-HPLC.....	47
Figura 4.3 Espectro de masas de ionización por electropulverización de la proteína aislada por RP-HPLC en la fracción 16, la cual exhibe una masa molecular 14KDa (figura 4.1, 4.2 y tabla 4.2).....	48
Figura 4.4 Composición del veneno de <i>Lachesis muta</i> según familia de proteínas identificadas en la presente investigación.....	55
Figura 4.5 Caracterización enzimática del veneno <i>Lachesis muta</i> en comparación con venenos de la misma familia Viperidae, <i>Bothrops asper</i> y <i>Bothrops atrox</i>	56
Figura 4.6 Herramientas analíticas comúnmente empleadas para el estudio de la composición de proteínas y péptidos de venenos de serpientes[8].....	58
Figura 4.7. Esquema simplificado del modo de adquisición de datos dependiente DDA que también fue usado en esta investigación[65].....	59

Figura 4.8 Representación simplificada de la elución de toxinas de venenos sometidas a separación cromatográfica por RP-HPLC [8].....60

Figura 4.9 Análisis comparativo del venoma de *Lachesis* previamente reportado en literatura. Se ilustra la composición proteica de los venenos de *Lachesis muta* (A) y *Lachesis stenophrys* (C), los cuales fueron determinados mediante el empleo de un enfoque proteómico[10].....61

LISTADO DE TABLAS

Tabla 4.1 Porcentaje de abundancia relativa de las fracciones del veneno obtenidas por RP-HPLC.	46
Tabla 4.2 Asignación de las fracciones RP-HPLC del veneno <i>Lachesis muta</i> a familias de proteínas mediante secuenciación de iones peptídicos por LC-ESI-MS resultantes de la digestión con tripsina en gel y en solución.....	50

CAPÍTULO 1

1. INTRODUCCIÓN

La caracterización proteica de venomas de serpientes en Ecuador, es una labor pionera, que permite conocer la diversidad de isoformas de toxinas del veneno que pueden ser empleadas en futuras investigaciones[1]. Las mordeduras de serpiente constituyen emergencias médicas hospitalarias graves que pueden ocasionar a las víctimas discapacidades temporales o definitivas, y hasta la muerte[2]. Los accidentes ofídicos son comunes en países en vías de desarrollo por la alta diversidad de especies de serpientes venenosas, como es el caso de Ecuador.

En el país esta temática es poco explorada debido a diferentes razones, las cuales pueden incluir la falta de interés por parte de las autoridades, la subnotificación existente y el empleo de prácticas y costumbres autóctonas que retardan la intervención oportuna por parte del área de salud pública[3]. El uso de métodos ancestrales por parte de las víctimas al momento del accidente es un tipo de tratamiento ampliamente difundido para el envenenamiento ofídico ocasionado por la especie *L. muta* en diferentes comunidades de Ecuador[4].

El uso de tratamientos alternativos ocurre debido a que, de manera oficial, los centros de salud hacen uso de antivenenos heterólogos polivalentes importados que no incluyen a la especie *L. muta* entre el pool de inmunógenos. Además, la carencia de la producción de antivenenos a nivel local es un factor que puede comprometer la distribución y abastecimiento oportuno, principalmente en las regiones más afectadas. Por último, y no menos importante la variabilidad intra e interespecífica y geográfica es un factor a considerar en la efectividad de los antivenenos[5].

Por tanto, el conocimiento sobre los proteomas de venenos de serpientes en Ecuador es una necesidad y actividad prioritaria que permitiría generar la línea de base para el desarrollo de tratamientos eficaces (antiveneno), capaces de inmunoreconocer y neutralizar las toxinas con propiedades letales, revirtiendo de esta manera las emergencias ocasionadas por el envenenamiento[6].

Asimismo, la caracterización proteómica y enzimática a nivel mundial es evaluada haciendo uso de diversas técnicas químicas analíticas, que dependen de la estrategia empleada para descifrar los componentes del venoma. El siguiente trabajo empleó una estrategia conocida como “Venómica de Serpiente” o “Snake Venomics” por su nombre en inglés[7].

Snake venomics, permitió desarrollar una investigación del tipo cuali-cuantitativa, que permitió conocer la composición proteica del veneno *L. muta*, partiendo por un fraccionamiento RP-HPLC. Seguidamente, las enzimas presentes en las fracciones obtenidas fueron separadas por SDS-PAGE en condiciones reductoras. Por consiguiente, las toxinas capaces de mostrar bandas electroforéticas pronunciadas fueron escindidas y digeridas en gel para su posterior análisis por LC/MS en tándem[8]. De esta manera, se identificó las familias de proteínas presentes en el veneno de serpiente *L. muta*.

1.1. Antecedentes

El estudio de la composición de venenos de serpientes es altamente relevante en países tropicales y una etapa fundamental para el diseño de terapias más eficientes para el envenenamiento ofídico[9]. En este contexto se resumen las principales investigaciones proteómicas enfocadas en la caracterización de venenos de diferentes especies pertenecientes al género *Lachesis* o *Bothrops*, familia Viperidae realizados con muestras de países de América Central y Sur América.

Sanz y colaboradores, en el año 2008 realizaron la primera caracterización proteómica de venenos de dos víboras del género *Lachesis* estrechamente emparentadas, *L. muta* (Bushmaster de América del Sur) y *L. stenophrys* (Bushmaster de América Central). Los espectros de masas y análisis bioinformáticos evidenciaron que ambas especies comparten un conjunto proteico similar, péptidos potenciadores de bradicinina (BPP), serina proteinasas (SVSP), una lectina de tipo C (CTL) específica de galactosa y L-amino oxidasas (LAOO). Por otro lado, los resultados destacan diferencias cuantitativas y cualitativas intraespecíficas en la expresión de fosfolipasas (PLA₂) cuando se compararon los venenos de cinco especímenes de *L. muta* (3 de Bolivia y 2 de Perú). Estas variaciones funcionales debido al cambio estructural de las toxinas PLA_{2s} pueden haber sido un biomarcador durante la especiación y adaptación de las poblaciones de serpientes divergentes nichos ecológicos o también resultado de la competencia por los recursos existentes[10].

Madrigal y colaboradores en el año 2012, investigó la influencia de la edad en la composición molecular del veneno de *L. stenophrys* (Costa Rica). El análisis proteómico demostró cambios ontogénicos significativos en *L. stenophrys*. El veneno de recién nacidos y juveniles de 2 años se caracterizó por una alta abundancia de serina proteinasa (SVSP), potenciador de bradicinina y péptidos natriurético tipo C (BPP/C-NP), mientras individuos adultos se componen por alto porcentaje de metaloproteasas de los grupos PI y PIII (SVMP PI>PIII) en adultos. Adicionalmente, mediante un análisis comparativo hallaron gran similitud en el perfil de elución de toxinas en cromatografía líquida y en la composición global de los venenos adultos de *L. melanocephala* versus *L. stenophrys* y *L. muta muta* (Bolivia). Esta similitud entre los venenos de estos dos taxones centroamericanos fue evidenciada por una cantidad numerosa de iones peptídicos similares encontrados en el análisis entre *L. melanocephala* y *L. stenophrys*[11].

Posteriormente, Pla y colaboradores, en el año 2013, realizaron un estudio venómico incluyendo muestras de *L. muta rhombeata* (Brasil) y la caracterización previa de varios taxones de *Lachesis*. La similitud entre los venenos de *L. muta rhombeata* versus los de *L. stenophrys*, *L. melanocephala*, *L. acrochorda*, y *L. muta* oscilan entre un 33 y 51% basados en el número de iones de péptidos trípticos idénticos entre las bandas de proteínas que exhiben sus perfiles cromatográficos y electroforéticos. En este contexto, se evidenció que dos antivenenos, producidos usando *L. stenophrys* o *L. m. rhombeata* como pool inmunogénico, exhiben paraespecificidad hacia todos los demás venenos congéneres[12].

Lomonte y colaboradores en el año 2014, realizaron una investigación centrada en las implicaciones biológicas y terapéuticas de la variabilidad de los perfiles proteómicos de venenos de serpientes de Costa Rica. En resumen, sus hallazgos corroboran lo descrito por Alape en relación con la naturaleza proteica de los venenos vipéridos[5]. Estos contienen alrededor de una docena de familias de proteínas en proporciones distintas, donde los principales componentes pertenecen exclusivamente a tres clases: SVMP, PLA₂ y SVSP. En contraste, en especies como *Bothriechis nigroviridis*, *Bothriechis supraciliaris* y *L. melanocephala*, presentan una expresión más significativa de péptidos de bajo peso molecular, a menudo del tipo vasoactivo. Tales péptidos no se han detectado en el veneno de terciopelo *B. asper* (ya sea de las poblaciones del Caribe o del Pacífico de Costa Rica). Como se describió anteriormente, esta diferencia composicional incluso entre especies estrechamente relacionadas puede atribuirse a diferentes factores, tales como la divergencia filogenética, dieta, cambios por la edad e inclusive los rangos de distribución geográfica[7].

Terán y Lomonte, en el año 2016, determinaron la actividad letal de un total de 16 muestras de venenos de seis especies de vipéridos colectados en Ecuador en modelos animales CD-1. Los resultados encontrados confirman variaciones funcionales, tanto a nivel interespecífico como intraespecífico. Los diferentes valores de dosis letales encontrados son de extrema relevancia en la definición de los venenos de referencia para la producción y control de los antivenenos de uso terapéutico, así como subrayan la importancia de caracterizar a nivel bioquímico los venenos de importancia clínica en el país [13].

Lomonte y colaboradores en el año 2020, caracterizaron los venenos de doce especies de serpientes de la familia Viperidae de Perú mediante perfiles electroforéticos, cromatográficos y enzimáticos para PLA₂ y actividades proteolíticas *in vitro*. El enfoque de “bottom up” fue seleccionado para el análisis proteómico. Los patrones electroforéticos en condiciones reductoras evidencian semejanzas significativas entre varios venenos, por ejemplo, *B. atrox*, *B. barnetti*, *B. pictus* y *B. neuwiedii*. Por otro lado, los perfiles obtenidos por cromatografía líquida de alta eficiencia fase reversa (RP-HPLC) mostraron variación en los tiempos de retención de los picos correspondientes a las PLA₂. Estas fracciones presentaron mayor absorbancia en las especies *Bothriechis schlegelii* y *Bothrocophias hyoprora*. Dicha información es confirmada también por los ensayos colorimétricos y espectrofotométricos usados para determinar la actividad hidrolítica de las PLA₂[14].

En resumen, venenos son mezclas complejas y su diversidad bioquímica y funcional desafían el desarrollo de antivenenos eficaces, así como también ofrece un amplio espectro de estructuras diferentes para el desarrollo de nuevas medicinas o herramientas de investigación para la comprensión de procesos patológicos. Por tanto, un análisis proteómico de los venenos ecuatorianos abre posibilidades para el desarrollo de la biotecnología farmacéutica y terapéutica de los envenenamientos por mordedura de serpientes.

1.2. Descripción del problema

Las mordeduras de serpiente constituyen emergencias médicas hospitalarias de gran impacto que resultan en una diversidad de manifestaciones, tales como parálisis grave de los músculos respiratorios, trastornos hemorrágicos potencialmente mortales, insuficiencia renal irreversible o grave destrucción local de los tejidos que causan discapacidades permanentes y la amputación de un miembro[15].

El Ecuador alberga una diversidad de 230 especies de serpientes de las cuales 35 (15,2%) son venenosas y potencialmente peligrosas para el ser humano pertenecientes a dos familias; Elapidae y Viperidae, [15][16]. El envenenamiento bothrópico lidera los números de accidentes, siendo responsable por aproximadamente 70-80% de los casos registrados en el país. El perfil epidemiológico está caracterizado por la predominancia de accidentes por *B. atrox* en la Amazonía y *B. asper* en la Costa. El envenenamiento laquetico se encuentra dentro 30% restante, juntamente con otras serpientes vipéridas [2]. Debido a la cantidad de veneno que inyecta, cuando ocurre estos eventos suelen ser muy graves.

Lachesis muta, ampliamente conocida como verrugosas son las serpientes venenosas más grandes de todos los vipéridos a nivel mundial. [17]. Esta especie de serpiente presenta un veneno caracterizado por potentes efectos proteolíticos, hemorrágicos, miotóxicos y también neurotóxicos. A nivel de la mordida puede causar dolor intenso, inflamación, necrosis que puede terminar en gangrena. En Costa Rica y Panamá, las mordeduras de esta especie han presentado una alta tasa de mortalidad[18].

Todas las manifestaciones clínicas y consecuencias del envenenamiento están íntimamente relacionada a la diversidad y abundancia de enzimas, proteínas y péptidos encontrados en el venoma[19]. El conocimiento molecular de estas mezclas es fundamental y permite diseñar estrategias terapéuticas (antivenenos) eficaces con alta capacidad de inmunoreconocer y neutralizar las toxinas letales, revirtiendo así el cuadro clínico y sintomatología del envenenamiento, pero también abre ventanas para el biodescubrimiento de arquetipos moleculares útiles para el diagnóstico, avances biomédicos y farmacéutico en diferentes áreas[20].

Por lo tanto, la problemática con respecto al tratamiento de primera línea para el envenenamiento ofídico por parte de la especie *Lachesis muta* en Ecuador son los antivenenos heterólogos polivalentes importados que no incluye esta especie en el pool de inmunógenos. [21]. De esta manera, la caracterización proteómica de los venenos de las principales serpientes halladas en cada región del Ecuador se vuelve una tarea prioritaria y alineada a los objetivos de la Organización Mundial de Salud (OMS) de mitigar los impactos ocasionados por el envenenamiento de mordedura de serpiente problema que ha sido olvidado.

1.3. Objetivos

Determinar la composición bioquímica del veneno de *Lachesis muta* empleando estrategia proteómica combinada y la actividad catalítica de sus enzimas por ensayos espectrofotométricos.

1.3.1. Objetivos específicos

- Fraccionar las proteínas presentes en el veneno *L. muta* a través de enfoque bioquímico convencional usando cromatografía líquida y electroforesis.
- Analizar la actividad enzimática de las principales toxinas del veneno *Lachesis muta* mediante ensayos espectrofotométricos.
- Emplear el análisis proteómico con enfoque “bottom up” mediante digestión enzimática de las bandas de proteínas separadas en los geles de electroforesis y secuenciación de los iones tripticos utilizando espectrometría de masas en tándem (LC-ESI-MS) para la identificación precisa de las toxinas.

1.4. Hipótesis

El veneno de *Lachesis muta* se compone principalmente de proteasas y enzimas de remodelación de lípidos.

1.5. Alcance

Determinar la composición bioquímica del veneno de la serpiente *L. muta* y la abundancia relativa de sus toxinas. Asimismo, evaluar la actividad enzimática con el objetivo de aportar información de interés para posteriores estudios y para el desarrollo de antivenenos más específicos y eficaces. Dicho estudio podría ser de suma importancia para el Instituto Nacional de Salud Pública e Investigaciones (INSPI) en su proyecto enfocado en la construcción de una planta de producción de antivenenos [22].

CAPÍTULO 2

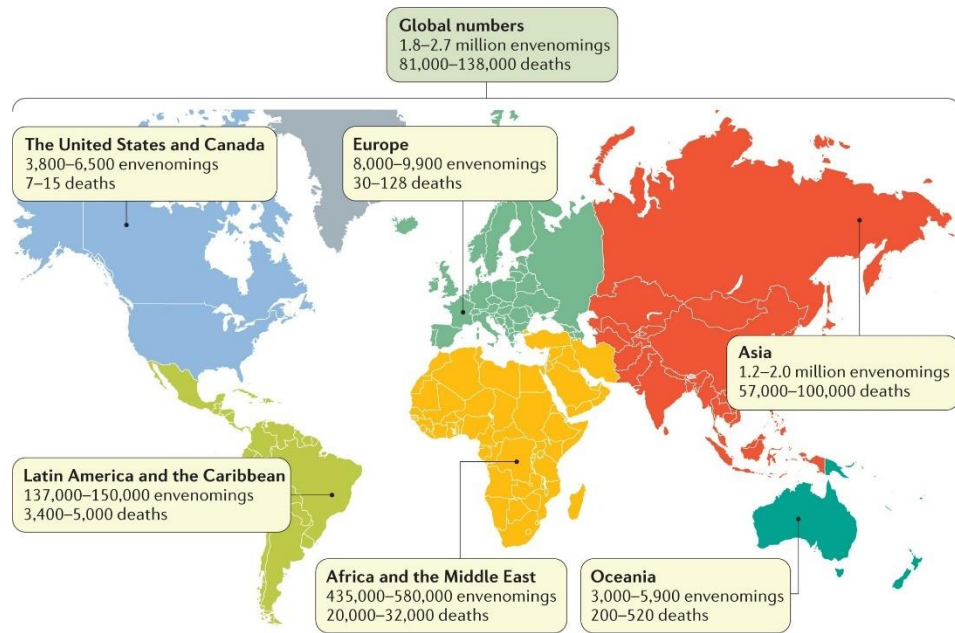
2. MARCO TEÓRICO

2.1. Envenenamiento ofídico a nivel mundial

El envenenamiento por mordedura de serpiente representa un desafío de salud pública importante a nivel mundial y particularmente en zonas tropicales, como Ecuador, el cual contiene un complejo y diverso ecosistema. Sin embargo, el poco conocimiento sobre su incidencia hace que se convierta en un problema desatendido por las autoridades debido a que ocurre mayoritariamente en zonas rurales socioeconómicamente vulnerables donde los centros de salud no cuentan con la infraestructura y recursos para recopilar datos estadísticos fiables. Adicionalmente, la mayoría de las víctimas ni siquiera llegan a centros de atención primaria hospitalaria y suelen asistir a curanderos tradicionales que aplican prácticas no validadas científicamente y que pueden agravar el cuadro clínico[6].

El estudio Global Burden of Disease de 2013, señala que el envenenamiento por mordedura de serpiente es más del doble de la estimación sugerida para las contribuciones agrupadas bajo 'contacto con animales venenosos', lo que recalca una falta de informes de mordeduras de serpientes en los registros oficiales[23].

Se estima que cada año se originan unos 5,4 millones de mordeduras de serpiente a nivel mundial, que causan entre 1,8 y 2,7 millones de casos de envenenamiento. La Figura 2.1 ilustra la distribución de estos eventos alrededor del globo. Entre 81.410 y 137.880 muertes, y 400.000 con discapacidades físicas o psicológicas permanentes, incluida la pérdida de las extremidades con alto impacto[24]. Esta condición no solo altera la vida de las personas afectadas, sino también la de sus familias y comunidades, ya que perjudica en mayor grado a gente económicamente activa cuya subsistencia y la de sus dependientes es predominante determinada por su estado de salud[25][23].



Nature Reviews | Disease Primers

Figura 2.1 Distribución geográfica del número estimado de envenenamientos y muertes por mordedura de serpiente[23].

2.2. Registro de mordeduras de serpientes en Ecuador

El envenenamiento es aún una enfermedad latente en zonas rurales ecuatorianas que coexisten en un ecosistema marcado por abundante número de especies de serpientes venenosas. En el país se registró aproximadamente 1438 mordeduras de serpientes durante el año 2020. La mayor incidencia ocurre en las provincias amazónicas (Oriente), con el 37% de los envenenamientos y una incidencia anual de 16 a 82 envenenamientos por 100.000 habitantes (Figura 2.2). La mayoría de las mordeduras de serpientes (51%) se produjeron en la región costera (provincias de la Costa) con una incidencia de 3 a 17 mordeduras por 100.000 habitantes. En las provincias de las tierras altas del centro del país (provincia de la Sierra), la incidencia fue de alrededor de 1 a 2 mordeduras por 100.000 habitantes[21][22].

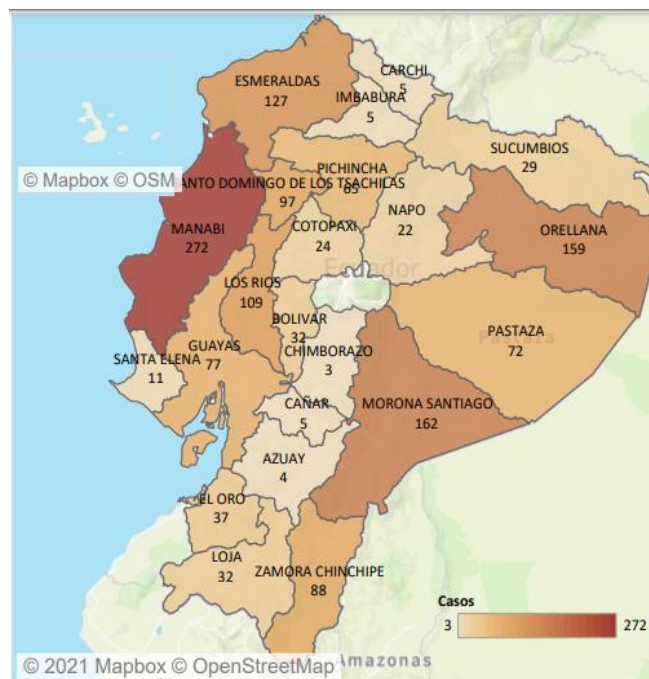


Figura 2.2 Casos de mordeduras de serpientes, por provincia en Ecuador, SE01-53, año 2020[26].

2.3. Biodiversidad y serpientes en Ecuador

Desde 1998, Ecuador forma parte de los 17 países “megadiversos”. Con sólo el 0,06% de la superficie terrestre mundial, alberga aproximadamente el 16% de las especies de aves del mundo, el 8% de anfibios, el 5% de reptiles y el 8% de mamíferos. La diversidad floral también es incomparable con más de 25.000 especies de plantas descritas científicamente y muchas más por descubrir y describir formalmente[28].

La exuberante biodiversidad del Ecuador se refleja en la variedad de especies de serpientes, dentro de las cuales se encuentran las familias Elapidae y Viperidae que son consideradas venenosas y altamente peligrosas para el ser humano[3]. A continuación, se describe algunas características y miembros de estas familias.

- La familia Elapidae comprende dos géneros y 19 especies distribuidas a diferentes altitudes, desde cero hasta los 2100 m sobre el nivel del mar: *Hydrophis platurus* y 18 especies de *Micrurus*. Los accidentes por mordedura de serpiente causados por la familia *Elapidae* son inusuales (menos del 1% del total de accidentes), siendo *Micrurus mipartitus decussates* y *Micrurus helleri* las especies más comunes responsables de estos casos[21].
- La familia Viperidae se distribuye en la Costa del Ecuador (8 especies) y la Amazonía (8 especies). Esta familia comprende cinco géneros distintos y 17 especies que se pueden encontrar en varias provincias a diferentes niveles altitudinales, que van desde el nivel del mar hasta aproximadamente los 3000 m sobre el nivel del mar. Por tanto, la mayoría de los accidentes por mordedura de serpiente en el Ecuador son causados por las especies *B. asper*, *B. atrox*, *B. bilineata* y *L. muta* [21].

2.4. *Lachesis muta*

L. muta, especie blanco de esta investigación, es conocida como la Bushmaster amazónica. Es una de las serpientes venenosas más grandes del mundo. En cuanto a longitud es la más grande de América y la segunda del mundo, después de la cobra real (*Ophiophagus hannah*). Los adultos de *L. muta* miden generalmente 2,5 m, pero se han reportado algunos individuos de hasta 4,5 m. En la Amazonía ecuatoriana, *L. muta* se diferencia de otras víboras por tener las siguientes características: cola que termina en una espina, quillas prominentes con forma de protuberancia en las escamas dorsales, que le dan a la serpiente una "textura de piña", y un patrón de color distintivo que consiste en triángulos invertidos de color negro intenso sobre un fondo claro. dorso café molido (Figura 2.3). Los recién nacidos (40 – 54,2 cm de longitud total) tienen un dorso anaranjado vibrante y una cola amarillenta[17].

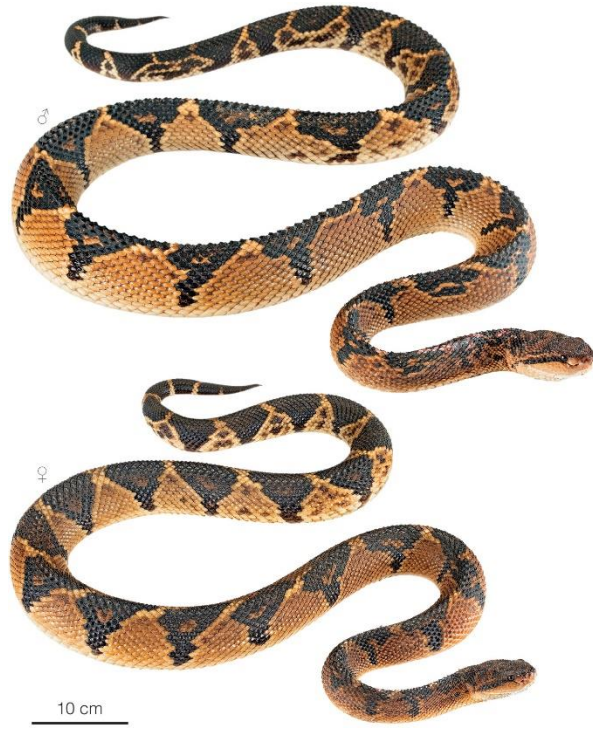


Figura 2.3 Individuos de *Lachesis muta* del Parque Nacional Llanganates, provincia de Pastaza, Ecuador[17].

2.5. Manifestaciones clínicas ocasionadas por el envenenamiento por mordeduras de serpientes

Los envenenamientos humanos ocasionados por taxones de *Lachesis* son poco frecuentes, pero bastante severos debido a la gran producción e inyección de veneno (200 – 411 mg). Estudios reportan los siguientes valores de dosis letal media (LD50) de veneno *L. muta*: 1,5 mg/kg (intravenoso), 1,6–6,2 mg/kg (intraperitoneal), 6,0 mg/kg (subcutáneo)[12].

La gravedad de estos envenenamientos se caracteriza por presentar síntomas como dolor local ardoroso palpitante agónico y edema (hinchazón) durante los primeros minutos después de la mordedura. La hemorragia leve alrededor del sitio de la picadura y la formación de ampollas locales son altamente frecuentes. Las manifestaciones sistémicas involucran hemorragia, coagulopatía y colapsos cardiovasculares, y lo que se ha denominado “síndrome de *Lachesis*”. Dicha condición consiste en una serie de alteraciones asociadas a una “sintomatología vagal, es decir, sudoración abundante, cólico abdominal, náuseas, vómitos recurrentes, diarrea acuosa, hipotensión diastólica y sistólica, y bradicardia sinusal (lento ritmo cardiaco), junto con trastornos sensoriales (marcha descoordinada, pérdidas de conciencia) y alteraciones hemodinámicas graves en muy poco tiempo (15-20 min). Estos signos y síntomas pueden considerarse patognomónicos de envenenamientos por serpientes del género[12].

2.6. Antivenenos

La administración parenteral de antivenenos basados en inmunoglobulinas heterólogas animales constituye el único tratamiento científicamente validado y efectivo para los envenenamientos por mordeduras de serpiente desde hace más de un siglo[28]. Históricamente, los pioneros Calmette, Vital Brazil y otros emplearon suero separado de la sangre de caballos hiperinmunizados para la preparación de los primeros productos biológicos útiles para esta finalidad (“seroterapia antiveneno”). Luego se demostró que los anticuerpos son las moléculas activas determinantes de la acción neutralizante del “suero antiveneno”. Posterior a esto, algunos laboratorios productores eligieron emplear inmunoglobulinas o fragmentos de inmunoglobulinas (F(ab')₂, Fab), purificados a partir de suero en lugar de suero crudo[9].

En líneas generales, los antivenenos se clasifican de acuerdo con su producción y efectividad, en monovalentes o monoespecíficos y polivalentes o poliespecíficos. El primero corresponde a aquellos producidos con el veneno de una determinada serpiente, mientras los polivalentes son producidos con los venenos de varias serpientes[30]. La generación de un antiveneno clínicamente efectivo para el tratamiento de accidentes ofídicos es favorecido por disponibilidad de información de estudios proteómicos, toxicológicos e inmunológicos considerando la variabilidad ontogenética, geográfica e individual intraespecífica en la composición del veneno [31].

2.7. Venenos y su composición

El veneno es la suma de una combinación natural de moléculas bioactivas que cuando, incorporadas a un ser vivo, puede producir significativas alteraciones en sistemas importantes del cuerpo humano, que comprometen la vida[32]. En otras palabras, el veneno es una secreción altamente compleja formada por compuestos bioquímicos, sintetizados en unas glándulas especializadas e inyectado mediante un aparato inoculador, que

modula, activa y/o inhibe procesos fisiológicos, celulares o bioquímicos normales de la presa. Estudios sugieren que este cóctel molecular, es de naturaleza aminoacídica, alrededor de un 90%, está compuesto por unas pocas familias de proteínas y péptidos, mientras que el 10% restante son sustancias orgánicas e inorgánicas, como sal, azúcares, poliaminas, metabolitos y neurotransmisores[33][32].

Dentro de los componentes tóxicos presentes en los venenos de serpientes se encuentran: 3FTx, toxina de tres dedos; CRISP, proteína secretora rica en cisteína; CTL, proteína tipo lectina tipo C; DTx, dendrotoxina; LAOO, L-aminoácido oxidasa; Myo, miotoxina de bajo peso molecular; PLA₂, fosfolipasa A₂; SVMP, metaloproteínasa de veneno de serpiente; SVSP, serina proteinasa de veneno de serpiente. En la figura 2.4 se resume la abundancia relativa de las principales familias de toxinas estudiadas en las secreciones de las serpientes Vipéridas y Elapídas[23].

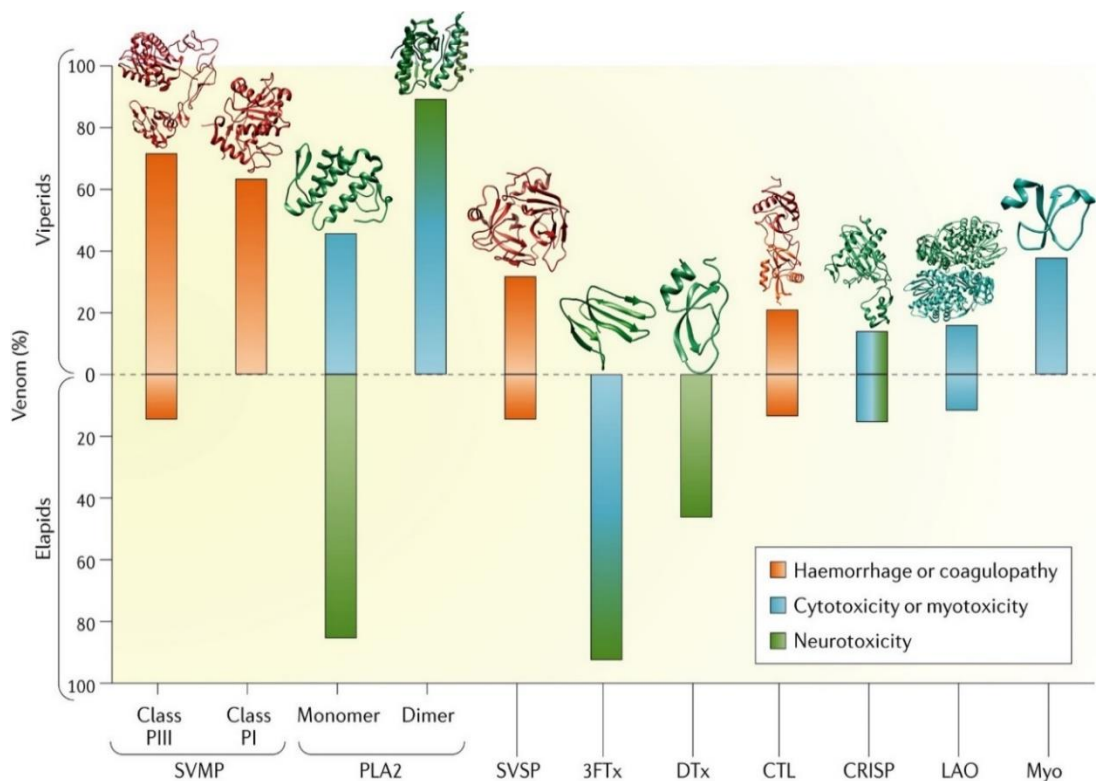


Figura 2.4 Niveles de toxinas en el veneno de vipéridos y elápidos[23].

El gráfico de la figura 2.4 muestra los rangos de niveles de expresión de dichas biomoléculas en los venomas analizados. Estos valores fueron calculados como porcentaje del proteoma total del veneno. Las barras están codificadas por colores que se asocian con las actividades toxicológicas más relevantes de la familia de proteínas correspondiente.

Los gradientes de color ilustran la dependencia de la concentración del efecto biológico (mismo color) o efectos diferentes (múltiples colores). Las toxinas presentan actividades distintas en diferentes dosis. Adicionalmente, la figura ejemplifica la estructura tridimensional de estas biomoléculas, tomando en cuenta resultados cristalográficos o de resonancia magnética nuclear de un representante de cada grupo[23]. En resumen, una variedad composicional, estructural y toxicológico resaltan la intrínseca complejidad de los venenos de serpientes.

2.8. Descripción de los componentes tóxicos del veneno

A continuación, una breve descripción estructural, bioquímica y funcional de las toxinas más estudiadas y comunes presentes en los venenos de serpientes:

2.8.1. Toxinas de tres dedos (3FTX)

Las toxinas de tres dedos (3FTX) son toxinas sin actividad enzimática formadas por la combinación de aproximadamente setenta residuos de aminoácidos; son abundantes en venenos de corales [34]. Ellas exhiben una estructura terciaria conservada que se establece por tres bucles que contienen hebras beta (bucles designados I, II y III) que se proyectan desde un pequeño núcleo hidrofóbico caracterizado por la presencia de cuatro enlaces disulfuro (Figura 2.5). Debido a la alta similitud con una mano, ellas fueron bautizadas con este nombre que ilustra bien su conformación [35].

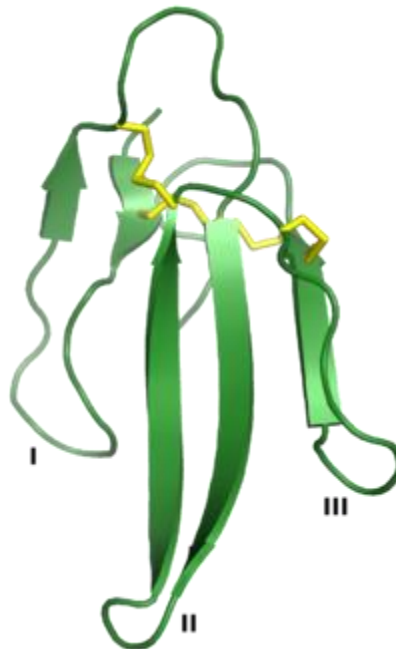


Figura 2.5 Ejemplo de la estructura tridimensional de una 3FTx. Erabutoxina A, es una toxina con acción en el sistema nervioso que es miembro de la superfamilia 3FTx. Los tres "dedos" pueden ser visualizados como I, II y III. Adicionalmente, los cuatro enlaces

disulfuro conservados se muestran en amarillo. Renderizado de PDB : 1QKD[36].

La evolución molecular de este conjunto de toxinas ha generado proteínas con múltiples acciones expresadas en una diversidad de mecanismos y actividades biológicas, en el que se caracteriza la neurotoxicidad. Dentro de esta familia se encuentran α -neurotoxinas, κ -neurotoxinas, fasciculinas, toxinas muscarínicas y cardiotoxinas o citotoxinas, entre otros[37].

2.8.2. Proteína secretora rica en cisteína (CRISP)

Este tipo de biomoléculas son polipéptidos compuestos por una cadena de 20–30 kDa. Las CRISP tienen un alto grado de similitud de la composición aminoacídica. Su estructura contiene 16 residuos de cisteína conservados que establecen 8 enlaces disulfuro (Figura 2.6), 10 de estos residuos forman el dominio rico en cisteína (CRD) en el extremo C-terminal[38].

Estudios recientes han revelado que las CRISP son ampliamente expresadas en los venenos de serpiente. Aunque pobremente exploradas desde el punto de vista funcional y dinámico, algunas investigaciones han sugerido que estas toxinas pueden actuar como bloqueadores de los canales iónicos[38].

```

Bj-CRP          -----SGPPCGDCPSACDNGLCINPCTK-----
ChCRPIa        GNIIGKTATPYKSGPPCGDCPSACDNGLCINPCTKEDKYSNCKSLVQQAG
Og-CRPa        GNIIGKTATPYTSGPPCGDCPSACDNGLCINPCTEENMFTNCDSMVQKRS
Bs-CRP         GNIIGKTATPYTSGPPCGDCPSACDNGLCINPCTEENMFTNCDSMIQKRS
Dr-CRPF        GNIIGKIATPYTSGPPCGDCPSACDNGLCINPCHHDEFTNCKDLVKQG-
Dr-CRPF        GNIVGRTATPYKSGQPCGDCPSACDNGLCINPCRREDVFTNCIDMAKGRS
                ** *****

```

Figura 2.6 Alineación múltiple de la secuencia parcial de aminoácidos de Bj-CRP con otros CRISP de veneno de serpiente . Los residuos de cisteína relacionados con los enlaces disulfuro se destacan en amarillo[38].

2.8.3. Lectinas tipo C y proteínas tipo-lectinas

Las lectinas son proteínas que tienen la capacidad de reconocer y unirse a carbohidratos y que fueron descubiertas por primera vez en estudios con materiales vegetales. Las lectinas encontradas en venenos de serpientes pertenecen a la Superfamilia de lectinas tipo C y se ubican en dos grandes grupos: las lectinas tipo C verdaderas y las proteínas similares a lectinas tipo C[39].

Las lectinas tipo C verdaderas reciben esta denominación debido a la habilidad de unirse a carbohidratos en presencia del ion divalente calcio; mientras que las proteínas similares a lectinas tipo C poseen un CRD (región de reconocimiento de carbohidrato) pero carecen de esta unión a los carbohidratos[39].

Las lectinas tipo C verdaderas son homodiméricas con una masa molecular de aproximadamente 30 kDa que se enlazan a carbohidratos mediante interacciones electrostáticas dependientes de calcio. Estas proteínas poseen CRD constituida por 115-130 aminoácidos dentro de los cuales 32 son invariables, sobresaliendo las posiciones donde se encuentra cisteína. En conjunto estos aminoácidos posibilitan la generación de puentes disulfuro con la consiguiente estabilización de la estructura 3D[40].

Las proteínas tipo lectina y lectinas tipo C presentan actividades biológicas de relevancia tales como la inducción/inhibición de la agregación plaquetaria, la inducción de la aglutinación plaquetaria y la inhibición de la coagulación a los factores de coagulación[37].

2.8.4. L-aminoácido oxidasas (LAAO)

Las LAAO de venenos de serpientes son una de las enzimas del veneno menos estudiadas. A pesar del creciente interés en los últimos

años debido a sus propiedades citotóxicas que son útiles para el desarrollo de terapias anticáncer. Estas enzimas participan de la catálisis oxidativa estereoespecífica de un L-aminoácido a su correspondiente α -cetoácido con liberación de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y amoníaco (NH_3)[41]. En relación con el espectro de actividades patológicas y fisiológicas, incluye la inducción de apoptosis, edema, agregación/inhibición de plaquetas, actividades hemorrágicas y anticoagulantes. Por otro lado, también muestran actividad antibacteriana, antiviral y leishmanicida y se han utilizado como modelos estructurales para el diseño de agentes terapéuticos en algunas enfermedades como el cáncer y los medicamentos contra el VIH.

Las LAAO son macromoléculas con carbohidratos con una masa molecular variable, entre 120 y 150 kDa en forma nativa (dimérica) y entre 55 y 66 kDa en forma desnaturalizada (forma monomérica)[37]. Algunos estudios estructurales también han demostrado su naturaleza tetramérica. Estas glicoproteínas (Figura 2.8) fueron encontradas como dímero en solución y son funcionales en este estado[41].

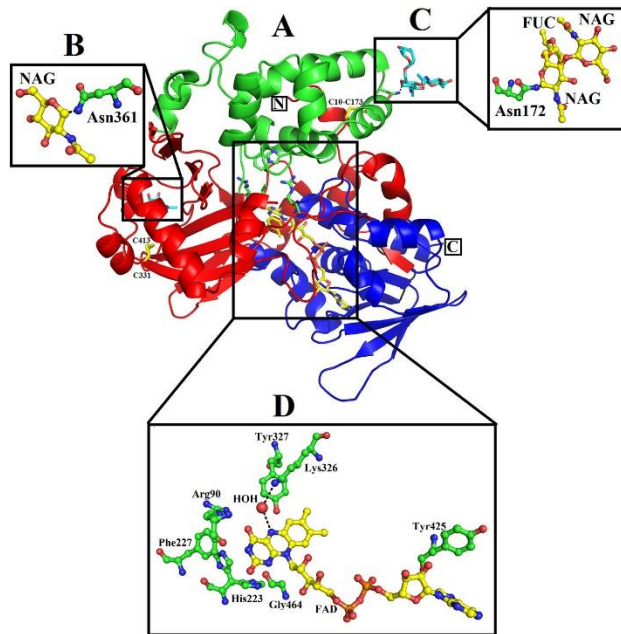


Figura 2.7 Estructura general de LAAO (PDB ID: 1F8R; *Calloselasma rhodostoma* LAAO) (A) representación del sitio activo, la unión a FAD y los residuos de aminoácidos de glicosilación se muestran como barras verdes. Los puentes disulfuro están representados por barras amarillas. (B-D), residuos involucrados en la glicosilación y la unión a FAD resaltados. Las partes de la estructura secundaria que pertenecen a los dominios de unión a FAD, unión a sustrato y helicoidal están coloreadas en azul, rojo y verde, respectivamente[41].

2.8.5. Fosfolipasas A₂ (PLA₂)

Las fosfolipasas A₂ son proteínas membranolíticas pequeñas con una masa molecular entre 13–15 kDa[42]. Ellas catalizan la hidrólisis de los fosfolípidos membranales en las posiciones para producir lisofosfolípidos y ácidos grasos libres. El catión Ca²⁺ es fundamental para sus acciones catalíticas[42]. Las PLA₂ pueden presentar neurotoxicidad presináptica o postsináptica, miotoxicidad sistemática o local, cardiotoxicidad, inhibición de la agregación plaquetaria, actividades anticoagulantes e inductoras de edema[43].

Las PLA₂ del veneno de Elapidae existe como una enzima monomérica y posee neurotoxicidad, mientras que las PLA₂ del veneno de Viperidae puede existir tanto en forma de monómero como de dímero. Las PLA₂ monomérica de Viperidae exhibe efectos citotóxicos, mientras que las PLA₂ dimérica posee efectos citotóxicos a una dosis más baja y neurotoxicidad a una dosis más alta[42].

Las PLA₂ han sido divididas a su vez en fosfolipasas D49 y fosfolipasas K-49. Las D-49 tienen Asp (ácido aspártico) en el residuo 49 y conservan su capacidad hidrolítica. En cambio las K49 poseen Lys (lisina), en la misma posición, y no tienen actividad enzimática[44].

2.8.6. Metaloproteinasas de veneno de serpiente (SVMPs)

Las SVMP son enzimas dependientes de Zn²⁺ presentes en los venenos de serpientes de las familias Viperidae y Elapidae. Generalmente, las SVMP constituyen del 30 al 60% del contenido total de proteínas en los venenos de vipéridos[37]. De acuerdo con la composición de su dominio, las SVMP se clasifican en tres grupos:

- SVMP P-I, que tienen masas moleculares de 20-30 kDa, y están compuestas por un solo dominio catalítico de metaloproteinasa de unión a Zn^{2+} (dominio catalítico)[45].
- SVMP P-II, con masas moleculares de 30-60 kDa y que tienen un dominio de desintegrina además del dominio catalítico[45].
- SVMP P-III, de masas moleculares de 50-70 kDa y compuestas por dominios catalíticos de metaloproteinasa, tipo desintegrina y ricos en cisteína. Algunas SVMP P-III presentan una estructura cuaternaria, en la que una subunidad que comprende una estructura típica de SVMP P-III está unida, a través de un enlace disulfuro, a una subunidad más pequeña similar a una lectina de tipo C[45].

Las SVMP desempeñan varias funciones en la fisiopatología del envenenamiento, debido a que compromete la arquitectura de los tejidos por su acción proteásica. El efecto más destacado causado por SVMP es la hemorragia, un efecto asociado con un daño tisular local prominente y con sangrado sistémico que puede conducir a un shock cardiovascular. Su mecanismo se basa en la acción sobre la membrana basal que rodea los vasos capilares; también participan en la degradación de la matriz extracelular y promueven una reacción inflamatoria[37][46].

2.8.7. Serina proteinasa de veneno de serpiente (SVSP)

Las SVSP tienen masas moleculares de 25-70 kDa y se caracterizan por una tríada catalítica conservada (Ser, His y Asp) y por la presencia de abundantes enlaces disulfuro. La mayoría de las serinas proteinasas de veneno muestran un grado variable de glicosilación, una característica estructural que influye en la inmunogenicidad. Las SVSP constituyen entre el 10 y el 30 % del contenido de proteínas en todo el veneno de las especies de vipéridos[37]. Las SVSP son

enzimas complejas y multifuncionales que actúan principalmente sobre la hemostasia[47].

Las SVSP que afectan la hemostasia expresan actividad similar a la de la tripsina, hidrolizando el sustrato BApNA (N α -benzoil- L -arginina 4-nitroanilida). No son inhibidos por los inhibidores endógenos de la serina proteinasa (serpinas) en presencia de heparina. En consecuencia, los SVSP se pueden utilizar en tratamientos médicos y en el diagnóstico de irregularidades en la coagulación de la sangre[48].

2.8.8. Técnicas Ómicas

La investigación en Toxinología es un área multidisciplinaria y fascinante. El desarrollo de las técnicas ómicas, en los últimos años, ha favorecido la comprensión de la composición de los venenos de las serpientes y sus implicaciones. El progresivo desarrollo de técnicas analíticas rápidas y sensibles para la separación de proteínas y su análisis; han aportado significativamente al incremento del número de venomas catalogados, y a la aplicación de toxinas individuales[49]. Alineados al estudio proteómico varias estrategias y herramientas han emergido para fortalecer y generar informaciones valiosas de los venenos. La combinación de técnicas releva cada vez más detalles e informaciones valiosas para responder preguntas aún pendientes en esta área. A continuación, se explica los principales términos y la aplicabilidad de las diferentes técnicas.

- La Venómica inicialmente se centró en la identificación cualitativa de los componentes del veneno. Sin embargo, actualmente la introducción de novedosas estrategias permite identificar no solo las familias de proteínas sino también estimar la abundancia relativa de cada componente. Este avance se dio gracias a la combinación de técnicas de separación RP-HPLC y electroforesis

SDS PAGE unidimensional y densitometría en gel., Las bandas de proteínas resultantes se pueden escindir y digerir en gel, para finalmente ser analizadas por cromatografía líquida acoplada espectrometría de masas (LC-ESI-MS/MS)[50].

- La antivenómica es relativamente más joven que la venómica, y en combinación posibilita la evaluación del reconocimiento de los componentes del veneno por parte de los anticuerpos presentes en un antiveneno determinado. Este tipo de análisis revela que toxinas se unen a los componentes del antiveneno, proporcionando información valiosa sobre la inmunogenicidad relativa. Los análisis antivenómicos se limitan al inmunoreconocimiento de las proteínas del veneno. Por lo tanto, esto no siempre se traduce, en la neutralización de la toxicidad. Así siendo, el uso de ensayos de neutralización permanece adecuado y recomendado por la Organización Mundial de la Salud[8].
- La toxicovenómica trabaja en el análisis de actividades tóxicas de las fracciones de veneno proporcionadas por las etapas del enfoque venómico. Estudios actuales combinan cada vez más la caracterización proteómica de los venenos con ensayos de actividad toxicológicas de componentes particulares, con la finalidad de generar perspectivas médicas y biológicas. Otro enfoque consiste en el análisis del sinergismo, toxinas individualmente o en conjunto pueden modular diferentemente los efectos biológicos. La combinación de estas estrategias amplía la visión de las mezclas de proteínas y péptidos que producen las serpientes venenosas responsables de miles de muertes y discapacidades permanentes cada año, sus aspectos toxicológicos e inmunológicos[8].

CAPÍTULO 3

3. METODOLOGÍA

El presente trabajo de investigación tiene por objeto, la caracterización proteómica y enzimática del veneno de *Lachesis muta*, mediante análisis químicos espectroscópicos, cromatográficos y espectrométricos. Para su desarrollo, se utilizó investigación del tipo cualitativa y cuantitativa.

A través del uso de ensayos químicos se logró identificar y cuantificar de forma relativa las toxinas presentes en el veneno de *L. muta*. Consecuentemente, se correlacionó el tipo de toxinas identificadas con su actividad enzimática. Finalmente se comparan las proteínas encontradas en el individuo con las reportadas por estudios previos del mismo tipo de ejemplar nivel de América del sur y América central, donde se hizo uso de similares parámetros metodológicos.

3.1. Población y muestra

La muestra de veneno de *L. muta* se obtuvo de una serpiente joven de la Amazonía ecuatoriana, específicamente, en la reserva Sumak Kawsay in Situ (posición geográfica de 01°24,07', sur 078°04,00, Oeste), como parte del Corredor Ecológico Llanganates Sangay, Cantón Mera, provincia de Pastaza (Figura 3.1 punto 1). La colecta se realizó bajo los permisos de investigación MAE-DNB-CM-2015-0017 y MAE-DNB-CM-2019-0115. En líneas generales, la muestra de veneno se obtuvo restringiendo a la serpiente con el uso de un tubo telescópico de plástico transparente y luego se indujo a morder la parte superior de un vaso de precipitado de vidrio cubierto con Parafilm®[50]. La secreción luego de la extracción se pipeteó inmediatamente en un tubo de 1,5 ml, refrigeró a 4 °C, liofilizó y congeló a – 20 °C hasta su uso.



Figura 3.1 Sitio de muestreo (1) del individuo *L. muta* para recolección de muestra de veneno[51].

3.2. Equipos, materiales y reactivos

3.2.1. Equipos

- Balanza analítica, marca Ohaus, modelo AX224/E.
- Estufa marca Esco modelo OFA-54-8.
- Vortex, marca Biobase, modelo MX-S.
- Ultrasonido, marca Branson, modelo CPX5800H.
- Centrífuga refrigerada, marca Thermo Scientific, modelo Sorvall ST40R.
- Termobloque, marca Thermo Scientific, modelo dry Bath Stdrd 1 Block.
- Centrífuga o concentrador a vacío, marca Genevac, Modelo Mi Vac Duo.
- Espectrofotómetro para microplacas, marca Promega, modelo GLOMAX DISCOVER SYSTEM.
- Cámara para electroforesis BIO-RAD Mini-PROTEAN Tetra.
- Cromatógrafo líquido (HPLC) marca Waters equipado con un sistema de bomba binario (Waters 1525), automuestreador (Waters 2707) y detector UV-Visible (Waters 2489).
- Cromatógrafo líquido de ultra alta eficiencia (UPLC), marca Waters modelo Acquity I-Class, acoplado a un espectrómetro de masas marca Waters modelo Xevo G2 QTOF con fuente Lockspray. (LC-ESI-MS)

3.2.2. Materiales y reactivos

- Columna Simmetry C18 5 μ m 250*4.6mm.
- Columna Acquity UPLC CSH™ C18 5 μ m 3.0*50mm
- Agua tipo 1.
- Acetonitrilo (ACN), pureza \geq 99.9% grado HPLC.
- Acetonitrilo (ACN), pureza \geq 99.9% hipergrado o calidad LC/MS.
- Metanol, pureza \geq 99.9% grado HPLC

- Ácido trifluoroacético (TFA), pureza >99% para HPLC.
- Ácido fórmico (AF), grado de reactivo, pureza ≥95%.
- Ácido acético, grado ACS, pureza 98 - 100%.
- Hidróxido de sodio, pellets, pureza ≥95%.
- Bicarbonato de amonio (AMBIC), pureza >99,5% (T).
- Tris HCl, Grado Biología molecular.
- Tris Base, Grado Biología molecular.
- Cloruro de calcio anhidro (CaCl₂), pureza ≥93%.
- Cloruro de sodio (NaCl), pureza ≥98% para biología molecular, en polvo.
- Acrilamida, adecuada para electroforesis, pureza ≥99% (HPLC).
- N,N'-metilenbisacrilamida (bis-acrilamida), pureza 99%.
- Sodio dodecil sulfato (SDS), Grado: Para biología molecular. Pureza: >98.5% (GC). Adecuado para electroforesis.
- Persulfato de amonio (PSA), grado biología molecular, adecuado para electroforesis, pureza ≥98.
- N,N,N',N'-Tetrametil etilendiamina (TEMED), BioReagent, adecuada para electroforesis, pureza ~ 99%.
- Azul de bromofenol grado reactivo ACS, en polvo, para tinción de DNA y proteínas en geles de agarosa y poliacrilamida.
- Ditiotreitól (DTT), para electroforesis, pureza >99%.
- Escalera de peso molecular para proteínas de rango amplio para proteínas, Broad Range Protein Molecular Weight Markers.
- Glicina grado reactivo ACS, en polvo, para tinción de DNA y proteínas en geles de agarosa y poliacrilamida.
- Azul brillante de Coomassie (Blue R-250; Sigma Aldrich).
- Iodoacetamida (IAA), pureza ≥99%.
- Tripsina corte enzimático de páncreas bovino tratado con TPCK.
- Ácido tricloroacético, reactivo ACS, pureza ≥99,0 %
- Azocaseína, sustrato de proteasa.
- Ácido benzoico 4-nitro-3 (octanoiloxi), sustrato sintético.

- Clorhidrato de N α -benzoil-L-arginina 4-nitroanilida (L-BapNa), pureza $\geq 99\%$ (TLC), adecuada para sustrato para tripsina.
- Dimetilsulfóxido (DMSO), para biología molecular.
- L-metionina, grado reactivo, pureza $\geq 98\%$ (HPLC).
- Peroxidasa, horseradish.

3.3. Caracterización bioquímica

3.3.1. Perfil cromatográfico

El veneno fue fraccionado a fin de obtener fracciones de toxinas para el estudio de composición bioquímica. Inicialmente, se disolvió aproximadamente 300 μg de veneno liofilizado en 200 μL de solución 5% de ACN en 0,05% de TFA. La muestra disuelta se homogenizó mediante agitación con vortex. Luego, se centrifugó a 13000g por 10 min para separar las sales formadas. Se tomaron 190 μL del sobrenadante para ser inyectados en el equipo de cromatografía líquida de alta eficiencia en fase reversa (RP-HPLC).

Para la separación, se utilizó una columna Simmetry C18 y un cromatógrafo líquido HPLC. El equipo operó a un flujo de 1 mL/min bajo un gradiente lineal de TFA 0,1% en agua (Solución A) y ACN con 0,1% de TFA (Solución B), isocráticamente (5% B) durante 5 min, seguido de 5-25% durante 10 min, 25–45% durante 60 min, 45–70% durante 10 min, e isocráticamente 70% por 5 min, el tiempo de corrida fue de 100 min[8]. La detección de proteínas se realizó a 215 nm. Las fracciones se colectaron de forma manual. Finalmente, las fracciones colectadas fueron concentradas a sequedad haciendo uso de la centrífuga a vacío a 35°C durante 24 horas. La cuantificación de la abundancia relativa de los picos cromatográficos se realizó haciendo uso del software Empower III. La Figura 3.2 ilustra y resume cada etapa del fraccionamiento y obtención de fracciones.

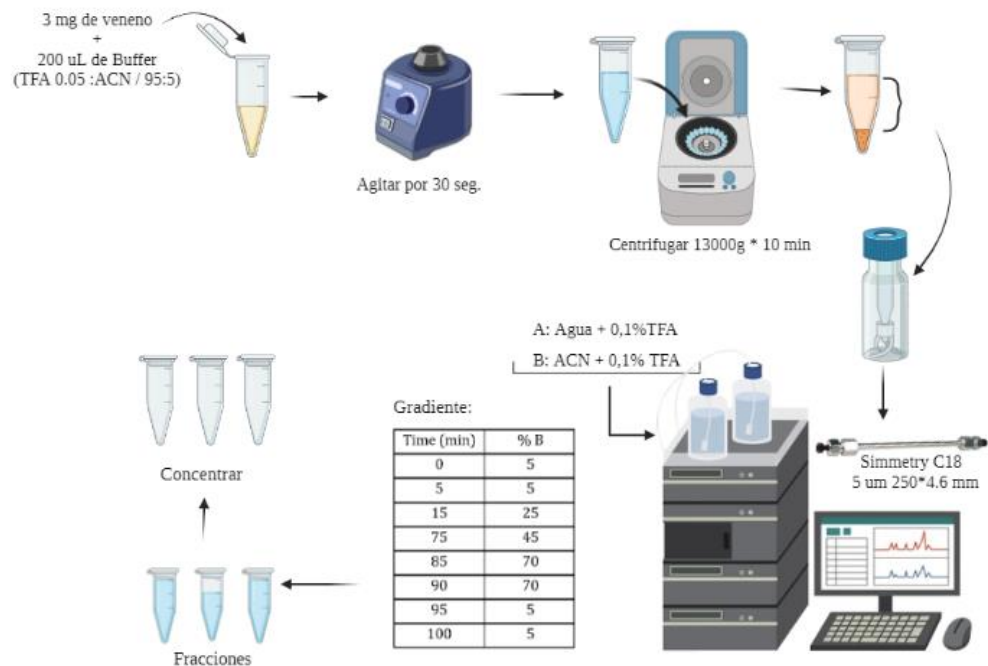


Figura 3.2 Esquema ilustrativo de las etapas relacionadas a la preparación de muestra y fraccionamiento de proteínas del veneno de *L. muta* mediante RP-HPLC.

3.3.2. Electroforesis SDS-PAGE

La separación de proteínas presentes en el veneno total como en las fracciones obtenidas a través del perfil cromatográfico se realizó a través del método de electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE)[52]. Se disolvió cada fracción concentrada a sequedad en 45 µL de buffer de carga (0,8 M Tris-HCl, pH 6,8; 10% (v:v) glicerol; 2% (m:v) SDS; 0,02% (m:v) azul bromofenol). Las muestras fueron separadas en condiciones reductoras añadiéndoles 5 µL de DTT 1 M, seguidamente se homogeneizaron con agitación vortex, se calentaron a 90 °C por 5 min y finalmente se tomaron 20 µL de la muestra tratada para el análisis.

La electroforesis se realizó en una cámara vertical (Ver figura 3.3), a 120 V con buffer de corrida 1 X (0,025 M Tris-HCL, pH 8,3; 0,192 M

glicina; 0,1% (m/v) SDS). Se utilizó un gel de apilamiento con concentración de 5,51 % (bis-acrilamida (30:0,8) % (m:v); 0,067 M Tris-HCl, pH 6,8; 0,1 % (m:v) SDS; 0,089% (m:v) PSA; 0.17 (v:v) TEMED) y un gel de corrida con concentración 12,64 % (bis-acrilamida (30:0,8) % (m:v); 0,55 M Tris-HCl, pH 6,8; 0,1 % (m:v) SDS; 0,05% (m:v) PSA; 0,1 (v:v) TEMED). Para la identificación de la masa molecular de las proteínas del veneno, se utilizó 5 μ L de marcador molecular. Para visualizar las bandas, el gel se tiñó con una solución colorante de azul brillante de Coomassie durante 24 horas con agitación continua y se destiñó con una solución decolorante de proporción 40:10:50 metanol, ácido acético y agua.

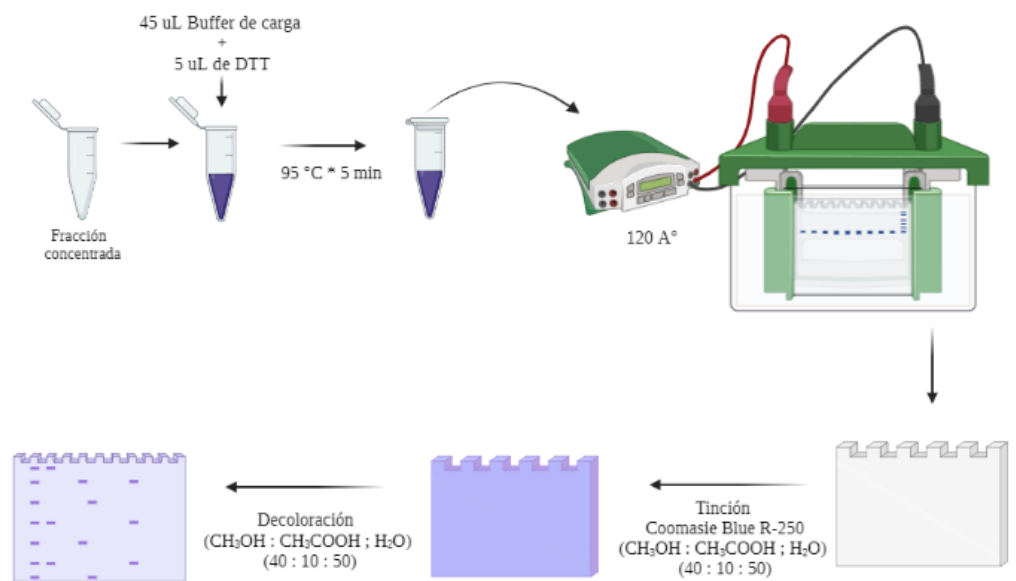


Figura 3.3 Representación de la Identificación de proteínas mediante electroforesis SDS-PAGE en condiciones reductoras.

3.3.3. Digestión

3.3.3.1. Digestión de bandas

Las bandas obtenidas por electroforesis fueron recortadas y sometidas a un proceso de digestión proteolítica [53].

Inicialmente se realizó la extracción del azul de coomassie; para esto se agregó 50 μ L de solución (AMBIC 100 mM: acetonitrilo (ACN) (1:1)) por una hora a temperatura ambiente (TA). Se descartó la solución y se reemplazó por 50 μ L de solución AMBIC 100 mM; se guardó a 4 °C hasta el momento de la digestión.

Se descartó el AMBIC donde se encontraban las bandas de electroforesis y se agregó 50 μ L de ACN por 15 min a TA. Luego, se descartó el ACN y se repitió el paso anterior. Por consiguiente, las bandas fueron secadas en la centrifuga a vacío 45°C, 15 min. Para realizar la reducción de las proteínas, se rehidrató las bandas con 50 μ L de una solución 1,54 mg/mL de DTT e incubó 30 min a 56 °C. A continuación, se descartó el DTT y se agregó 50 μ L de ACN, 5 min a TA. Luego, se descartó el ACN y se repitió el paso anterior. Enseguida se secó en la centrifuga a vacío 45°C por 15 min.

Para el proceso de alquilación de las proteínas, se rehidrató las bandas con 50 μ L de una solución 10,2 mg/mL de IAA y se colocó en la oscuridad 20 min. Se descartó la IAA y se agregó 50 μ L de AMBIC 100 mM; se lavó brevemente y se descartó el AMBIC sin incubar. Seguidamente, se agregó 50 μ L de AMBIC 100 mM, 15 min a TA y se descartó el AMBIC, agregando 50 μ L de ACN, 15 min a TA. Se descartó el ACN y se secó en centrifuga a vacío 45°C por 15 min. Para la digestión de las proteínas, se rehidrató las bandas con una solución 13,33 μ g/mL de tripsina a 4 °C, 15 min; después se agregó 10 μ L de AMBIC 100 mM y se incubó por la noche a 37 °C.

Las bandas en solución con tripsina se centrifugaron a 12000 rpm, 15 seg. Se recolectó cada sobrenadante en tubos de 1,5 mL. Al tubo con las bandas, se le adicionó 30 μ L de 60 % ACN con 1% AF, y se colocó en el sonicador por 10 min a 37 °C,

centrifugándose a 12000 rpm, 15 seg. Se recolectó el sobrenadante y se unió con el anterior. Se concentró casi a sequedad en la centrífuga a vacío 45 °C por 30 min.

Finalmente, se resuspendió el digerido casi seco en 0,1% (AF) y se transfirió a un vial de cromatografía (Ver figura 3.4). Se mantuvo a temperaturas de 4-8 °C hasta su inyección en el sistema LC-ESI-QTOF. Todas las soluciones usadas se prepararon al instante.

3.3.3.2. Digestión en solución

Las fracciones colectadas directamente del RP-HPLC en las que no se visualizó bandas en el SDS-PAGE, se resuspendieron en 10 µL de 0,1 % AF. Enseguida se le añadió, AMBIC 1 M hasta completar 20 µl, se agregó 6 µl de DTT 100 mM y se incubó a 56°C, 30 minutos. Luego, se sometió a alquilación con 3 µl de IAA por 20 minutos en la oscuridad. Se añadió 3 µl de DTT 100 mM y se dejó reposar por 20 minutos a TA. La digestión se realizó colocando 3 µl de una solución de 0,1mg/mL de tripsina durante la noche a 37°C. A continuación, se agregó 0,2 µL AF concentrado.

Posteriormente, se evaporaron todos los solventes en la centrífuga a vacío 45°C casi a sequedad; posteriormente se transfirió 25 µL al vial de cromatografía y se mezcló con 100 µL de 0,1% AF (Ver figura 3.4). Se mantuvo a temperaturas de 4-8 °C hasta su inyección en el sistema LC-ESI-QTOF. De manera similar a digestión de bandas, todas las soluciones fueron preparadas durante el procedimiento experimental [54].

3.3.4. Espectrometría de masas

Para la adquisición de datos MS1 y MS2 se utilizó el equipo LC-ESI-TOF. Las muestras de péptidos digeridos se inyectaron a una columna Acquity C18. La velocidad de flujo fue de 0,3 mL/min y se utilizó como fase móvil 0,1% AF (solución A) y ACN con 0.1% AF (solución B). El gradiente de elución lineal fue establecido isocráticamente en 1% B durante 1 min, 1-70% B durante 29 min. Finalmente, se mantuvo isocráticamente en 70% B por 2 min; 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, 40 v; temperatura de la fuente 120°C; temperatura de desolvatación, 450 °C; flujo de gas cono, 30 L/h; y flujo de gas de desolvatación 900 L/h.

Los datos MS fueron adquiridos usando método de adquisición dependiente de datos (DDA) en modo positivo y resolución 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 fueron seleccionados automáticamente para fragmentación (MS2) mediante disociación por colisión inducida de los iones más intensos.

Los espectros se interpretaron manualmente o usando una versión con licencia del programa MASCOT DESTILLER 2.7 [55], contra una base de datos privada que contiene 7668 secuencias de proteínas de vipéridos depositadas en la base de datos Swiss-Prot/TrEMBL[56] (Publicación de la base de datos 30 de junio de 2022; 945 secuencias revisadas (Swiss-Prot) y 6723 sin revisar (TrEMBL)). La tolerancia de masa se fijó en 0,15 Da. La carbamidoximetil cisteína y la oxidación de la metionina fueron modificaciones fijas y variables, respectivamente.

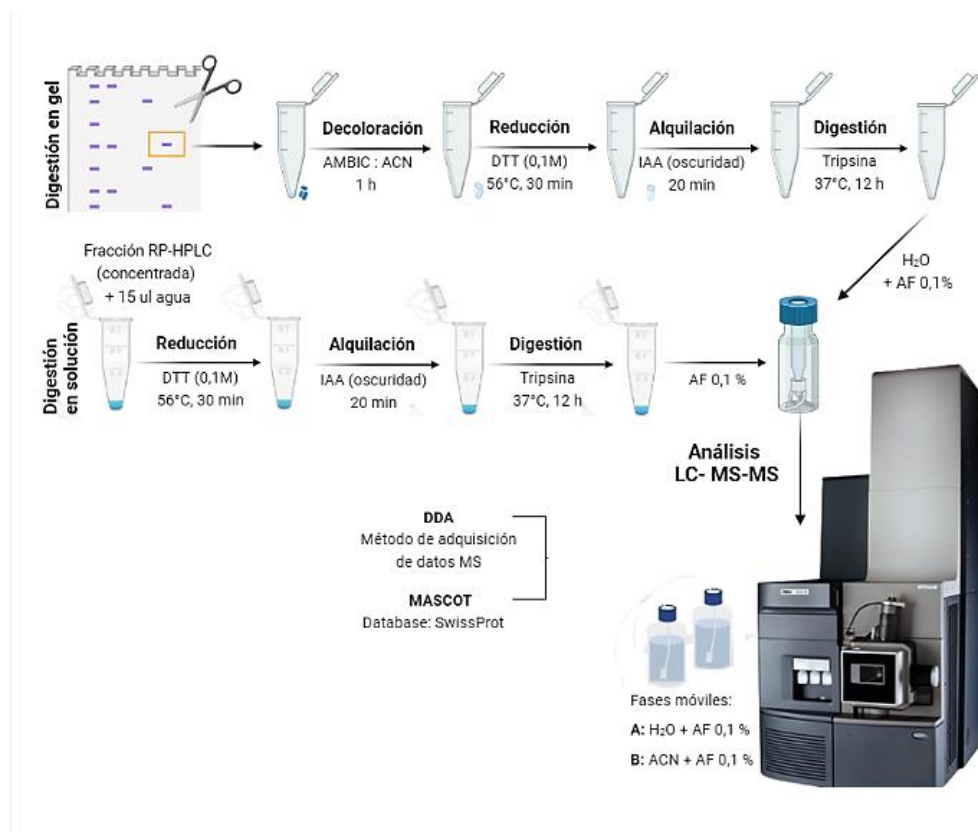


Figura 3.4 Etapas usadas para la digestión de gel y digestión en solución y análisis de péptidos tripticos.

3.3.5. Masa intacta

Para el análisis de masas intactas o totales de las proteínas presentes en las fracciones RP-HPLC. Se tomaron las fracciones libres de solventes y se disolvieron a 150 µL de AF 0,1% [57]. Se inyectaron 10 µL de las fracciones disueltas en el equipo LC-ESI-QTOF descrito en la sección anterior al igual que los parámetros de operación del cromatógrafo líquido y espectrómetro de masas. Los datos fueron adquiridos usando método MS en modo positivo y resolución realizando un scan de 600 a 1700 m/z.

Los cálculos de masas intactas se realizaron siguiendo la metodología planteada por Munuera [33].

3.4. Caracterización enzimática

Los ensayos correspondientes a la caracterización enzimática se realizaron haciendo uso de sustratos cromogénicos específicos para cuantificar las principales actividades catalíticas de los venenos: L-aminoácidoxidasas, serínproteasa, fosfolipasa A₂ y proteolítica. La actividad fue monitoreada en la longitud de onda específica para la detección de la actividad sobre cada sustrato mediante el lector de microplacas (Glomax Discover System, Promega). Tres experimentos independientes se realizaron por triplicado. Se usaron venenos de *Bothrops asper* y *Bothrops atrox* para comparación.

3.4.1. Actividad proteolítica

La estimación de la actividad proteolítica se realizó utilizando azocaseína como sustrato sintético [58]. Se diluyó 5 mg de azocaseína en 1 mL de solución Tris-HCl 50mM pH 8,0 (Buffer A).

Las muestras de venenos fueron disueltas usando la misma solución buffer A en concentración de 1 mg/mL. Se tomó, 10µL de veneno y 90µL de sustrato en tubos y se colocó en eppendorf de 1,5 mL. Se incubó a 37°C durante 90 min. Luego, se adicionaron 200 µL de TCA al 5%; después de 5 min, los tubos fueron centrifugados a 8000 rpm, 5 min. La reacción se detuvo, añadiendo 150 µL de NaOH 0,5M; la absorbancia se determinó mediante espectrofotometría a 450 nm y 37°C. Se utilizaron 10µL de buffer A y 90µL de solución sustrato como blanco (Ver figura 3.5).

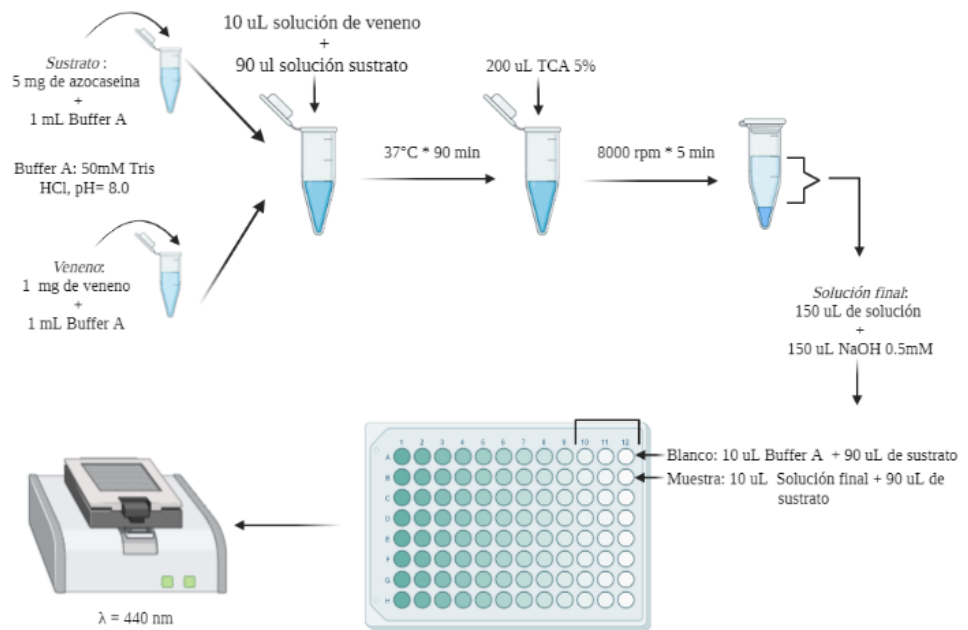


Figura 3.5 Resumen del ensayo in vitro usado para evaluar la actividad proteolítica del veneno.

3.4.2. Actividad fosfolipasas A₂

La estimación de la actividad fosfolipasa A₂ se realizó haciendo uso de (NOBA) como sustrato que mimetiza fosfolípidos de membrana [59]. Se tomó 3,1 mg de NOBA y se disolvió en 1 mL de acetonitrilo y 10 mL de buffer B compuesto por Tris-HCl 10 mM, CaCl₂ 10 mM, NaCl 0,1 M, pH 8,0. La muestra de veneno se preparó con buffer A en una concentración 1 mg/mL. Se mezcló en una microplaca de 96 pocillos, 20 µL de veneno, 220 µL de sustrato y 20 µL de agua destilada; se incubó a 37°C, 20 min. A continuación, se midió la absorbancia a 405 nm. Se mezcló 20 µL de buffer A, 220 µL de sustrato y 20 µL de agua destilada como blanco para realizar correcciones de lecturas (Ver figura 3.6).

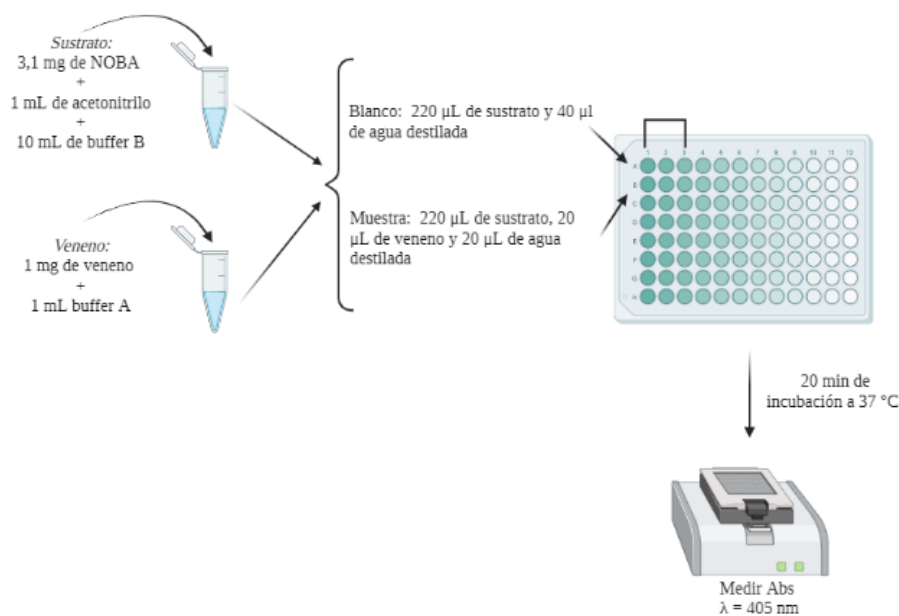


Figura 3.6 Representación de la cuantificación de la actividad fosfolipasa A2 del veneno.

3.4.3. Serínproteasa

La estimación de la actividad serín proteasa se realizó utilizando como sustrato cromogénico L-BapNa[60][61]. La solución sustrato se preparó disolviendo 6,5 mg de L-BapNa en 150 μ L de (DMSO) y 14,85 mL de buffer B. El veneno liofilizado, se disolvió en buffer A en una concentración 1 mg/mL. Se mezcló 20 μ L de veneno, 200 μ L de sustrato y 50 μ L de buffer A en una microplaca de 96 pocillos. La medición de la reacción de hidrólisis se realizó a 410nm luego de 30 min de incubación. Para la corrección de medidas se tomaron 200 μ L de sustrato y 70 μ L de buffer A como blanco (Ver figura 3.7).

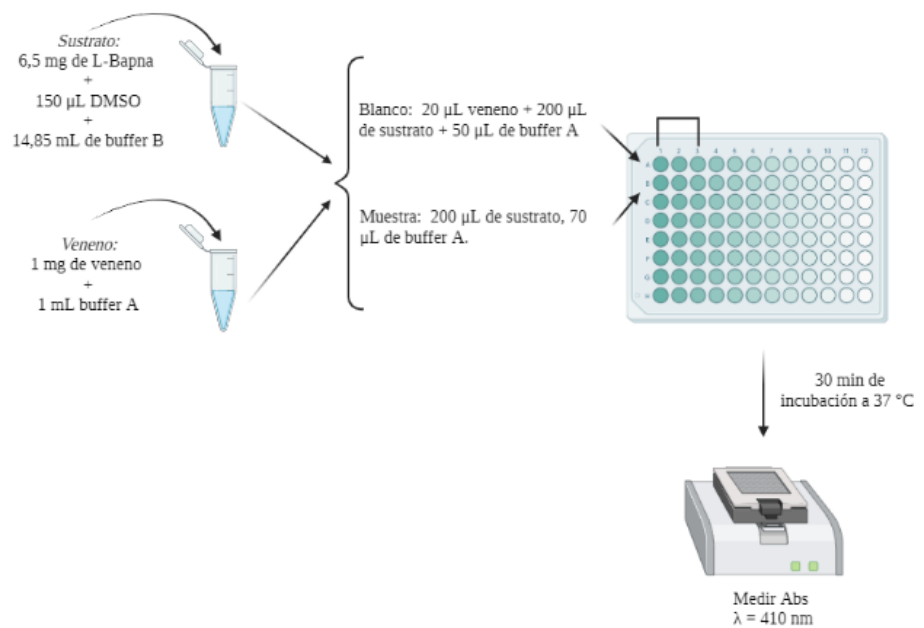


Figura 3.7 Ilustración de la determinación de la actividad serín proteasa del veneno.

3.4.4. L-aminoácido oxidasa

Para la estimación de la actividad L-aminoácido oxidasa (LAAO) se utilizó L-metionina como sustrato[62]. Se preparó 1 mL de solución sustrato (50 mM de Tris-HCl; 5 mM de L-metionina; 2mM de 4,5-dicloro-o-fenilendiamina; pH 8,0). La solución de veneno liofilizado se disolvió en buffer A en una concentración 1 mg/mL. Adicionalmente, se preparó una solución de peroxidasa 0,8 U/mL. Se mezcló 20 μ L de veneno, 90 μ L de sustrato y 10 μ L de peroxidasa en una microplaca de 96 pocillos. La mezcla se incubó a 37°C por 60 min. La reacción se detuvo empleando 50 μ L de H₂SO₄ 2M, la absorbancia se midió a 490 nm. Para el blanco se mezcló 20 μ L de agua destilada, 90 μ L de sustrato y 10 μ L de peroxidasa (Ver figura 3.8).

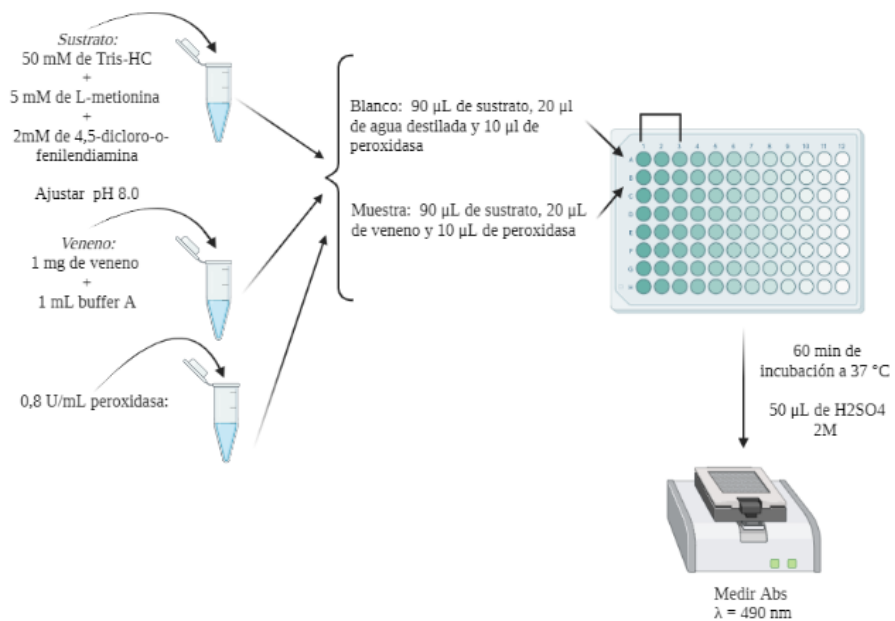


Figura 3.8 Esquema de estimación de la actividad L-aminoácido oxidasa del veneno.

CAPÍTULO 4

4. RESULTADOS

4.1. Caracterización bioquímica

Las proteínas presentes en el veneno de *L. muta* fueron separadas por RP-HPLC (figura 4.1) y caracterizadas utilizando análisis venómico (Tabla 4.2). La gran mayoría de las proteínas del veneno coinciden con proteínas previamente identificadas en venenos de serpientes de *L. stenophrys* y *L. muta muta* [10][11].

El perfil cromatográfico RP-HPLC (figura 4.1) del veneno de la serpiente *Lachesis muta*, reveló la presencia de 36 picos en los que se destacan 3 grupos que difieren en su polaridad:

- El primer grupo (polares) que se compone de la fracción 1 a la fracción 15 y eluyen en rangos de tiempo de retención entre 15 y 26 minutos.
- El segundo grupo (medianamente polares) que se compone de la fracción 16 a la fracción 27 y eluyen en rangos de tiempos de retención entre 43 y 63 minutos.
- El tercer grupo (apolares) que se compone de la fracción 28 a la fracción 36 y eluyen en rangos de tiempos de retención entre 70 y 90 minutos.

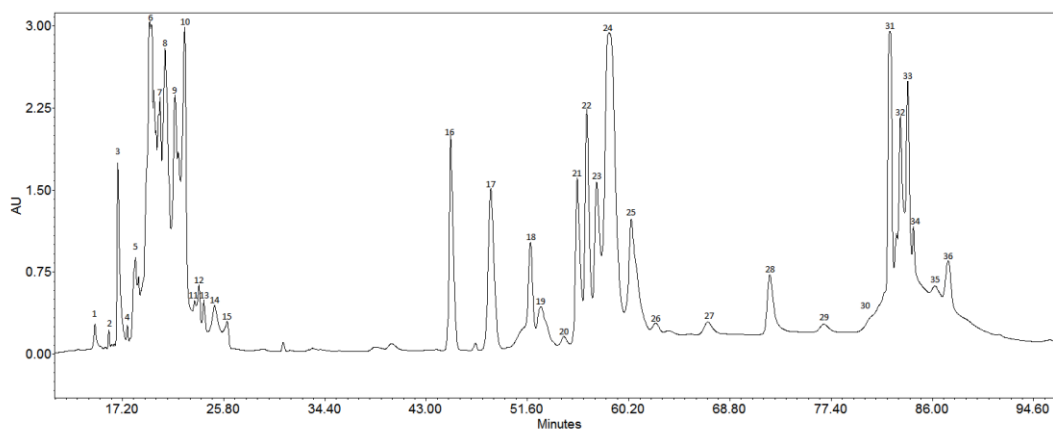


Figura 4.1 Fraccionamiento del veneno de serpiente *Lachesis muta* mediante RP-HPLC.

Visualmente la figura 4.1, indica que existe mayor abundancia de picos en el primer y segundo grupo de proteínas, lo que se relaciona con la cuantificación relativa de los picos cromatográficos (tabla 4.1). El segundo grupo presenta la mayor abundancia relativa de proteínas del veneno con un 48,91%, seguido del primer grupo con un 29,76% y por último, el tercer grupo con un 15,97%. Las fracciones 24 y 6 presenta el mayor porcentaje con un 17,09% y 9.31% respectivamente. La fracción 24 eluye a los 60 minutos mientras que la fracción 6 eluye a los 20 min aproximadamente.

Tabla 4.1 Porcentaje de abundancia relativa de las fracciones del veneno obtenidas por RP-HPLC.

Fracción	% Abundancia relativa	Fracción	% Abundancia relativa
1	0,4	19	1,48
2	0,2	20	0,17
3	3,68	21	4,34
4	0,14	22	5,75
5	2,18	23	3,35
6	9,31	24	17,09
7	0,28	25	5,6
8	3,03	26	0,3
9	2,81	27	0,79
10	4,65	28	1,9
11	0,04	29	0,4
12	0,23	30	0,03
13	0,35	31	7,29
14	0,98	32	2,04
15	0,48	33	3,06
16	6,36	34	0,14
17	6,94	35	0,37
18	3,1	36	0,74

Las fracciones obtenidas por RP-HPLC fueron separadas por electroforesis SDS-PAGE en condiciones reductoras; se evidenció la ausencia de componentes capaces de producir bandas visibles en las primeras 15 fracciones. La figura 4.2 muestra bandas pronunciadas con pesos moleculares alrededor de los 14 kDa para las fracciones 16, 17, 21, 22 y 34. Por consiguiente, las fracciones 18, 20, 21, 22, 25 y 25 exhiben bandas pronunciadas en el rango de los 30-40 KDa. Asimismo, las fracciones en el rango 28-36 revelan bandas definidas por encima de los 60 KDa. Finalmente, queda en evidencia la similitud que existe entre las bandas que se visualizan en las fracciones 34, 35 y 36.

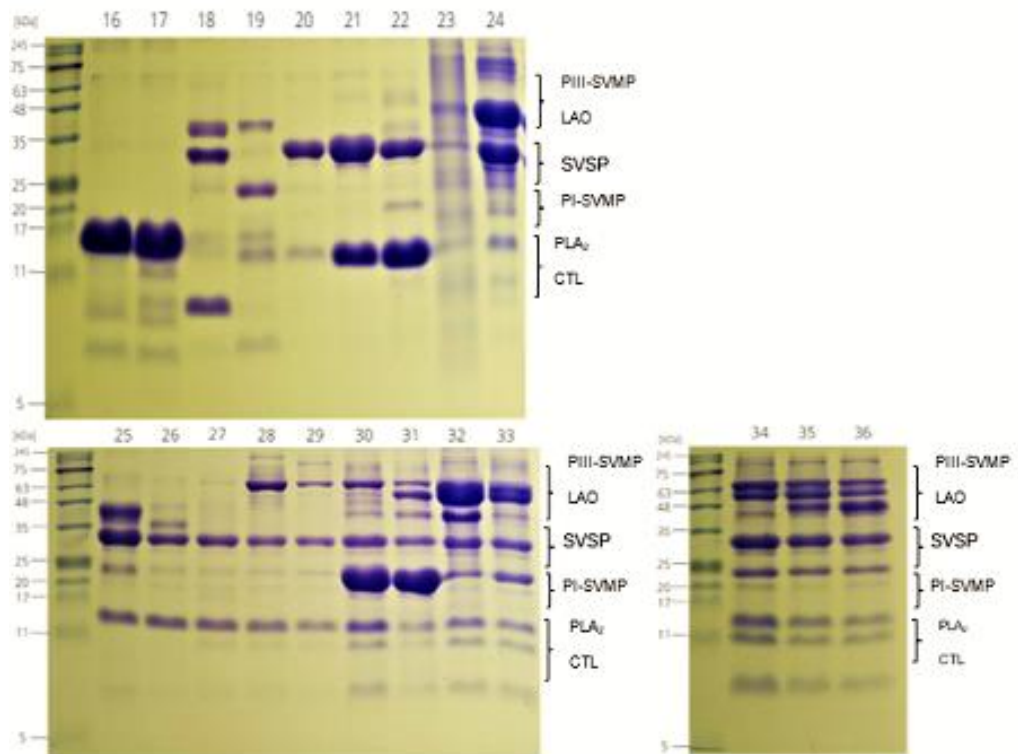


Figura 4.2 Electroforesis SDS-PAGE unidimensional de las fracciones de veneno de serpiente *Lachesis muta* obtenidas por RP-HPLC.

Las fracciones de proteínas purificadas muestran solo una banda electroforética pronunciada como es el caso de la fracción 16; su masa molecular intacta fue determinada mediante espectrometría de masas ESI-MS en modo scan (Tabla 4.2). La figura 4.3 muestra un ejemplo de espectro

de masas de ionización por electropulverización de la proteína de 14 KDa, que se muestra en la fracción 16 e identificada como una proteína miembro de la familia PLA₂ (Tabla 4.2).

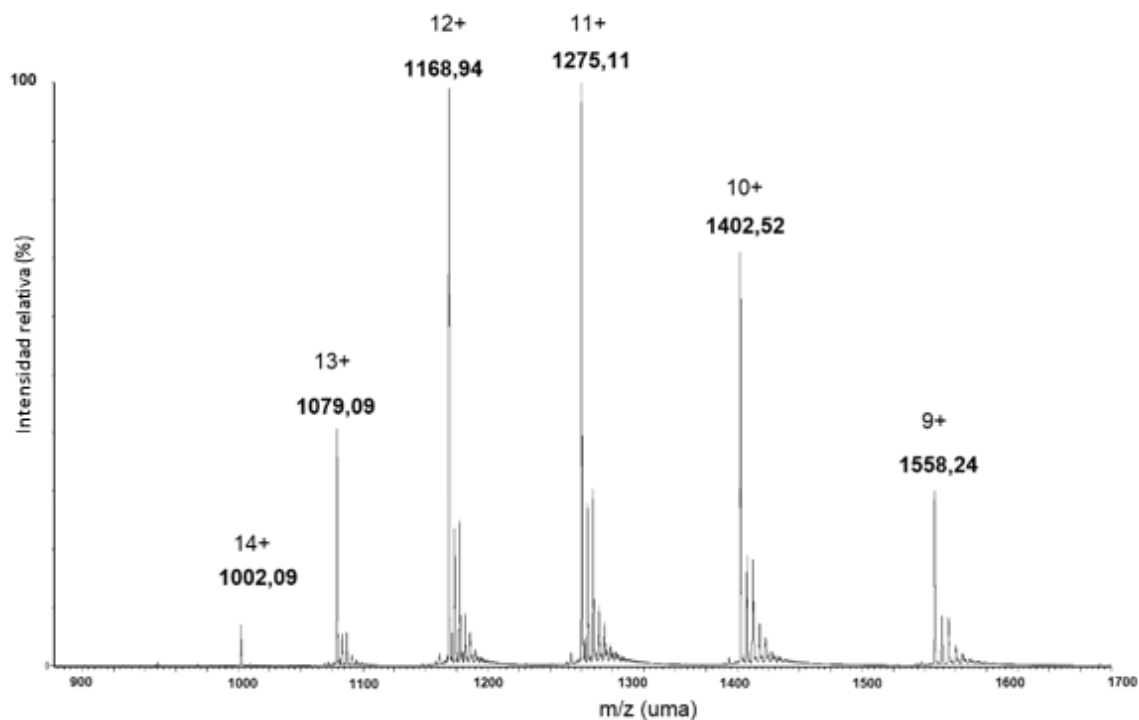


Figura 4.3 Espectro de masas de ionización por electropulverización de la proteína aislada por RP-HPLC en la fracción 16, la cual exhibe una masa molecular 14KDa.

Las fracciones que no evidenciaron bandas electroforéticas y las bandas electroforéticas de interés que fueron escindidas del gel fueron sometidas a reducción, carbamidometilación y digestión trípica. Seguidamente, los péptidos trípticos resultantes de la digestión se analizaron mediante la secuencia de aminoácidos de iones peptídicos doble y triplemente cargados, seleccionados mediante espectrometría de masas en tándem de disociación inducida por colisión. Los espectros fueron interpretados manualmente a través del programa MASCOT DESTILLER 2.7 [55], contra la base de datos Swiss-Prot/TrEMBL [56].

La interpretación de los diferentes espectros permitió identificar 11 familias de proteínas (tabla 4.2), prevaleciendo las SVSP 23%, BPP 21%, CTL 17%, SVMP 11%, PLA2 10%, Desintegrina 6%, NGF 4%, LAAO 3%, CRISP 3%, Ohanin 1%. Sin embargo, solo 1% de las proteínas no pudieron ser identificadas (figura 4.4).

La tabla 4.2, muestra la presencia de BPP y desintegrina para las fracciones en el rango 1-15 que serían las primeras en eluir en el fraccionamiento por RP-HPLC. Seguidamente, en el rango de la fracción 16-28, se identificaron proteínas del tipo PLA₂, NGF, CRISP, CTL Y SVSP que pertenecen al segundo grupo en eluir. Finalmente, las fracciones en el rango 28-36 presentan familias de proteínas del tipo SVMP y LAAO.

Tabla 4.2 Asignación de las fracciones RP-HPLC del veneno *Lachesis muta* a familias de proteínas mediante secuenciación de iones peptídicos por LC-ESI-MS resultantes de la digestión con tripsina en gel y en solución.

Fracción	Masa (KDa)	Péptido ion		Secuencia del péptido	Proteína relacionada	
		m/z	z		Familia	Especie
1				No identificada		
2-10	1	532,280	2+	TPPAGPDVGPR	BPP	<i>Agkistrodon Bilineatus</i>
-7	8	684,295	3+	LRPGAQCAEGLCCDQCR	Desintegrina	<i>Crotalus basiliscus</i>
	8	576,239	2+	CTGQSADCPR	Desintegrina	<i>Crotalus basiliscus</i>
11				No identificada		
12-13	1	572,301	2+	QGGPPRPQIPP	BPP	<i>Bothrops Insularis</i>
12-14	1	532,282	2+	TPPAGPDVGPR	BPP	<i>Agkistrodon Bilineatus</i>
15				No identificada		
16	14	508,250	2+	GRPQDATDR	PLA2	<i>Lachesis muta rhombeata</i>
16-17	14	649,367	2+	HLLQFGDLINK	PLA2	<i>Lachesis muta rhombeata</i>
17	28	682,323	2+	ALTMEGNQASWR	NGF	<i>Bothrops Jaracussu</i>
18	30	569,754	2+	SVDFDSESPR	CRISP	<i>Bothrops cotiara</i>
18,19	28	509,572	3+	IIGGDECNINEHR	SVSP	<i>Gloydus blomhoffii</i>

	28	518,775	2+	AYTGLPATSR	SVSP	<i>Lachesis Stenophrys</i>
18,21	29	820,380	2+	CANINLLDYEVCR	SVSP	<i>Protobothrops Mucrosquamatus</i>
18,22	28	581,300	2+	SVNPTASNMLK	CRISP	<i>Gloydus blomhoffii</i>
18-23	28	559,798	2+	TLCAGILEGGK	SVSP	<i>Lachesis Stenophrys</i>
19	24	760,397	2+	NVGVPQVVPDNER	Ohanin	<i>Lachesis muta muta</i>
	24	570,806	2+	GNLNLVPEER	Ohanin	<i>Lachesis muta muta</i>
19,22-24,34-36	29	595,816	2+	IMGWGTISPTK	SVSP	<i>Lachesis muta muta</i>
20	27	544,255	2+	VPNEDEQTR	SVSP	<i>Gloydus shedaoensis</i>
20,21,24	27	504,899	3+	VIGGDECNINEHR	SVSP	<i>Gloydus shedaoensis</i>
21	17	665,764	2+	AWEDAEMFCR	CTL	<i>Lachesis Stenophrys</i>
21,22	28	635,679	3+	KPEIQNEIVDLHNSLR	CRISP	<i>Gloydus blomhoffii</i>
21,22,34-36	17	786,891	2+	EFCVELVSLTGYR	CTL	<i>Lachesis Stenophrys</i>
21,22,29,34-36	17	644,782	2+	SCTDYLTWDK	CTL	<i>Lachesis Stenophrys</i>
21,22,24,28,34-36	17	701,363	2+	GQAEVWIGLWDK	CTL	<i>Lachesis Stenophrys</i>

21,28,34-36	17	958,947	2+	YGESLEIAEYISDYHK	CTL	<i>Lachesis Stenophrys</i>
22	28	581,301	2+	SVNPTASNMLK	SVSP	<i>Gloydus blomhoffii</i>
	17	639,795	2+	LWNDQVCESK	CTL	<i>Lachesis Stenophrys</i>
22,28,34-36	17	621,264	2+	DFSWEWTDR	CTL	<i>Lachesis Stenophrys</i>
23,24	26	710,857	2+	SLMNIYLGMHNK	SVSP	<i>Lachesis muta muta</i>
23,25	26	867,418	2+	VLCAGVLEGGIDTCNR	SVSP	<i>Lachesis muta muta</i>
24	27	583,288	3+	ILCAGVLEGGIDTCNR	SVSP	<i>Crotalus durissus collilineatus</i>
	28	565,816	2+	ILCAGILEGGK	SVSP	<i>Gloydus brevicaudis</i>
	26	416,707	2+	NDEVLDK	SVSP	<i>Gloydus ussuriensis</i>
25,26	17	621,266	2+	DFSWEWTDR	CTL	<i>Bothrops pirajai</i>
26,27	46	547,784	2+	YNSNLNTIR	SVMP	<i>Bothrops asper</i>
26,28,33	49	728,910	2+	LVLVADYIMYLK	SVMP	<i>Lachesis muta rhombeata</i>
26,27,29,34-36	70	818,460	2+	IYEIVNILNEIFR	SVMP	<i>Bothrops jararaca</i>
27,28-34-36	59	743,852	2+	ETDYEEFLEIAK	LAO	<i>Lachesis muta</i>

27,28,32,34-36	70	860,481	2+	IIVQSSADVTLDLFAK	SVMP	<i>Lachesis muta rhombeata</i>
28	71	822,406	2+	MYEIVNTVNEIYR	SVMP	<i>Crotalus viridis viridis</i>
	71	760,718	3+	YMYIHVALVGLIWSNEDK	SVMP	<i>Crotalus viridis viridis</i>
	70	580,852	2+	FVELVLVVDK	SVMP	<i>Crotalux atrox</i>
	70	801,385	2+	MYELANTVNDIYR	SVMP	<i>Crotalux atrox</i>
	47	438,578	3+	YIELVVVADHR	SVMP	<i>Crotalux atrox</i>
	47	554,294	2+	YNSDLNIIR	SVMP	<i>Crotalux atrox</i>
	28	733,394	2+	SSEEVDLVSILK	CTL	<i>Crotalus horridus</i>
	24	828,083	3+	VSLTDLEIWSDDQDFITVQSSAK	SVMP	<i>Crotalus ruber ruber</i>
28,30,33	59	1.111,539	3+	EGNLSPGAVDMIGDLLNEDSGYYVSFIES LK	LAAO	<i>Lachesis muta</i>
28,33	59	1.107,916	3+	HVVIVGAGMSGLSAAYVLAEAGHQVTVL EASER	LAAO	<i>Lachesis muta</i>

	59	641,320	2+	SAGQLYEESLGK	LAAO	<i>Lachesis muta</i>
28,34-36	59	519,240	2+	FWEDDGIR	LAAO	<i>Lachesis muta</i>
29	23	781,410	2+	VHEIVNTLNGFYR	SVMP	<i>Lachesis muta muta</i>
29,31,34-36	23	532,775	2+	YNGNLNTIR	SVMP	<i>Lachesis muta muta</i>
29,32,34-36	55	650,357	2+	YVELVVADHR	SVMP	<i>Gloydus ussuriensis</i>
29,33	49	792,443	3+	WIYQIVNTINEIYIPLNIR	SVMP	<i>Crotalux atrox</i>
30,33	59	688,697	3+	DCADIVINDLSLIHQLPK	LAAO	<i>Sistrurus catenatus edwardsi</i>
31,34-36	23	640,834	2+	NSVGIVQDHSPK	SVMP	<i>Lachesis muta muta</i>
32,33	49	670,777	2+	YSDDGMVDHGTK	SVMP	<i>Crotalux atrox</i>
32,34-36	57	743,850	2+	ETDYEEFLEIAK	SVMP	<i>Bothrops jararacussu</i>
34-36	23	861,449	2+	YIELVVADHGMFTK	SVMP	<i>Lachesis muta muta</i>
	23	1,112,878	3+	ISHDNAQLLTAIDLADNTIGIAYTGGMCYP K	SVMP	<i>Lachesis muta muta</i>
	29	836,397	3+	EIYPDVPHCADINILDHAVCR	SVSP	<i>Lachesis muta muta</i>

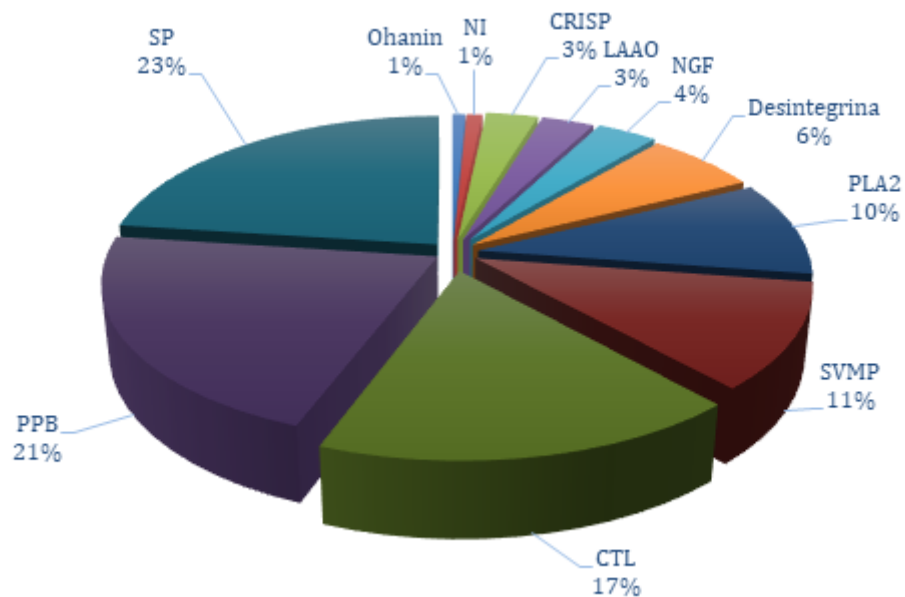


Figura 4.4 Composición del veneno de *Lachesis muta* según familia de proteínas identificadas en la presente investigación.

4.2. Caracterización enzimática

La actividad caseinolítica, PLA₂, SVSP, LAAO fueron evaluadas mediante métodos colorimétricos. El análisis se realizó empleando ANOVA, con una significancia de $p < 0,05$ para la prueba de Tukey (Figura 4.5). Existen diferencias significativas importantes entre los individuos estudiados para las actividades caseinolítica y SVSP. Las actividades de PLA₂ y LAAO indican diferencias significativas entre individuos *B. atrox* versus *L. muta* y *B. asper*. Estas diferencias encontradas demuestran la presencia de variaciones individuales importantes en las actividades enzimáticas dentro de la misma población.

Los ensayos caseinolítico, PLA₂ y LAAO evidenciaron mayor actividad para el individuo de la especie *B. atrox* seguido del *L. muta* y *B. asper*. Esta diferencia es más pronunciada en la actividad LAAO. Los ensayos de SVSP indican que veneno de serpiente *L. muta* ejerció mayor efecto sobre el sustrato sintético BapNa, seguido en menor escala por *B.atrox*.

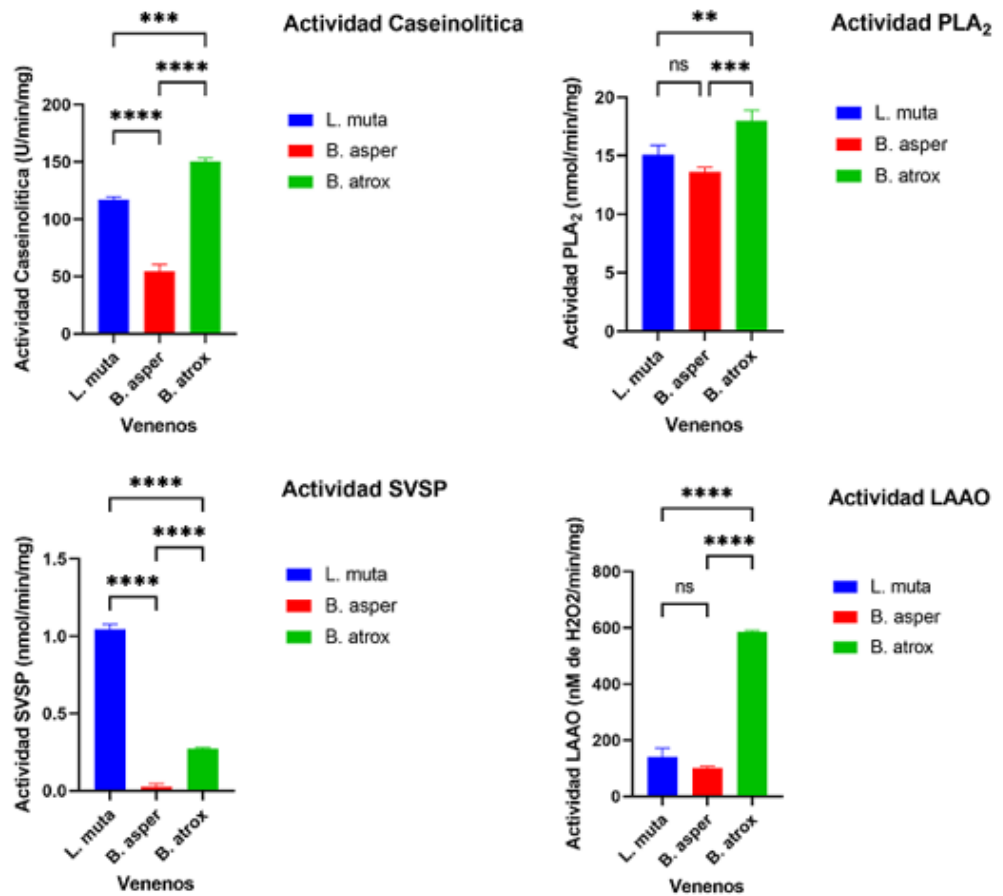


Figura 4.5 Caracterización enzimática del veneno *Lachesis muta* en comparación con venenos de la misma familia *Viperidae*, *Bothrops asper* y *Bothrops atrox*.

4.3. Discusión

La caracterización proteómica del veneno de *Lachesis muta* se realizó haciendo uso de la combinación de herramientas analíticas que involucran la cromatografía líquida (LC), electroforesis SDS-PAGE (unidimensional) y espectrometría de masas. Previo a la interpretación y comparación de los principales hallazgos de este estudio, se discuten los fundamentos de las técnicas analíticas empleadas en los últimos años para la comprensión de

sus aplicaciones y contribuciones para la Toxinología y terapéutica basada en antivenenos.

La descomplejación del veneno inició con un fraccionamiento por RP-HPLC, haciendo uso de una columna cromatográfica analítica C18. Trabajos similares usan este tipo de columna como referencia para la separación de los diferentes componentes del veneno basado en la hidrofobicidad. Las fracciones colectadas manualmente fueron separadas en función de la masa molecular de sus componentes a través de SDS-PAGE (unidimensional). Seguidamente, las proteínas que presenten bandas electroforéticas se pueden escindir y digerir en gel, para finalmente ser analizadas LC-MS (ver figura 4.6 C)[8].

El enfoque empleado en este trabajo tiende a ser lento debido a la manualidad que involucra, especialmente en la recolección y posterior procesamiento de fracciones cromatográficas. La presencia de proteínas minoritarias en los venenos (por ejemplo, hialuronidasas), pueden ser difíciles de identificar en fraccionamiento empleando columnas analíticas C18. Por tanto, podrían estar siendo desconsideradas en algunos estudios[63].

A nivel mundial existen otros flujos de trabajo de caracterización proteómica usados para el análisis de muestras biológicas complejas basados en gel (Gel based) y cromatografía líquida (LC based). A este último se le conoce como estrategia de análisis “shotgun proteomics” [8].

La estrategia basada en gel (Gel based) se fundamenta en la aplicación de electroforesis en gel bidimensional (2DE) que consiste en la separación o descompulsión de las proteínas en función de dos importantes parámetros: su punto isoeléctrico (pI) y su masa molecular (ver figura 4.6 A). Esta doble dimensionalidad proporciona información, principalmente para la resolución e identificación de isoformas y proteínas que coeluyen durante el fraccionamiento en columna. Las bandas o puntos visibles en el gel se extirpan, digieren y someten a análisis de espectrometría de masas en

tándem (MS/MS). Esta metodología revela un patrón completo de desdoblamiento de la muestra [64].

Las proteínas y péptidos de gran tamaño se retienen en los geles electroforéticos, mientras que los péptidos de bajo peso molecular se disipan muchas veces [8]. Este patrón puede ser visualizado en esta investigación. Los primeros picos no mostraron bandas evidentes en los geles. Estas fracciones son abundantes en péptidos del tipo BPP y C-NP que no pudieron ser visualizados en nuestro análisis en geles 1D.

La estrategia basada en LC (Figura 4.6 B) consiste en la digestión de la muestra de veneno completa usando columnas HPLC en fase reversa para su separación junto a equipos con escalas de nano-flujo. Especialmente, cuando se combina en línea con intercambio iónico u otros tipos de cromatografía líquida en conjunto son llamadas separaciones multidimensionales. Lo que resulta en una estimación cualitativa y cuantitativa, compleja por la dificultad de relacionar los péptidos con las proteínas originales[64].

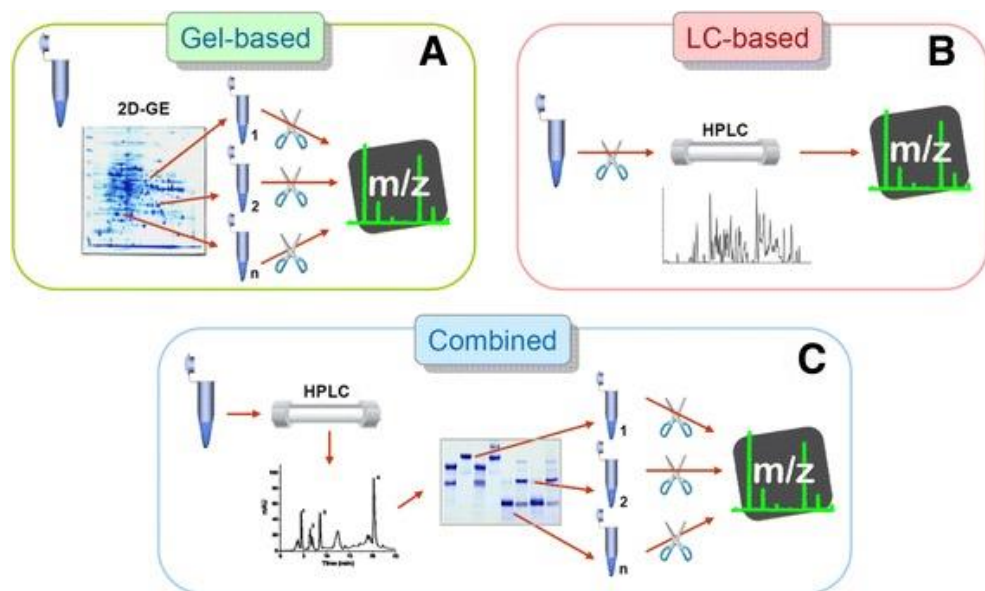


Figura 4.6 Herramientas analíticas comúnmente empleadas para el estudio de la composición de proteínas y péptidos de venenos de serpientes[8].

El análisis de péptidos trípticos pertenecientes a proteínas escindidas y digeridas en gel mediante MS en tándem de cromatografía líquida (LC-MS/MS). Se realizó en modo de adquisición dependiente de datos (DDA). Este modo consiste en un barrido de iones precursores (espectros MS1), que ocurre en el cuadrupolo (Q) en un rango de masas (m/z), basados en la abundancia de iones peptídicos +2 y +3 cargados en ESI. Los iones más intensos detectados en este primer barrido son secuencialmente aislados y posteriormente fragmentados (espectros MS2) mediante disociación inducida por colisión de alta energía (CID) que ocurre en la celda de colisión. Los fragmentos generados en el espectro MS/MS son detectados en el analizador de tiempo de vuelo (TOF). (Figura 4.7). Los espectros de MS2 junto con la masa del ion son analizados en la base de datos de proteínas para inferir la secuencia del péptido y la identidad de la proteína[65].

La depuración realizada en el modo DDA excluye el remuestreo del mismo ion precursor, lo que extiende la cantidad de precursores diferentes que se seleccionan a lo largo del tiempo. Sin embargo, esta optimización tiene la desventaja de que los iones precursores que eluyen en tiempos similares de las columnas son descartados del análisis si su masa precursora se encuentra dentro del rango de masas excluidas [65].

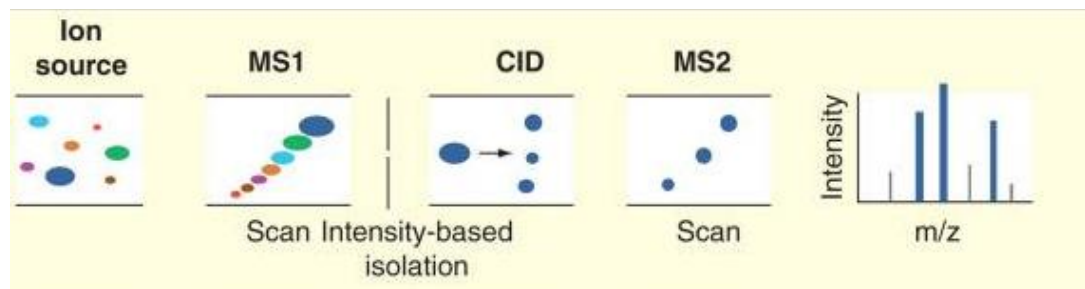


Figura 4.7. Esquema simplificado del modo de adquisición de datos dependiente DDA que también fue usado en esta investigación[65].

El perfil de fraccionamiento RP-HPLC utilizado en el presente trabajo realizado, mostró tres grupos de componentes en el veneno de la serpiente *L. muta* que difieren en su polaridad. Luego, al identificar las proteínas correspondientes a cada grupo, se relaciona con lo descrito previamente por

Lomonte en el año 2017 en la figura 4.8. Donde existe un primer grupo de elución donde prevalecieron componentes del tipo péptidos y proteínas de bajo peso molecular. El segundo grupo, lo constituyeron enzimas del tipo PLA₂, CTL, SVSP, CRISP, NGF, VEGF. Finalmente, un tercer grupo estuvo constituido por toxinas del tipo SVMP, LAAO [8].

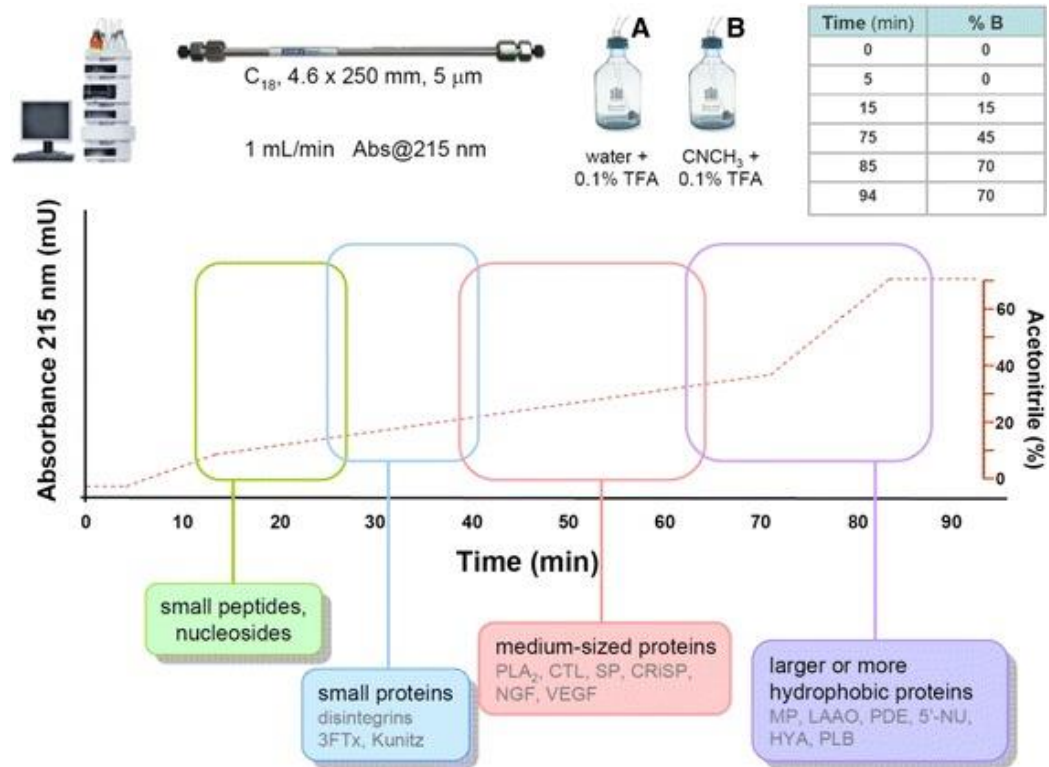


Figura 4.8 Representación simplificada de la elución de toxinas de venenos sometidas a separación cromatográfica por RP-HPLC [8].

El cálculo de porcentaje de abundancia relativa estimó la suma de todos los picos cromatográficos o fracciones recolectadas como el 100 % de contenido total proteico del veneno. El porcentaje de abundancia relativa obtenido para cada fracción (tabla 4.1) en esta investigación fue dividido en partes iguales para las diferentes familias de toxinas identificadas dentro de ellas. No obstante, una mejor estimación de los porcentajes de proteínas en cada fracción se obtiene aplicando análisis basados en densitometría de gel [20].

Al comparar la composición proteica encontrada para el veneno de serpiente de *L. muta* (Ecuador) que se muestra en la figura 4.4, con estudios previos de proteomas de *L. muta* (Sur América) y *L. stenophrys* (América Central) indicados en la figura 4.9[10]. Se evidencia similitud entre los componentes del veneno de *L. muta* ecuatoriana y *L. stenophrys* de América Central. Sin embargo, el proteoma de *L. muta* ecuatoriana expone la presencia de proteínas del tipo desintegrina y un alto contenido de CTL y la ausencia de 3FTX, y DPP (dipeptidilpeptidasa).

Esta similitud y pequeñas diferencias en la composición de proteínas entre especies estrechamente relacionadas pueden explicarse por diferentes factores, tales como la divergencia filogenética, dieta, cambios por la edad e inclusive los rangos de distribución geográfica[7].

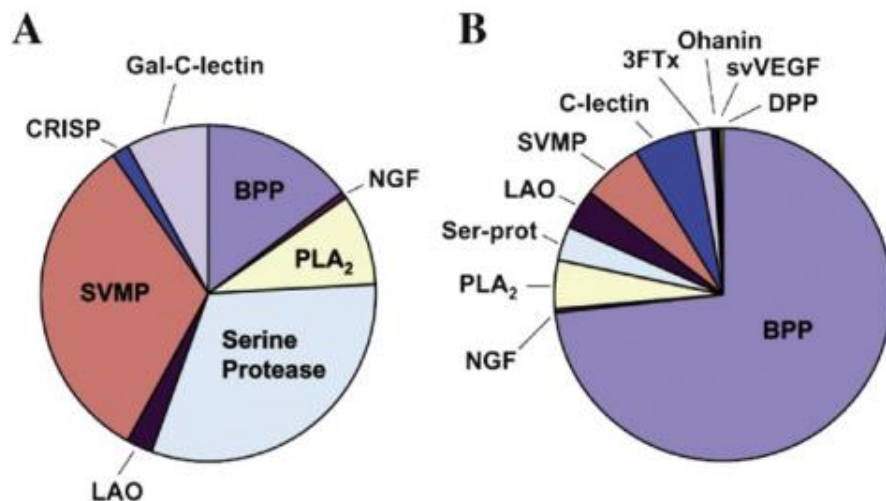


Figura 4.9 Análisis comparativo del venoma de *Lachesis* previamente reportado en literatura. Se ilustra la composición proteica de los venenos de *Lachesis muta* (A) y *Lachesis stenophrys* (C), los cuales fueron determinados mediante el empleo de un enfoque proteómico[10].

La caracterización enzimática de veneno de *L. muta* ecuatoriana (figura 4.5), mostró mayor actividad SVSP en comparación con los individuos del género

Bothrops. Esto, se alinea con el alto contenido de SVSP encontrado en los componentes del veneno (figura 4.4).

La actividad proteolítica en un alto porcentaje es atribuida a la presencia de SVMP y CTL en los venomas. Por consiguiente, la notable diferencia encontrada en la actividad proteolítica entre *B. atrox* y *B. asper* se atribuye a la variación de SVMP que fluctúa en 70% y 40% respectivamente[66][67]. Análogamente, *L. muta* muestra pronunciada actividad proteolítica que podría relacionarse con el contenido de proteínas CTL, SVMP indicados en la composición del veneno.

El venoma de *B. atrox* contiene 14% de isoformas tipo PLA₂ [66]. Obando en el año 2020, reportó 10% de PLA₂ para el venenoma *B. asper*[67], porcentaje similar al contenido PLA₂ encontrado en esta investigación para el veneno de *L. muta*. Estas diferencias y similitudes podrían explicar la mayor actividad enzimática por parte de *B. Atrox* en comparación con *B. asper* y *L. muta*.

CAPÍTULO 5

5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1. Conclusiones

- El fraccionamiento del veneno mediante cromatografía líquida de alta eficiencia en fase reversa (RP-HPLC), mostró 36 fracciones cromatográficas separadas en 3 grupos que difieren en su polaridad.
- La separación de las toxinas presentes en cada fracción cromatográfica, fueron separadas por electroforesis SDS-PAGE (unidimensional) en condiciones no reductoras. Se evidencio ausencia de bandas electroforéticas por parte de las primeras 15 fracciones. Seguidamente, las toxinas presentes en el rango de las fracciones 16-36 exhibieron masas moleculares entre los 14 y 70 kDa.
- El análisis proteómico “snake venomics” con enfoque bottom up, fue implementado y permitió la identificación de 11 familias de proteínas en el veneno *L. muta*, en el que destacan un alto contenido de toxinas del tipo SVSP y BPP.
- La caracterización enzimática mostró una mayor actividad enzimática SVSP por parte de *L. muta* ecuatoriana en comparación con los venenos del género *Bothrops*. Esto se correlaciona con el alto contenido de SVSP en su composición proteica.
- Se evidenció similitud entre los componentes del veneno de *L. muta* ecuatoriana y *L. stenophrys* de América Central. Sin embargo, el proteoma de *L. muta* ecuatoriana indica la presencia de proteínas del tipo desintegrina y un mayor contenido de CTL.

5.2. Recomendaciones

- Incluir análisis de densitometría en gel, con el fin de mejorar cálculos de abundancia relativa.
- Estudiar la capacidad neutralizante del antiveneno utilizado en Ecuador en el veneno caracterizado (*L. muta*).
- Realizar estudios de individuos de la misma especie, a nivel nacional, con el fin de ampliar el espectro de información proteómica sobre esta especie.

6. Referencias

- [1] O. M. de la Salud, “Mordeduras de serpientes venenosas,” 2021. <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/snakebite-envenoming#>.
- [2] N. D. E. Salud, “MANUAL DE NORMAS Y PROCEDIMIENTOS,” pp. 1–60, 2008.
- [3] D. N. de E. de Blga. Daniela Bahamonde V., analista *et al.*, “Ministerio de Salud Pública. Manejo clínico de pacientes con mordeduras de serpientes venenosas y picaduras de escorpiones. Protocolo basado en la evidencia. Primera edición Quito: Dirección Nacional de Prevención y Control y Dirección Nacional de Normati.”
- [4] M. del C. Terán and B. Lomonte, “Actividad letal de seis venenos de serpientes de importancia médica en el Ecuador,” *Rev. Ecuat. Med. Cienc. Biol.*, vol. 37, no. 2, Nov. 2016, doi: 10.26807/remcb.v37i2.4.
- [5] A. Alape-Girón *et al.*, “Snake Venomics of the Lancehead Pitviper *Bothrops asper*: Geographic, Individual, and Ontogenetic Variations,” *J. Proteome Res.*, vol. 7, no. 8, pp. 3556–3571, Aug. 2008, doi: 10.1021/pr800332p.
- [6] R. R. de Castañeda *et al.*, “Snakebite and snake identification: empowering neglected communities and health-care providers with AI,” *Lancet Digit. Heal.*, vol. 1, no. 5, pp. e202–e203, Sep. 2019, doi: 10.1016/S2589-7500(19)30086-X.
- [7] B. Lomonte *et al.*, “Venomous snakes of Costa Rica: Biological and medical implications of their venom proteomic profiles analyzed through the strategy of snake venomics,” *J. Proteomics*, vol. 105, pp. 323–339, Jun. 2014, doi: 10.1016/j.jprot.2014.02.020.
- [8] B. Lomonte and J. J. Calvete, “Strategies in ‘snake venomics’ aiming at an integrative view of compositional, functional, and immunological characteristics of venoms,” *J. Venom. Anim. Toxins Incl. Trop. Dis.*, vol. 23, no. 1, p. 26, Dec. 2017, doi: 10.1186/s40409-017-0117-8.
- [9] O. M. de la Salud, “Guías para la producción, control y regulación de inmunoglobulinas antiveneno de serpienteo Title,” Costa Rica, 2021. [Online]. Available: <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/347281/9789241210133-Annex5-spa.pdf?sequence=1&isAllowed=y>.
- [10] L. Sanz *et al.*, “Snake venomics of the South and Central American Bushmasters. Comparison of the toxin composition of *Lachesis muta* gathered from proteomic versus transcriptomic analysis,” *J. Proteomics*, vol. 71, no. 1, pp. 46–60, Apr. 2008, doi: 10.1016/j.jprot.2007.10.004.
- [11] M. Madrigal *et al.*, “Snake venomics across genus *Lachesis*. Ontogenetic changes in the venom composition of *Lachesis stenophrys* and comparative proteomics of the venoms of adult *Lachesis melanocephala* and *Lachesis*

- acrochorda,” *J. Proteomics*, vol. 77, pp. 280–297, Dec. 2012, doi: 10.1016/j.jprot.2012.09.003.
- [12] D. Pla *et al.*, “Snake venomomics of *Lachesis muta rhombeata* and genus-wide antivenomics assessment of the paraspecific immunoreactivity of two antivenoms evidence the high compositional and immunological conservation across *Lachesis*,” *J. Proteomics*, vol. 89, pp. 112–123, Aug. 2013, doi: 10.1016/j.jprot.2013.05.028.
- [13] M. del C. Terán and B. Lomonte, “Actividad letal de seis venenos de serpientes de importancia médica en el Ecuador,” *Rev. Ecuat. Med. Cienc. Biol.*, vol. 37, no. 2, pp. 25–30, 2016, doi: 10.26807/remcb.v37i2.4.
- [14] B. Lomonte *et al.*, “Comparative characterization of Viperidae snake venoms from Perú reveals two compositional patterns of phospholipase A2 expression,” *Toxicon X*, vol. 7, p. 100044, Sep. 2020, doi: 10.1016/j.toxcx.2020.100044.
- [15] Manejo de lesiones provocadas por mordeduras de serpientes, “Mordeduras de serpientes venenosas.” p. 55, 2015.
- [16] M. J. Ochoa Andrade, “Frecuencia del envenenamiento por mordeduras de serpientes y perfil sociodemográfico en una población de la Amazonía ecuatoriana y revisión de la literatura.” *Práctica Fam. Rural*, vol. 5, no. 2, Jul. 2020, doi: 10.23936/pfr.v5i2.152.
- [17] J. Díaz-Ricaurte, A. Arteaga, and J. Guayasamin, “Amazonian Bushmaster (*Lachesis muta*),” in *Reptiles of Ecuador: Life in the middle of the world*, Tropical Herping, 2021.
- [18] Wikipedia, “*Lachesis muta*,” *Wikipedia, la enciclopedia libre*. 2020, [Online]. Available: https://es.wikipedia.org/wiki/Lachesis_muta.
- [19] P. D. E. Una *et al.*, “PURIFICACIÓN DE UNA LECTINA TIPO C DEL VENENO DE LA SERPIENTE PERUANA *Lachesis muta* PURIFICATION OF A LECTIN TYPE C FROM THE VENOM OF *Lachesis muta* PERUVIAN SNAKE,” 2012.
- [20] J. J. Calvete, “Proteomic tools against the neglected pathology of snake bite envenoming,” *Expert Rev. Proteomics*, vol. 8, no. 6, pp. 739–758, Dec. 2011, doi: 10.1586/epr.11.61.
- [21] A. Ochoa-Avilés *et al.*, “Viperidae snakebites in Ecuador: A review of epidemiological and ecological aspects,” *Toxicon X*, vol. 7, p. 100051, Sep. 2020, doi: 10.1016/j.toxcx.2020.100051.
- [22] H. W. Fan, M. A. Natal Vigilato, J. C. Augusto Pompei, and J. M. Gutiérrez, “Situación de los laboratorios públicos productores de antivenenos en América Latina,” *Rev. Panam. Salud Pública*, vol. 43, p. 1, Nov. 2019, doi: 10.26633/RPSP.2019.92.
- [23] J. M. Gutiérrez, J. J. Calvete, A. G. Habib, R. A. Harrison, D. J. Williams, and D. A. Warrell, “Snakebite envenoming,” *Nat. Rev. Dis. Prim.*, vol. 3, no. 1, p. 17063, Dec. 2017, doi: 10.1038/nrdp.2017.63.

- [24] H. Bawaskar, P. Bawaskar, and P. Bawaskar, "The global burden of snake bite envenoming," *J. R. Coll. Physicians Edinb.*, vol. 51, no. 1, pp. 7–8, Mar. 2021, doi: 10.4997/JRCPE.2021.102.
- [25] J.-P. Chippaux, "Incidence and mortality due to snakebite in the Americas," *PLoS Negl. Trop. Dis.*, vol. 11, no. 6, p. e0005662, Jun. 2017, doi: 10.1371/journal.pntd.0005662.
- [26] M. de S. P. Ecuador, "EFECTOS TÓXICOS AÑO 2020," 2020. [Online]. Available: <https://www.salud.gob.ec/wp-content/uploads/2021/01/Toxicos-y-quimicos-SE-53.pdf>.
- [27] Statista, "Número de habitantes en Ecuador en 2020, por provincia." <https://es.statista.com/estadisticas/1191532/numero-de-personas-en-ecuador-por-provincia/#:~:text=Se estimó que en 2020,3%2C2 millones de habitantes.>
- [28] C. Mestanza-Ramón *et al.*, "In-Situ and Ex-Situ Biodiversity Conservation in Ecuador: A Review of Policies, Actions and Challenges," *Diversity*, vol. 12, no. 8, p. 315, Aug. 2020, doi: 10.3390/d12080315.
- [29] J. M. Gutierrez, "Envenenamientos por mordeduras de serpientes en América Latina y el Caribe: Una visión integral de carácter regional," *BOLETÍN Malariol. Y SALUD Ambient.*, vol. LI, no. 1, p. 16, 2011, [Online]. Available: <https://www.snakebiteinitiative.org/wp-content/uploads/2012/07/Envenoming-in-Latin-America.pdf>.
- [30] F. C. José María Gutiérrez, Bruno Lomonte, Gustavo Rojas, José A. Gené and E. R. y A. R. Ricardo Estrada, Jorge Alvarado, "EL SUERO ANTIOFÍDICO POLIVALENTE PRODUCIDO EN COSTA RICA. ESTABILIDAD Y CAPACIDAD NEUTRALIZANTE.," *BINASS*, [Online]. Available: <https://www.binasss.sa.cr/revistas/rccm/v9n2/art7.pdf>.
- [31] J. J. Calvete¹ *et al.*, "VENÓMICA Y ANTIVENÓMICA: HERRAMIENTAS PROTEÓMICAS PARA HACER FRENTE A LA PATOLOGÍA DESATENDIDA DEL ENVENENAMIENTO OFÍDICO," in *Estrategias y Avances en el Estudio de Toxinas de Interés para la Biomedicina*, 1st ed., F. P. Santos and C. Á. Valcárcel, Eds. 2015, pp. 77–95.
- [32] Y. N. Utkin, "Animal venom studies: Current benefits and future developments," *World J. Biol. Chem.*, vol. 6, no. 2, p. 28, 2015, doi: 10.4331/wjbc.v6.i2.28.
- [33] J. M. MORA, "Caracterización proteómica de venenos de serpientes de interés biomédico," UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA, 2016.
- [34] S. Mackessy, Ed., *Handbook of Venoms and Toxins of Reptiles*, 1st ed. New York: CRC Press.
- [35] R. M. Kini and R. Doley, "Structure, function and evolution of three-finger toxins: Mini proteins with multiple targets," *Toxicon*, vol. 56, no. 6, pp. 855–867, Nov. 2010, doi: 10.1016/j.toxicon.2010.07.010.
- [36] V. Nastopoulos, P. N. Kanellopoulos, and D. Tsernoglou, "Structure of Dimeric

- and Monomeric Erabutoxin a Refined at 1.5 Å Resolution,” *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.*, vol. 54, no. 5, pp. 964–974, Sep. 1998, doi: 10.1107/S0907444998005125.
- [37] G. Leon *et al.*, “Immune Response Towards Snake Venoms,” *Inflamm. Allergy - Drug Targets*, vol. 10, no. 5, pp. 381–398, Oct. 2011, doi: 10.2174/187152811797200605.
- [38] M. E. Lodovicho *et al.*, “Investigating possible biological targets of Bj-CRP, the first cysteine-rich secretory protein (CRISP) isolated from Bothrops jararaca snake venom,” *Toxicol. Lett.*, vol. 265, pp. 156–169, Jan. 2017, doi: 10.1016/j.toxlet.2016.12.003.
- [39] Q. Lu, A. Navdaev, J. M. Clemetson, and K. J. Clemetson, “Snake venom C-type lectins interacting with platelet receptors. Structure–function relationships and effects on haemostasis,” *Toxicon*, vol. 45, no. 8, pp. 1089–1098, Jun. 2005, doi: 10.1016/j.toxicon.2005.02.022.
- [40] F. Lazo, “Algunas propiedades bioquímicas y biológicas de la Lectina Tipo C del veneno de la serpiente peruana Lachesis muta,” *Univ. Nac. Mayor San Marco*, vol. 2, p. 9, 2015.
- [41] A. Ullah, “Structure–Function Studies and Mechanism of Action of Snake Venom L-Amino Acid Oxidases,” *Front. Pharmacol.*, vol. 11, Feb. 2020, doi: 10.3389/fphar.2020.00110.
- [42] J. J. Hiu and M. K. K. Yap, “Cytotoxicity of snake venom enzymatic toxins: phospholipase A2 and <sc>l</sc>-amino acid oxidase,” *Biochem. Soc. Trans.*, vol. 48, no. 2, pp. 719–731, Apr. 2020, doi: 10.1042/BST20200110.
- [43] J. A. P. Jiménez and L. J. V. Muñoz, “Toxinas de serpientes con alto potencial terapéutico y su uso en la biomedicina,” *IATREIA*, vol. 22, p. 10, 2009.
- [44] S. Huatuco, E. Escobar, and A. Yarlequé, “Aislamiento y caracterización parcial de una miotoxina del veneno de la serpiente Bothrops atrox (Ophidia: Viperidae),” *Rev. peru. biol.*, vol. 11, pp. 79–87, 2004.
- [45] F. A. Cordeiro *et al.*, “Purification and enzymatic characterization of a novel metalloprotease from Lachesis muta rhombeata snake venom,” *J. Venom. Anim. Toxins Incl. Trop. Dis.*, vol. 24, no. 1, p. 32, Dec. 2018, doi: 10.1186/s40409-018-0171-x.
- [46] K. Kalogeropoulos *et al.*, “Protease Activity Profiling of Snake Venoms Using High-Throughput Peptide Screening,” *Toxins (Basel)*, vol. 11, no. 3, p. 170, Mar. 2019, doi: 10.3390/toxins11030170.
- [47] T. Matsui, Y. Fujimura, and K. Titani, “Snake venom proteases affecting hemostasis and thrombosis,” *Biochim. Biophys. Acta - Protein Struct. Mol. Enzymol.*, vol. 1477, no. 1–2, pp. 146–156, Mar. 2000, doi: 10.1016/S0167-4838(99)00268-X.
- [48] Z. Latinović *et al.*, “The Procoagulant Snake Venom Serine Protease Potentially Having a Dual, Blood Coagulation Factor V and X-Activating Activity,” *Toxins (Basel)*, vol. 12, no. 6, p. 358, May 2020, doi:

10.3390/toxins12060358.

- [49] J. J. Calvete, L. Sanz, Y. Angulo, B. Lomonte, and J. M. Gutiérrez, "Venoms, venomics, antivenomics," *FEBS Lett.*, vol. 583, no. 11, pp. 1736–1743, Jun. 2009, doi: 10.1016/j.febslet.2009.03.029.
- [50] D. Salazar-Valenzuela, D. Mora-Obando, M. L. Fernández, A. Loaiza-Lange, H. L. Gibbs, and B. Lomonte, "Proteomic and toxicological profiling of the venom of *Bothrocophias campbelli*, a pitviper species from Ecuador and Colombia," *Toxicon*, vol. 90, pp. 15–25, Nov. 2014, doi: 10.1016/j.toxicon.2014.07.012.
- [51] D. 2020 Santacruz-Ortega, P., Salazar-Valenzuela, "Envenenamiento por mordeduras de serpientes en Ecuador.," *BIOWEB. Pontificia Universidad Católica del Ecuador.*, 2020. .
- [52] U. K. LAEMMLI, "Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4," *Nature*, vol. 227, no. 5259, pp. 680–685, Aug. 1970, doi: 10.1038/227680a0.
- [53] L. Sanz *et al.*, "New insights into the phylogeographic distribution of the 3FTx/PLA2 venom dichotomy across genus *Micrurus* in South America," *J. Proteomics*, vol. 200, pp. 90–101, May 2019, doi: 10.1016/j.jprot.2019.03.014.
- [54] C. Yoo *et al.*, "Comprehensive analysis of proteins of pH fractionated samples using monolithic LC/MS/MS, intact MW measurement and MALDI-QIT-TOF MS," *J. Mass Spectrom.*, vol. 42, no. 3, pp. 312–334, Mar. 2007, doi: 10.1002/jms.1163.
- [55] M. Science, "Mascot Distiller." <https://www.matrixscience.com/distiller.html>.
- [56] Uniprot, "Swiss-Prot/TrEMBL." <https://www.uniprot.org/>.
- [57] A. K. Tashima *et al.*, "Peptidomics of Three Bothrops Snake Venoms: Insights Into the Molecular Diversification of Proteomes and Peptidomes," *Mol. Cell. Proteomics*, vol. 11, no. 11, pp. 1245–1262, Nov. 2012, doi: 10.1074/mcp.M112.019331.
- [58] L. Bruno and G. Jose María, "La actividad proteolítica de los venenos de serpientes de Costa Rica sobre la caseína," *Rev. Biol. Trop.*, vol. 31, no. 1, pp. 37–40, 1983.
- [59] M. Holzer and S. P. Mackessy, "An aqueous endpoint assay of snake venom phospholipase A2," *Toxicon*, vol. 34, no. 10, pp. 1149–1155, Oct. 1996, doi: 10.1016/0041-0101(96)00057-8.
- [60] S. M. Munekiyo and S. P. Mackessy, "Effects of Temperature and Storage Conditions on the Electrophoretic, Toxic and Enzymatic Stability of Venom Components," *Comp. Biochem. Physiol. Part B Biochem. Mol. Biol.*, vol. 119, no. 1, pp. 119–127, Jan. 1998, doi: 10.1016/S0305-0491(97)00294-0.
- [61] Z. H. (2) Ghorbanpur M (1), Zare Mirakabadi A (2), Zokaei F (1), "Identification and partial purification of an anticoagulant factor from the venom of the Iranian snake *Agkistrodon halys*," *J Venom Anim Toxins incl*

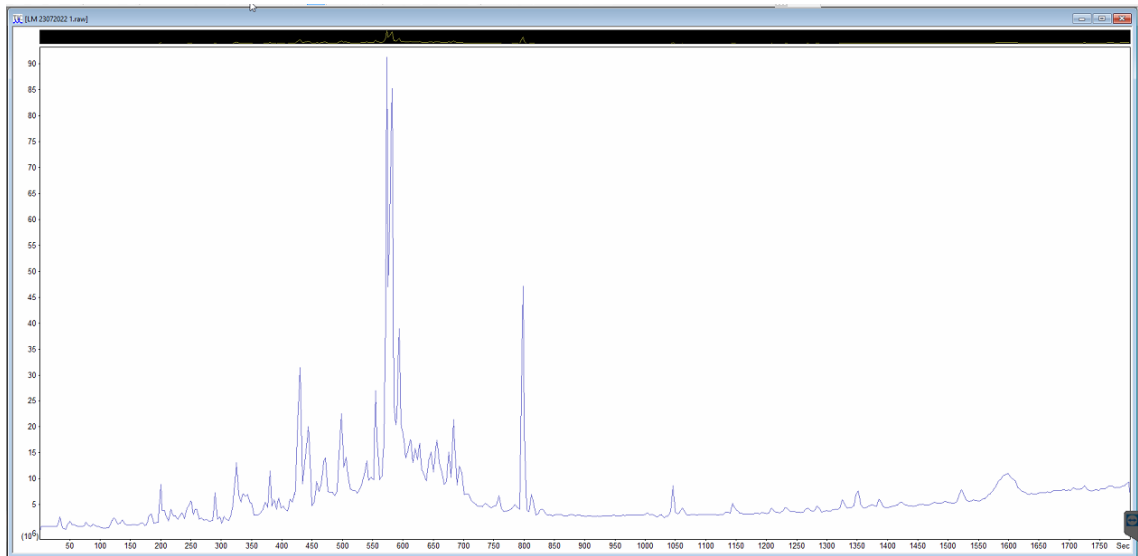
Trop Dis., vol. 16, no. 1, pp. 96–106, 2010.

- [62] M. Kishimoto and T. Takahashi, “A Spectrophotometric Microplate Assay for -Amino Acid Oxidase,” *Anal. Biochem.*, vol. 298, no. 1, pp. 136–139, Nov. 2001, doi: 10.1006/abio.2001.5381.
- [63] J. J. Calvete, P. Juárez, and L. Sanz, “Snake venomics. Strategy and applications,” *J. Mass Spectrom.*, vol. 42, no. 11, pp. 1405–1414, Nov. 2007, doi: 10.1002/jms.1242.
- [64] J. J. Calvete, “Next-generation snake venomics: protein-locus resolution through venom proteome decomplexation,” *Expert Rev. Proteomics*, vol. 11, no. 3, pp. 315–329, Jun. 2014, doi: 10.1586/14789450.2014.900447.
- [65] Y. Liu, R. Hüttenhain, B. Collins, and R. Aebersold, “Mass spectrometric protein maps for biomarker discovery and clinical research,” *Expert Rev. Mol. Diagn.*, vol. 13, no. 8, pp. 811–825, Nov. 2013, doi: 10.1586/14737159.2013.845089.
- [66] V. Núñez *et al.*, “Snake venomics and antivenomics of *Bothrops atrox* venoms from Colombia and the Amazon regions of Brazil, Perú and Ecuador suggest the occurrence of geographic variation of venom phenotype by a trend towards paedomorphism,” *J. Proteomics*, vol. 73, no. 1, pp. 57–78, Nov. 2009, doi: 10.1016/j.jprot.2009.07.013.
- [67] D. Mora-Obando *et al.*, “Venom variation in *Bothrops asper* lineages from North-Western South America,” *J. Proteomics*, vol. 229, p. 103945, Oct. 2020, doi: 10.1016/j.jprot.2020.103945.

7. Anexos

Ejemplo de tratamiento de Datos para la proteína escindida y digerida en gel presente en la fracción 16.

Anexo 1 Cromatograma de la proteína escindida y digerida en gel presente en la fracción 16.

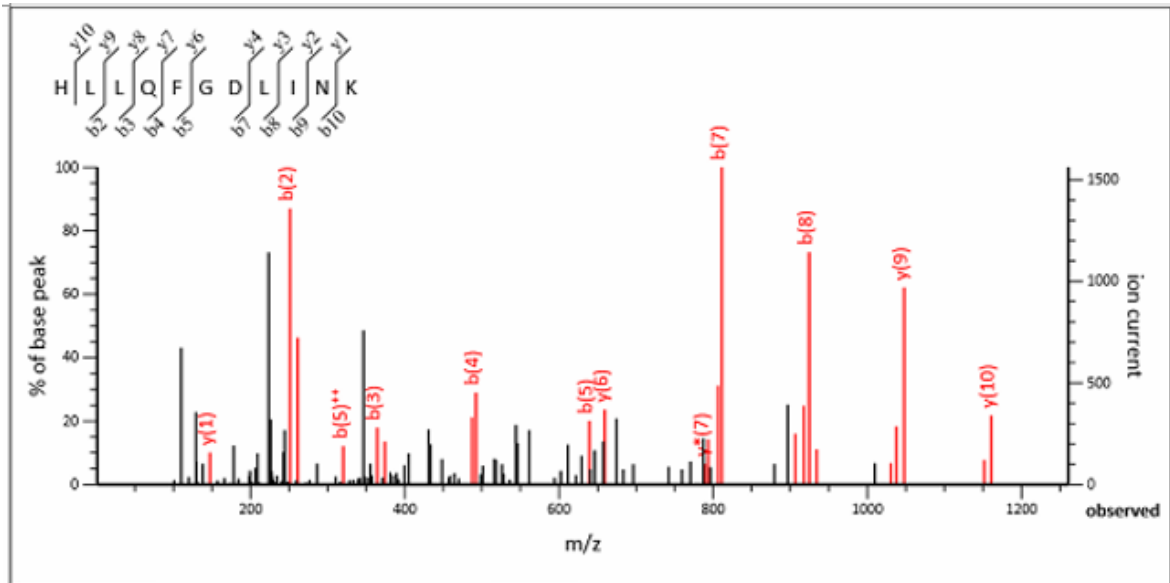


Anexo 2 Búsqueda en bases de datos Swissprot usando espectros MS/MS en MASCOT para la proteína escindida y digerida en gel presente en la fracción 16.

MASCOT MS/MS Ions Search

Your name	Carolina Proano	Email	cdproano@yahoo.com
Search title	AC FORMICO 0.1%		
Database(s)	BaseDatosSarsCov2 BasedatosPhyllomedusaecuatorialiana CompleteBoanapicturataDatabase01 Databasebejasapis SwissProt	Enzyme	Trypsin
		Allow up to	0 missed cleavages
		Quantitation	None
Taxonomy	All entries		
Fixed modifications	Carbamidomethyl (C)	> <	Acetyl (K) Acetyl (N-term) Acetyl (Protein N-term) Amidated (C-term) Amidated (Protein C-term) Ammonia-loss (N-term C) Biotin (K) Biotin (N-term) Carbamyl (K) Carbamyl (N-term) Carboxymethyl (C)
	Display all modifications <input type="checkbox"/>		
Variable modifications	Oxidation (M)	> <	
Peptide tol. ±	0.15 Da	# ¹³C	0
		MS/MS tol. ±	0.15 Da
Peptide charge	2+ and 3+		Monoisotopic <input checked="" type="radio"/> Average <input type="radio"/>
Data file	Browse...		
Data format	Mascot generic	Precursor	m/z
Instrument	ESI-QUAD-TOF		Error tolerant <input type="checkbox"/>
Decoy <input type="checkbox"/>		Report top	AUTO hits
	Start Search ...		Reset Form

Anexo 3 Determinación de la secuencia de aminoácidos mediante ionización por LC-ESI-MS/MS de iones peptídicos tripticos doble y triplemente cargados para la proteína escindida y digerida en gel presente en la fracción 16



Label all possible matches ○ Label matches used for scoring ●

Monoisotopic mass of neutral peptide Mr(calc): 1296.7190

Fixed modifications: Carbamidomethyl (C) (apply to specified residues or termini only)

Ions Score: 58 **Expect:** 8.8e-005

Matches : 23/94 fragment ions using 42 most intense peaks [\(help\)](#)

#	b	b ⁺⁺	b [*]	b ⁺⁺⁺	b ⁰	b ⁰⁺⁺	Seq.	y	y ⁺⁺	y [*]	y ⁺⁺⁺	y ⁰	y ⁰⁺⁺	#
1	138.0662	69.5367					H							11
2	251.1503	126.0788					L	1160.6674	580.8373	1143.6408	572.3241	1142.6568	571.8320	10
3	364.2343	182.6208					L	1047.5833	524.2953	1030.5568	515.7820	1029.5728	515.2900	9
4	492.2929	246.6501	475.2663	238.1368			Q	934.4993	467.7533	917.4727	459.2400	916.4887	458.7480	8
5	639.3613	320.1843	622.3348	311.6710			F	806.4407	403.7240	789.4141	395.2107	788.4301	394.7187	7
6	696.3828	348.6950	679.3562	340.1817			G	659.3723	330.1898	642.3457	321.6765	641.3617	321.1845	6
7	811.4097	406.2085	794.3832	397.6952	793.3991	397.2032	D	602.3508	301.6790	585.3243	293.1658	584.3402	292.6738	5
8	924.4938	462.7505	907.4672	454.2373	906.4832	453.7452	L	487.3239	244.1656	470.2973	235.6523			4
9	1037.5778	519.2926	1020.5513	510.7793	1019.5673	510.2873	I	374.2398	187.6235	357.2132	179.1103			3
10	1151.6208	576.3140	1134.5942	567.8007	1133.6102	567.3087	N	261.1557	131.0815	244.1292	122.5682			2
11							K	147.1128	74.0600	130.0863	65.5468			1